



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



BIOPROSPECÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith EM TESTES *IN VITRO* COM OVOS E LARVAS DE *Haemochus contortus* DE PEQUENOS RUMINANTES

MARISA CRISTINA ARANHA BATISTA

São Luís- MA

06/2016

MARISA CRISTINA ARANHA BATISTA

BIOPROSPECÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith EM TESTES *IN VITRO* COM OVOS E LARVAS DE *Haemochus contortus* DE PEQUENOS RUMINANTES

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior

São Luís - MA

06/2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Batista, Marisa Cristina Aranha.

Bioprospecção anti-helmíntica da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em testes in vitro com ovos e larvas de *Haemochus contortus* de pequenos ruminantes / Marisa Cristina Aranha Batista. - 2016.

149 f.

Coorientador(a): Lívio Martins Costa Junior.

Orientador(a): Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUIS, 2016.

1. Atividade anti-helmíntica. 2. Atividade antioxidante. 3. Composição química. 4. Compostos fenólicos. 5. Geoprópolis. I. Costa Junior, Lívio Martins. II. Ribeiro, Maria Nilce de Sousa. III. Título.

MARISA CRISTINA ARANHA BATISTA

BIOPROSPECÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith EM TESTES *IN VITRO* COM OVOS E LARVAS DE *Haemochus contortus* DE PEQUENOS RUMINANTES

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior

Banca examinadora

Prof. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro
Presidente da banca

Prof. Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes
Examinador 2 – interno

Prof. Dr. Richard Pereira Dutra
Examinador 3 – interno

Prof. Dr. Raquel Maria Trindade Fernandes
Examinador 4 – interno

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Junior
Examinador 5 – externo

São Luís / MA

06/2016

Dedico este trabalho a minha família e em especial a minha orientadora que sempre me apoiou em todas as decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu concluir este trabalho, mantendo-me com passos firmes mesmo nos momentos em que o solo parecia movediço debaixo dos pés.

Aos meus pais, Mirian Cristina Aranha Batista e Expedito Leite Batista Junior, pela motivação e apoio dado durante toda minha vida em especial a esse momento de vitória.

Aos meus irmãos Expedito Leite Batista Neto, Tereza Cristina Aranha Batista e Raynara Helena Aranha Batista pelo carinho, atenção e auxílio dado durante minha vida.

Ao meu maior presente, benção de Deus que obtive neste doutorado, fonte de inspiração para finalização do doutorado, meu filho amado Benjamin Noletto Batista Dias.

Ao meu companheiro Adriano Noletto Lira Dias pelo seu carinho e compreensão, pelos momentos de ausência e isolamento para desenvolver e escrever a tese.

Agradeço a toda a minha família pelo incentivo e apoio! Muito obrigada!

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro, pela inestimável orientação desde a minha graduação, se tornou uma segunda mãe em minha vida. Seus ensinamentos, conselhos e apoios foram fundamentais e imensuráveis ao longo dos anos de estudo, pesquisa e vida. Saiba que admiro muito, meu eterno agradecimento!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Lívio Martins Costa Junior pela oportunidade de realização do estudo anti-helmíntico da geoprópolis, por sempre ter me recebido com muito carinho em seu Laboratório de Controle de Parasitos e suas inestimáveis orientações.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Farmacognosia, pelas conversas e discussões sobre temas relevantes para a pesquisa: Richard Dutra, Mayara Soares, Bruno Abreu, Vanessa Silva, Josiane Barbosa, José Wilson Mesquita, Ludmilla Mesquita, Wilany Esposito, Jessyca Wan Lume, Tallison Taylor, Andrea Jansen, Kleyton Veras. Não há dinheiro que pague à amizade e carinho de cada um de vocês.

Aos amigos do Laboratorio de Controle de Parasitos que me receberam super bem, mesmo sabendo das minhas limitações, por conta da gravidez e em seguida filho pequeno, em especial a Andreia Freitas, Aldilene Silva e Carol, meu muito obrigada!

Aos professores do curso de Medicina UFMA de Imperatriz pela compreensão das ausências para realização da pesquisa e desenvolvimento da tese.

As amizades construídas durante o doutorado, as quais levo para minha vida em especial a todos da primeira turma de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, turma 2012, que enfrentou todas as dificuldades de uma primeira turma de um curso, mais que com mérito será concluída.

A Coordenadora Profa. Dra. Patricia Maia Correia de Albuquerque, que com presteza soube conduzir e manter com qualidade Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de auxílio durante os dois primeiros anos de doutorado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios financeiros para desenvolvimento da tese.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

(Chico Xavier)

RESUMO

Um dos principais entraves ao crescimento da caprinovinocultura são as parasitoses gastrintestinais, que representam o maior e mais grave problema sanitário, chegando a inviabilizar economicamente a criação, em função da resistência dos parasitos aos fármacos anti-helmínticos. Os produtos naturais, especialmente a geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, com destaque para *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) surge como uma alternativa para tratamento dessas enfermidades. Dados na literatura sobre atividade anti-helmíntica com a geoprópolis são escassos, desta forma, objetivamos avaliar a composição química da geoprópolis de diferentes regiões fitogeográficas, atividade antioxidante e atividade anti-helmíntica em caprinos e ovinos, visando a obtenção de um produto anti-helmíntico. As amostras de geoprópolis foram coletadas nos municípios de Palmeirândia e Fernando Falcão, MA e submetidas a extração para obtenção dos extratos hidroalcoólicos da geoprópolis. Dos extratos obtidos das geoprópolis oriundas dos municípios de Palmeirândia e Fernando Falcão, MA, foram determinados os teores de fenólicos totais pelo reagente de Folin–Ciocalteu, e atividade antioxidante utilizando o ensaio *in vitro* com o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e capacidade redutora do ferro (FRAP). Os extratos foram derivatizados e analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM), para identificação dos constituintes químicos. As amostras da geoprópolis oriundas das diferentes regiões fitogeográficas apresentaram variações no teor de fenólicos totais (126,60 – 847,50 mgEAG/g), atividade antioxidante para DPPH (IC₅₀ 4,24 - 44,44 µg/mL) e FRAP (1,29 – 18,42 mmol Fe^{II}/g) no entanto, as geoprópolis de Fernando Falcão, apresentaram melhores teores. Nas geoprópolis do município de Palmeirândia foram identificados, triterpenos do tipo cicloartano, ursano e oleanano e ácidos fenólicos (ácido protocatecuico e ácido gálico), enquanto que na geoprópolis de Fernando Falcão, ácidos fenólicos, ácido gálico e elágico foram os principais constituintes. Além da identificação química os extratos foram submetidos a teste anti-helmínticos *in vitro* de desembainhamento larvar com *Haemonchus contortus*, apresentando atividade apenas o extrato oriundo do município de Fernando Falcão, sendo obtido um bioproducto (patente depositada) que quando testado nas mesmas condições também apresenta ação anti-helmíntica. Essa mesma amostra oriunda do município de Fernando Falcão foi submetida a uma nova extração para obtenção de um maior rendimento, fracionada por biomonitoramento, por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, obtendo-se frações: hexânica (HFG), clorofórmica (CFG), acetato de etila (EAFG) e hidroalcoólica (HAFG). O extrato e frações foram avaliados com testes anti-helmínticos *in vitro* de desembainhamento larvar e inibição da eclodibilidade de

ovos de *Haemonchus contortus*. Novas análises espectrofotométricas foram realizadas a para determinação dos teores polifenóis totais, atividade antioxidante *in vitro* com DPPH e FRAP e perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta (CLAE/UV) e a identificação dos componentes químicos das frações ativas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/EM). Para o teste de eclodibilidade de ovos a CE_{50} variou de 2,01 – 3,73 mg/mL, para extrato e frações sendo a fração mais ativa EAFG com CE_{50} 2,01 mg/mL, e o teste de desembainhamento larvar variou com CE_{50} de 0,12 – 0,55 mg/mL, a fração mais ativa HAFG com CE_{50} 0,12 mg/mL. O extrato e frações apresentaram altos teores de polifenóis totais (64,50-650,19 mgEAG/g) e atividade antioxidante para DPPH (IC_{50} 6,50 – 29,80 μ g/mL) e FRAP (6,91 -17,19 mM Fe^{2+} /g). A fração hexânica apresentou baixo rendimento desta forma não foi submetida a testes anti-helmínticos, não apresentou ação antioxidante e apresentou as menores concentrações de polifenóis. Nas frações ativas foram identificados ácido fenólicos (ácido elágico e derivados, brevifolin e ácido caftárico), taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos). A atividade anti-helmíntica da geoprópolis de *Melipona fasciculata* (tiúba) provavelmente está relacionada com a atividade antioxidante e à presença de compostos fenólicos principalmente ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, além disso, as fontes vegetais utilizadas pelas abelhas para a produção da geoprópolis contribuem para a composição química e bioatividade deste produto.

Palavras chaves: geoprópolis; composição química, atividade antioxidante, atividade anti-helmíntico; compostos fenólicos.

ABSTRACT

One of the main barriers to creation of goats and sheep are gastrointestinal parasites, which represent the largest and most serious health problem, reaching economically derail the creation, due to the resistance of parasites to anthelmintic drugs. Natural products, especially geopropolis produced by stingless bees of the genus *Melipona*, especially *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) is an alternative for treatment of these diseases. Data in the literature on anthelmintic activity with geopropolis are scarce in this way, we aimed to evaluate the chemical composition of geopropolis of different phytogeographical regions, antioxidant activity and anthelmintic activity in sheep and goats, in order to obtain an anthelmintic product. The samples of geopropolis were collected in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falção, MA and subjected to extraction to obtain the hydroalcoholic extracts of geopropolis. Geopropolis extracts obtained from the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, MA, were determined the total phenolic content by the Folin-Ciocalteu and antioxidant activity using the *in vitro* assay with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Extracts were derivatized and analyzed by gas chromatography-mass spectrometer (GC/MS) to identify the chemical constituents. Samples of geopropolis of different phytogeographical regions showed variations in the total phenolic content (126.60 – 847.50 mgGAE/g), and antioxidant activity antioxidante for DPPH (IC₅₀ 4.24 – 44.44 µg/mL) and FRAP (1.29 – 18.42 mmol Fe^{II}/g), the geopropolis from Fernando Falcao, showed better levels. On geopropolis from municipality of Palmeirândia were identified triterpenes cicloartane type, ursane and oleanane and phenolic acids (gallic acid and protocatechuic acid), whereas in geopropolis from Fernando Falcão, phenolic acids, gallic acid and ellagic were the main constituents. Besides the chemical identification extracts were subjected to anthelmintics *in vitro* larval exsheathment inhibition assay with *Haemonchus contortus*, with activity only the extract originating from the municipality of Fernando Falcão, and gotten a bioproduct (patent filed) when tested under the same conditions also presents action anthelmintic. This same sample from municipality of Fernando Falcão was subjected to a new extraction to obtain a higher yield, fractioned and, biomonitoring by liquid/liquid partition with solvents of different polarities, yielding fractions: hexane (HFG), chloroform (CFG), ethyl acetate (EAFG) and hydroalcoholic (HAFG). The extract and fractions were evaluated with anthelmintics *in vitro* assays larval exsheathment inhibition and egg hatch of *Haemonchus contortus*. New spectrophotometric analyzes were conducted to determine the polyphenol contents, *in vitro* antioxidant activity on DPPH and FRAP and chromatographic profile by high-performance liquid chromatography coupled with UV detector (HPLC/UV)

and identification of the chemical components of the active fractions was performed by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC/MS). For the egg hatch test $EC_{50\%}$ ranged from 2.01 to 3.73 mg/ml to extract and fractions being the most active fraction EAFG with EC_{50} 2.01 mg/ml, and exsheathment larval varied with EC_{50} 0.12 - 0.55 mg/ml, most active fraction HAFG EC_{50} 0.12 mg/ml. The extract and fractions showed high levels of polyphenols (64.50 - 650.19 mgGAE/g) and antioxidant activity (IC_{50} 6.50 - 29.80 μ g/mL) and FRAP (6.91 -17.19 mM Fe^{2+} /g). The hexane fraction had low income in this way was not subject to anthelmintics tests did not show antioxidant and had the lowest concentrations of polyphenols. The active fractions were identified phenolic acid (ellagic acid and derivatives, and brevifolin carboxilate, caftaric acid), hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins). The anthelmintic activity of geopropolis of *Melipona fasciculata* (tiúba) is probably related to the antioxidant activity and the presence of phenolic compounds mainly phenolic acids and hydrolyzable tannins, also plant sources used by bees to produce the geopropolis contribute to the composition chemical and bioactivity of the product.

Keywords: geopropolis; chemical composition, antioxidant activity, anthelmintic activity; phenolic compounds

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. <i>Melipona fasciculata</i> Smith (tiúba) e geoprópolis.....	17
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i> em pequenos ruminantes	40
Figura 3. Ovos de <i>Haemonchus contortus</i> (visto em microscópio invertido com aumento de 200x).....	40
Figura 4. Estádios larvais de <i>Haemonchus contortus</i> (Aumento 400x).	41

CAPÍTULO 3

Figure 1. HPLC chromatograms of compounds detected at 254 nm in ethyl acetate fraction (EAFG) and hydroalcoholic fraction (HAFG) of geopropolis extract. Peak numbers correspond to the compounds shown in Table 3 and 4.....	96
Figure 2. Chemical structures of hydrolyzable tannins detected in ethyl acetate fraction (EAFG). Compounds 8 and 11 , the information were not sufficient to detail the structures	97
Figure 3. Typical fragmentation of ellagitannins. HHDP, hexahydroxydiphenolic acid	98

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Dados da literatura sobre a composição química da geoprópolis de espécies do gênero <i>Melipona</i>	23
Tabela 2. Dados da literatura sobre as atividades biológicas da geoprópolis de espécies do gênero <i>Melipona</i>	33

CAPÍTULO 1

Table 1. Total phenolic content (TPC) concentrations (mg GAE g ⁻¹) and antioxidant activity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH (IC ₅₀ in µg mL ⁻¹), and ferric reducing antioxidant power, FRAP (in mmol Fe ^{II} g ⁻¹), mean values (± standard deviation; n = 3) of the hydroalcoholic extract of geopropolis (HEG) in two phytogeographical regions, flooded fields and cerrado, in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, Maranhão State, northeastern Brazil. HEG1 and HEG2 are geopropolis collected at Palmeirândia; HEG3 and HEG4 are geopropolis collected at Fernando Falcão	60
Table 2. Pearson correlation coefficient between the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays and total phenolic content (TPC)	60
Table 3. Chemical composition of the hydroalcoholic extract of geopropolis (HEG) in two phytogeographical regions, flooded fields and cerrado, in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, Maranhão State, northeastern Brazil, expressed in percentage of total ion chromatograms (TIC%). HEG1 and HEG2 are geopropolis collected at Palmeirândia; HEG3 and HEG4 are geopropolis collected at Fernando Falcão). Each value denotes the mean of three analyses	60

CAPÍTULO 3

Table 1. Effective concentration of extract and fractions (mg/mL) required for achieving 50% inhibition of egg hatching (EC ₅₀) after a 48 h incubation period with the most active and the exsheathment inhibition assay of <i>Haemonchus contortus</i> third stage larvae	92
Table 2. Total phenolic content and antioxidant activity of the extract and fractions of geopropolis	93

Table 3. Summarizes the tentatively identified phenolic compounds, molecular weight, molecular ion $[M - H]^-$, and main product ions obtained by HPLC-MS/MS for the 11 fragmentation peaks of ethyl acetate fraction (EAFG).....	94
Table 4. Summarizes the tentatively identified phenolic compounds, molecular weight, molecular ion $[M - H]^-$, and main product ions obtained by HPLC-MS/MS for the 5 fragmentation peaks of hydroalcoholic fraction (HAFG)	95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Geoprópolis de abelhas do gênero <i>Melipona</i>	18
2.2 Composição química da geoprópolis de espécies do gênero <i>Melipona</i>	19
2.3 Atividades biológicas da geoprópolis de espécies do gênero <i>Melipona</i>	31
2.4 Patentes de produtos com geoprópolis do gênero <i>Melipona</i>	37
2.5 Parasitos gastrointestinais em caprinos – Fatores limitantes da caprinocultura.....	38
2.6 <i>Haemonchus contortus</i> (Rudholphi 1803).....	39
2.7 Fármacos anti-helmínticos x resistência anti-helmíntica.....	43
2.8 Práticas de manejo para o controle anti-helmíntico.....	44
2.9 Testes anti-helmínticos <i>in vitro</i>	46
2.10 Fitoconstituintes com atividade anti-helmíntica.....	47
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4. JUSTIFICATIVA	54
5. RESULTADOS	55
5.1 CAPÍTULO 1 - Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by <i>Melipona fasciculata</i> (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil.....	56
5.2 CAPÍTULO 2 - Formulação farmacêutica anti-helmíntica com o extrato seco da geoprópolis	64
5.3 CAPÍTULO 3 - Anthelmintic activity of hydrolyzable tannins and phenolic acids, constituents of geopropolis against <i>Haemonchus contortus</i> nematode.....	65
6. CONCLUSÕES	99
REFERENCIAS	100
ANEXOS	130

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com área de dimensões continentais, dotado de características edafoclimáticas apropriadas para a criação de caprinos e ovinos, com um efetivo de 9,4 e 17,6 milhões de cabeças respectivamente que são utilizados para a caprinovinocultura leiteira e produção de carne (IBGE, 2013; SEBRAE, 2012).

A caprinovinocultura é uma das atividades mais frequentes no semiárido nordestino brasileiro, devido à capacidade de resistência destes animais a condições adversas, que concentra o maior rebanho, com 94% dos caprinos e 57% de ovinos do total nacional, sendo utilizados por pequenos produtores rurais como uma fonte de nutrição e renda, tornando a caprinovinocultura uma atividade importante do ponto de vista socioeconômico. (CASTAGNARA, et al., 2007; SEBRAE, 2012; IBGE, 2013). No entanto, um dos principais entraves ao crescimento deste segmento são as parasitoses gastrintestinais, que representam o maior e mais grave problema sanitário que acomete os pequenos ruminantes chegando a inviabilizar economicamente a criação, ocasionando desde a diminuição do consumo de alimentos, má digestão e absorção de nutrientes, redução no ganho de peso, anemia, diarreia e morte dependendo da intensidade da infecção (VIEIRA, 2008).

O parasitismo por nematoides gastrintestinais é uma das maiores causas da mortalidade de pequenos ruminantes; em áreas tropicais o número de animais infectados alcança mais de 95%, principalmente jovens e fêmeas em período peri-parturiente ou em lactação, sofrendo uma perda de peso de 6-12 kg por animal/ano, resultando em mortalidade acima de 40%, causando impactos nos sistemas de produção, elevando os custos de controle (KNOX, et al., 2006; COSTA, et al., 2011).

Dentre os parasitas que afetam caprinos e ovinos e que ocasionam grandes prejuízos ao rebanho está *Haemonchus contortus*, que é considerado o parasito de maior importância epidemiológica pela sua alta prolificidade e resistência a anti-helmínticos. Os animais infectados tornam-se anêmicos, hipo-proteinêmicos e baixo ganho de peso (IDRIS, et al., 2012).

O controle das parasitoses gastrintestinais é feito basicamente com a utilização de fármacos anti-helmínticos, que geralmente ocasionam em resistência dos parasitas aos princípios ativos, devido ao uso intensivo destes fármacos, subdoses, diagnósticos incorretos e falta de rotatividade de bases farmacológicas (LIMA, et al., 2010; MAVROT, et al., 2015).

A vulnerabilidade destes produtos diante da capacidade de sobrevivência dos parasitas faz com que eles tenham tempo de uso pré-determinado, além disso, a existência de resíduos na carne e no leite e a ecotoxicidade de alguns compostos representam preocupação

crecente, além do elevado custo econômico do tratamento anti-helmíntico, apontam para a necessidade de pesquisas para contornar essa situação e baratear custos de produção (CASTAGNARA, et al., 2007).

Considerando os problemas de resistência parasitária e de resíduos nos alimentos, a busca por novas alternativas para o controle dos parasitas se faz necessária e nos últimos anos tem sido observado um crescente interesse pelas práticas etnomédicas e etnoveterinárias, especialmente aquelas relacionadas ao uso de produtos naturais no tratamento de doenças (BIZIMENYERA, et al., 2006; SPRENGER, et al., 2015).

Assim, o uso de produtos naturais, como plantas medicinais ou produtos derivados de abelhas, própolis e a geoprópolis podem ser ferramentas na redução desses problemas, possibilitando também prolongar a vida útil dos produtos químicos comerciais utilizados no controle de parasitas. O desenvolvimento de novos anti-helmínticos tem sido um processo lento e caro para a indústria farmacêutica (CHAGAS, et al., 2008).

Para formar a própolis, as abelhas coletam resina de diferentes partes da planta e adicionam secreções mandibulares e cera formando uma goma resinosa e balsâmica de estrutura complexa contendo aproximadamente 50 a 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, podendo variar de acordo com a flora da região e espécie de abelha (CUNHA, et al., 2004). No entanto, para formar a geoprópolis, além desses produtos, as abelhas adicionam terra (KERR, 1987).

A geoprópolis (Figura 1B) é produzida por abelhas sociais e com ferrão atrofiado, do gênero *Melipona*, chamadas de meliponíneos, que ocupam regiões de clima tropical no planeta, especialmente na América do Sul, responsáveis por 90% da polinização de vegetais nativos. No estado do Maranhão, Brasil, destaca-se a espécie de abelha sem ferrão, *Melipona fasciculata* Smith (Figura 1A), conhecida como “tiúba” ou “tiúba do Maranhão” cultivada há séculos pela população indígena e também pela população rural do interior do Estado para produção e comercialização de mel, além disso, acumula pólen (KERR, 1987).

Tanto a geoprópolis como a própolis são utilizadas pelas abelhas para protegê-las contra invasão de insetos e microrganismos, restringindo a entrada, recobrando a parede da colmeia, reforçando os favos, preenchendo fissuras e embalsamando animais (MARCUCCI, 1996, BEZERRA, et al., 2015).



Figura 1. *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) e geoprópolis. **A:** Abelha tiúba visita a flor de *Bixa orellana* L. **B:** Tipos de geoprópolis produzidas por *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) no estado do Maranhão. Fonte: Adriana Martins, 2008 e Dutra, 2012.

As pesquisas com própolis têm se concentrado nas abelhas com ferrão e africanizadas, especialmente *Apis mellifera*, possuindo atividades: antimicrobiana (SILVA et al., 2006; SAEKI, et al., 2011; BANKOVA, et al., 2014); antioxidante, antiinflamatória, antiulcerogênica (REIS, et al, 2000; BORRELLI, et al, 2002; RIGH, et al., 2011); imunomoduladora, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, antitumoral, hipoglicemiante e antialérgica (ORSOLIC & BASIC, 2005; SFORCIN, et al., 2011; SHRUTHI & SUMA, 2012) efeito coccidiostático (MOURA, et al., 1998), leishmanicida (AYRES, et al., 2007; MACHADO, et al., 2007; SILVA, et al., 2015) e propriedade anti-helmíntica (PRINCIPAL, et al., 2002; ARAÚJO, et al., 2006; CASTAGNARA, et al., 2007; LOUREIRO, et al., 2007; KRYCHAK-FURTADO, 2011; HEINZEN, et al., 2012).

Dados na literatura sobre a geoprópolis relatam atividades biológicas como antimicrobiana (VELIKOVA, et al., 2000 a,b; DUAİLIBE, et al., 2007; LIBÉRIO, 2010; LIBÉRIO, et al., 2011; CUNHA, et al., 2013); antiproliferativa, citotóxica (CANTANHEDE, et al., 2007; CUNHA, 2013; DA CUNHA, et al., 2016); antitumoral (ASSUNÇÃO, 2011; CUNHA, 2013; CINEGAGLIA, et al., 2013) e antioxidante (BATISTA, 2011; SILVA, et al., 2013; SOUZA, et al., 2013; DUTRA, et al., 2014), leishmanicida (DUTRA, 2012), antiinflamatória (FRANCHIN, et al., 2012, 2013), imunomodulatória (ARAÚJO, et al., 2015) e propriedades gastroprotetoras (RIBEIRO-JUNIOR, et al., 2015). Ressalta-se que a literatura não registra ação anti-helmíntica da geoprópolis.

As atividades biológicas podem estar relacionadas com a composição química da geoprópolis, dados relatam a presença de compostos polifenólicos: ácidos fenólicos (ABREU, et al., 2006; CUNHA, et al., 2009; BATISTA, 2011; DUTRA, et al., 2011; CUNHA, 2013) taninos (DUTRA, et al., 2014), flavonoides (SILVA, et al., 2013; SOUZA, et al., 2013),

benzofenonas preniladas (TOMAS-BARBERAN, et al., 1993); cumarinas e benzofenonas (DA CUNHA, et al., 2016), além de terpenos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, ácidos graxos, esteroides e saponinas (BANKOVA & POPOVA, 2007; DUTRA, et al., 2008; ARAÚJO, et al., 2015).

Apesar do amplo estudo sobre a composição química da própolis ou geoprópolis, é importante ressaltar que esses produtos variam de acordo com flora visitada pelas abelhas, a região e a época da coleta, por isso a importância do conhecimento da origem botânica da geoprópolis (BANKOVA, 2009).

Kerr et al. (1986, 1987) publicaram uma listagem preliminar das espécies vegetais utilizadas como fontes de pólen e néctar por *M. fasciculata* em municípios do estado do Maranhão, enquanto que Martins et al. (2011) analisaram o espectro polínico do mel da tíuba e Ribeiro et al. (2013, 2016) analisaram o espectro polínico da geoprópolis de tíuba de diferentes regiões fitogeográficas do estado do Maranhão.

Nesse contexto, estudos químicos e biológicos são importantes para demonstrar a eficácia desse produto natural promissor, neste trabalho avaliou-se a atividade anti-helmíntica da geoprópolis de *M. fasciculata* do estado do Maranhão, Brasil, pois o uso descontrolado de fármacos anti-helmínticos vem ocasionando um aumento da resistência dos helmintos aos fármacos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Geoprópolis de abelhas do gênero *Melipona*

As abelhas pertencem à ordem dos Himenópteros, reunidas na superfamília Apoidea; as que possuem hábitos sociais mais avançados constituem a família Apidae que está subdividida em quatro subfamílias: Andreninae, Apinae, Colletinae, Halictinae, Megachilinae (CAMARGO & PEDRO, 2013).

A subfamília Apinae possui 20 tribos dentre estas a tribo Meliponini que é constituída por abelhas que possuem ferrão atrofiado, conhecidas como meliponíneos ou abelhas sem ferrão que ocupam grande parte das regiões de clima tropical do planeta, algumas regiões de clima temperado e subtropical, apresentando 33 gêneros dentre estes o gênero *Melipona*, distribuído em quatro subgêneros: *Melipona (Melipona)* Illiger, 1806; *Melipona (Michmelia)* Moure, 1975; *Melipona (Melikerria)* Moure, 1992; *Melipona (Eomelipona)* Moure, 1992, os quais foram baseados totalmente em caracteres morfológicos e refletem as

relações de similaridade e afinidade entre as espécies do gênero *Melipona* (CAMARGO; PEDRO, 2013).

Constituem um grupo ecologicamente importante, pois atuam na manutenção da diversidade das plantas nativas e cultivadas, como efetivos polinizadores, no entanto, estas espécies vêm sendo dizimadas há muitos anos, através da destruição da flora nativa, redução do substrato de nidificação, coleta predatória de ninhos e introdução de espécies exóticas (NOGUEIRA NETO, 1997; SILVEIRA, et al., 2002; VELTHUIS, et al., 2003).

Nas últimas décadas, estudos científicos têm sido intensificados com produtos de abelhas sem ferrão, principalmente em países da América do Sul, regiões onde estas espécies predominam, dentre estes produtos destaca-se a geoprópolis produzida por abelhas do gênero *Melipona*.

A geoprópolis ou batume são nomes genéricos designados para a mistura de material resinoso de plantas, misturado com cera, secreções salivares e terra. Ressalta-se ainda que, o comportamento de coletar terra para produzir a geoprópolis é característico de espécies do gênero *Melipona*, outras espécies de meliponíneos produzem somente própolis (NOGUEIRA NETO, 1997; CASTALDO & CAPASSO, 2002).

As abelhas utilizam a geoprópolis como material asséptico na colmeia, para fechar pequenas frestas, na defesa contra invasores e vedar entradas de ventilação excessiva. É utilizada na construção da entrada das colônias e das paredes divisórias do ninho, ou para reforço das paredes naturais do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997; SOUZA, et al., 2009).

Apesar dessas espécies produzirem a geoprópolis, alguns trabalhos científicos são publicados com o termo própolis o que pode dificultar o entendimento dos dados, no entanto utilizou-se apenas a palavra geoprópolis neste trabalho.

2.2 Composição química da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*

Os primeiros relatos sobre a composição química da geoprópolis são descritos por Greenaway et al. (1990) que analisaram geoprópolis de *Melipona* sp. do Equador, demonstrando presença de ácidos fenólicos, entre eles o ácido 3,5-dihidroxibenzóico, diferentemente da própolis de abelhas *Apis mellifera* da Europa e da América do Norte, rica em flavonoides.

As espécies de *Melipona* citadas neste trabalho são descritas conforme os trabalhos científicos e foram reclassificadas segundo o catálogo de abelhas Moure, com os novos nomes científicos das espécies descritos entre parênteses, seguidos dos nomes científicos anteriores (CAMARGO & PEDRO, 2013).

Tomas-Barberan et al. (1993), analisando amostras de geoprópolis de *Melipona compressipes* (*Melipona (Melikerria) compressipes* Fabricius), *Melipona favosa* (*Melipona (Melipona) favosa* Fabricius), oriundas da Venezuela, identificaram compostos fenólicos do tipo benzofenonas preniladas, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM).

Em 1998, Bankova et al. identificaram mais de cinquenta compostos, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), principalmente compostos fenólicos e triterpenos como as benzofenonas, ácidos fenólicos, pinobaksina e β -amirina, na geoprópolis de espécies de *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata* (*Melipona (Melipona) quadrifasciata* Lepeletier).

Kujungiev et al. (1999) compararam amostras de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (*M. compressipes* e *M. quadrifasciata*) dos estados do Piauí e Paraná, Brasil com própolis de *A. mellifera*, dos estados de São Paulo, Paraná e Ceará, Brasil e observaram a predominância de compostos aromáticos e terpeno em produtos de abelhas sem ferrão.

Presença de compostos fenólicos e terpenos também foram verificados por Velikova et al. (2000 a), através da análise por CG/EM em amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *M. favosa*, *Melipona scutellaris* (*Melipona (Michmelia) scutellaris* Lepeletier), *Melipona marginata* (*Melipona (Eomelipona) marginata* Lepeletier) com predominância de derivados do ácido gálico, ácido diterpênico (ácido caurenóico) e triterpeno (β -amirina), além de açúcares.

Em estudo posterior, Velikova et al. (2000 b) também isolaram ácidos diterpênicos (ácido caurenóico e seus derivados) em geoprópolis da abelha sem ferrão *M. quadrifasciata* do estado do Paraná, Brasil.

Compostos voláteis foram identificados por CG/EM, em geoprópolis da abelha sem ferrão, *Melipona becheii* (*Melipona (Melikerria) becheii* Bennett) do México (PINO, et al., 2006; TORRES-GONZÁLEZ, et al., 2016).

Visando tipificar o padrão de composição química de amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *M. scutellaris* e *M. favosa* e amostras de própolis de outras espécies de meliponíneos de diferentes regiões do Brasil, bem como a fonte vegetal usada pelas abelhas, Sawaya et al. (2007) observaram que a espécie vegetal *Schinus terebenthifolius* é a fonte botânica mais utilizada pelas abelhas sem ferrão.

A geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* (*Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith) em diferentes localidades do estado do Maranhão, tem sido objeto de estudo nos últimos anos, por pesquisadores da Universidade Federal do Maranhão, com o

objetivo de identificar suas características físicas, físico-químicas, químicas e ações biológicas. Os resultados demonstram presença de compostos fenólicos como flavonoides, além de triterpenos, e estudos tem identificado ácidos fenólicos do tipo ácido gálico e taninos hidrolisáveis e em análises por CG/EM observaram a presença de açúcares, triterpenos, ácido anacárdico e alquilresorcinois (ABREU, et al., 2006; DUTRA, et al., 2008; CUNHA, et al., 2009; DUTRA, et al., 2014 ARAÚJO, et al., 2015).

Teores de flavonoides foram verificados em geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *M. compressipes* e própolis de outras espécies de abelhas sem ferrão oriundas do Brasil e Venezuela (MANRIQUE & SANTANA, 2008).

Franchin et al. (2012) observaram altos teores de polifenóis em amostra de geoprópolis de *M. scutellaris* oriundas da Bahia e ausência de flavonoides, da mesma forma Cunha et al. (2013), em amostras de geoprópolis da mesma espécie de abelha e da mesma região, sugerem por CG/EM a presença de compostos das classes das benzofenonas e Da Cunha et al. (2016) identificaram ésteres de ácido cinâmico, cumarinas e benzofenonas.

Compostos fenólicos foram identificados por CLAE em amostras de geoprópolis de *M. scutellaris* e *M. fasciculata* (ARAÚJO, et al., 2016).

Souza et al. (2013, 2014) identificaram por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector “photodiodearray” (CLAE/DAD) em amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* (*Melipona (Melipona) subnitida* Ducke) da Paraíba, fenilpropanoides e flavonoides, enquanto que De Sousa et al. (2015) observaram que em amostras provenientes do Rio Grande do Norte, apresentam altos teores de polifenóis e na prospecção fitoquímica presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides das classes das flavonas e flavonóis, xantonas e triterpenos pentacíclicos livres.

Silva et al. (2013) isolaram e identificaram por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) alguns tipos de flavonoides de geoprópolis de *Melipona interrupta* (*Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille) e *Melipona seminigra* (*Melipona (Michmelia) seminigra* Friese) da região amazônica.

Campos et al. (2014) identificaram por CG/EM, ácidos aromáticos, compostos fenólicos, alcoóis, terpenos e açúcares em amostras de geoprópolis de *Melipona orbignyi* (*Melipona (Melipona) orbignyi* Guérin) oriundas do Mato Grosso do Sul.

Cardozo et al. (2015) observaram que a espécie de abelha e a época de coleta, bem como a interação entre esses fatores, influenciam a concentração de compostos bioativos. As geoprópolis de *M. quadrifasciata* e *M. marginata* independentemente da espécie de abelha ou

a época de coleta, apresentaram como principais constituintes ácidos terpênicos e/ou dihidrocanferida.

Na tabela 1, estão descritos classes de compostos e os constituintes químicos identificados nas geoprópolis de espécies do gênero *Melipona* por diferentes tipos de metodologias analíticas.

Tabela 1. Dados da literatura sobre a composição química da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*

Espécies de abelhas*	Local de origem	Classe de compostos	Compostos químicos	Método analítico	Referências
<i>Melipona sp.</i>	Equador	Fenólicos	3,5-Dihidroxibenzóico	CG/EM	Greenway, et al., 1990
<i>M. (Melipona) favosa</i> (Fabricius, 1798)	Brasil / Venezuela	Fenólicos Terpenos	Benzofenonas preniladas Ácidos diterpênicos, álcool triterpênico	CLAE/EM; CG/EM	Tomás- Barberan, et al., 1993; Velikova, et al., 2000 a.
<i>M. (Melikerria) compressipes</i> (Fabricius, 1804)	Venezuela	Fenólicos	Benzofenonas preniladas, flavonoides	CLAE/EM	Tomás- Barberan, et al., 1993; Manrique & Santana, 2008.
<i>M. (Melikerria) fasciculata</i> (Smith, 1854)	Brasil	Terpenos Fenólicos	α -Pino, nerolidol, espatulenol, <i>t</i> - murolool, ácido dehidroabiético, ácido diterpênico, ácido diterpênico, friedooleanona-3-ona, lupeol, β -amirina, α -amirina, β - amirenona e α -amirenona Ácido gálico, ácido <i>p</i> - hidroxibenzóico, ácido cinâmico,	CG/EM; CLAE/EM;	Bankova, et al., 1998; 1999; Kujungiev, et al., 1999; Abreu, et al., 2006; Dutra, et al., 2008;

ácido <i>cis-p</i> -cumárico, ácido <i>trans-p</i> -cumárico, metil <i>p</i> -cumarato, hidroquinona, etilfenol, pinobanksina, dihidroximetoxiflavonona, 3-(2-OH-fenil)-propanolol, 3-(4-OH-fenil)-propanolol, 1-feniletanol-2-feniletanol, álcool benzílico, benzaldeído, cumarona, OH-acetofenona, ácido gálico, ácido hexahidroxidifenico-galoilglicose, ácido hexahidroxidifenico-glicose, ácido dihexahidroxidifenico-glicose, trigaloilglicose, ácido hexahidroxidifenico-digaloilglicose, ácido valoneico dilactona, ácido hexahidroxidifenico-trisgaloilglicose, ácido hexahidroxidifenico-trigaloilglicose, ácido elagico, flavonoides, ácido anacárdico, alquilresorcinol, heptadecilresorcinol,	Cunha, et al., 2009; Libério, et al., 2011; Dutra, et al., 2014; Araújo, et al., 2015; Araújo, et al., 2016.
--	--

			nonadecilresorcinol, pentadecilresorcinol, catequina, galocatequina, heperidina.		
		Ácidos graxos	Ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido caprótico		
		Hidrocarbonetos	Hidrocarbonetos com cadeia de C8- C25, alquibenzenos, alquilnaftalenos		
		Ácido inorgânico	Ácido fosfórico		
		Açúcares	Glicose, pentose, dissacarídeos		
<i>M. (Melipona) quadrifasciata</i> (Lepeletier, 1836)	Brasil	Terpenos	Terpineno-4-ol, <i>p</i> -menta-1,4-dien- 8-ol, <i>trans</i> -carveol, carvona, <i>p</i> - cimeno, <i>p</i> -cimeno-8-ol, <i>p</i> -cimeno- 7-ol, timol, sabineno, β -tujona, umbellulona, 2-careno, car-3-em-2- ona, α -pineno, β -pineno, <i>trans</i> - pinocarveol, verbenol, verbenona, aldeído α -canfoleno, β -burboneno, aromadendreno, espatulenol, óxido de cariofileno, ácido ent-kaur-16- em-19-oico, ácido ent-15 β -(3- metilbutanoiloxi-16-kauren-19-	CG/EM	Bankova, et al., 1998; 1999; Velikova, et al., 2000 a,b; Manrique & Santana, 2008; Cardozo, et al., 2015.

	oico, ácido ent-15- β -hidroxi-16-kauren-19-oico, ácidos diterpênicos, ácidos E/Z comunico, ácido agatálico, ácido cuprêssico, ácido icocuprêssico, ácido 15-acetoxi-isocuprêssico
Ácidos graxos	Ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido margarínico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido pentadecanóico, ácido isovaleriânico.
Fenólicos	Ácido benzóico, ácido vanílico, ácido cinâmico, ácido dihidroferúlico, ácido caféico, álcool <i>p</i> -cumárico, <i>p</i> -cresol, benzaldeído, 4-isopropilideno benzaldeído, vanilina, coniferilaldeído, cumarona, flavonoides, vanilina, ácido <i>p</i> -cumarico, 3-hidroxi-4-metóxi-cinamalaldeído, canerol, canferida, di-hidrocanferida
Açúcar	Pentose

		Hidrocarbonetos	C8-C25, alquibenzenos, alquilnaftalenos		
<i>M. (Eomelipona) marginata</i> (Lepeletier, 1836)	Brasil	Fenólicos	Ácido benzoico, ácido cinâmico, vanilina, ácido <i>p</i> -cumarico, 3-hidroxi-4-metóxi-cinamaldeído, ácido caféico, canerol, canferida, dihidrocanferida	CG/EM	Velikova, et al., 2000 a; Cardozo, et al., 2015.
		Terpeno	Ácidos E/Z comunico, ácido agatálico, ácido cuprêssico, ácido icocuprêssico, ácido 15-acetoxi-isocuprêssico		
<i>M. (Michmelia) scutellaris</i> (Latreille, 1811)	Brasil	Fenólicos	Ácido benzoico, ácido cinâmico, benzofenonas preniladas, ácido elagico, ácido gálico, catequina, galocatequina, heperidina, canferol, morina, rutina, 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-2-butenil)- 8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)- 4-propil-coumarina, 5,7-dihidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcoumarina, mammeigina, hidroximammeigina,	CG/EM	Velikova, et al., 2000 a; Franchin, et al., 2012; Cunha, et al., 2013; Araújo, et al., 2016; Da Cunha, et al., 2016.

mammeisina, cinamoiloxi-
mammeisina, mammeina,
benzofenona prenilada, ent-
nemorosone.

<i>M. (Melikerria) beechii</i> (Bennett, 1831)	México	Terpenos	3,5,5-trimetil-2-ciclopenten-1-ona, santolina trieno, triciclono, α -tujeno, α -pineno, canfeno, tuja-2,4(10)-dieno, β -pineno, 6-metil-5-hepteno-2-ona, mirceno, α -felandreno, δ -3-careno, <i>p</i> -menta-1-eno, limoneno, 1,8-cineol, m-cimeno, γ -terpineno, <i>cis</i> -sabineno hidrato do, <i>trans</i> -óxido de linalol, óxido de α -pineno, crisantenona, α -camfolenal, <i>trans</i> -pinocarveol, <i>cis</i> -verbenol, <i>trans</i> -verbenol, pinocarvona, bomeol, <i>cis</i> -pinocanfona, terpineno-4-ol, <i>p</i> -cimeno-8-ol, α -terpineol, mirtenal, mirtenol, verbenona, <i>trans</i> -carveol, carvona, acetato de bornila, δ -elemeno, α -cubebeno, ciclosativo, α -copaeno, β -	CG/EM	Pino, et al., 2006; Torres-González, et al., 2016.
--	--------	-----------------	--	-------	--

burboneno, β -cubebeno, β -elemeno, β -cariofileno, *trans*- α -bergamoteno, α -humoleno, alo aromadendreno, γ -muroleno, biciclogermacreno, α -muroleno, β -bisaboleno, γ -cardineno, cubebol, δ -cardineno, β -vetiveno, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol, epóxido α -humuleno I, epóxido α -humuleno II, *epi*- α -cardinol, β -fencheno, stireno, benzaldeido, (*Z*)-ocimenona, *m*-cimeno, *trans*-isocarveol, acamfolenal, *m*-cimenena, *trans*-pinocamfona, *trans*-pulegol.

Hidrocarboneto

Heptadecano

M. (Melipona) subnitida (Ducke, 1910)

Fenólicos

6-*O*-*p*-coumaroil-D-galactopiranosse, 6-*O*-cinnamoil-1-*O*-*p*-coumaroil- β -D-glucopiranosse, 7-*O*-metil-naringenina, 7-*O*-metil-aromadendrina, 7,4'-di-*O*-metil-aromadendrina, 4'-*O*-metil-campferol, 3-*O*-metil quercetina, 5-

IV; Souza, et al., 2013; De CLAE/EM; 2015. Sousa, et al., 2015.

			<i>O</i> -metil aromadendrina A, 5- <i>O</i> -metil camferol, taninos hidrolisáveis, flavonoides		
		Terpenos	Triterpenos pentacíclicos livres		
<i>M. (Melikerria) interrupta</i> (Latreille, 1811)	Brasil	Fenólicos	Narigenina, aromadendrina, 4'- <i>O</i> - β -D-glucopiranosideo de narigenina 3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosideo de miricetina.	CLAE/EM; RMN	Silva, et al., 2013.
<i>M. (Michmelia) seminigra</i> (Friese, 1903)	Brasil	Fenólicos	N.i	Prospecção química	Silva, et al., 2013.
<i>M. (Melipona) orbigny</i> (Guérin, 1844)	Brasil	Ácidos aromáticos	Ácido benzoico	CG/EM	Campos, et al., 2014.
		Fenólicos	Ácido dihidrocinâmico, ácido cinâmico, benzil-fenil cafeatos de cadeia longa, ácido cumárico c-prenilado		
		Terpenos	Ácido diterpênico, triterpenos alcoólicos		
		Açúcares	N.i		

*Espécies de abelhas segundo o catálogo de abelhas Moure; CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas); CLAE-EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas); IV (Infra-vermelho); RMN (Ressonância Magnética Nuclear); N.i (Não identificado)

2.3 Atividades biológicas da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*

Um dos primeiros trabalhos relacionados com a atividade biológica da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona* foi ao final da década de noventa, por Kujungiev et al. (1999), demonstrando atividades antifúngica, antibacteriana e antiviral em amostras de geoprópolis de espécies de abelhas sem ferrão, *M. compressipes* e *M. quadrifasciata*.

Atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica em amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *M. favosa*, *M. scutellaris*, *M. marginata* e própolis de outras espécies de abelhas sem ferrão, foram demonstradas por Velikova et al. (2000 a), os quais associam as atividades biológicas da geoprópolis com a alta concentração de ácidos diterpênicos (Velikova, et al., 2000 b)

A atividade antimicrobiana também foi verificada por Fernandes Júnior et al. (2001) em geoprópolis de *M. scutellaris*, *Melipona sp* e *Melipona mandacaia* (*Melipona* (*Melipona*) *mandacaia* Smith), e em própolis de outras espécies de abelhas sem ferrão e por Duailibe et al. (2007) em geoprópolis de *M. fasciculata*.

Além da atividade antibacteriana da geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *M. compressipes* e própolis de outras espécies de abelhas sem ferrão, Manrique & Santana (2008) demonstraram também que esse produto de abelhas possui atividade antioxidante.

Farnesi et al. (2009) também verificaram a atividade antimicrobiana da geoprópolis de *M. quadrifasciata* e Libério et al. (2011) demonstraram em geoprópolis de *M. fasciculata*, além disso observaram que o produto não é tóxico e possui atividade imunomodulatória podendo ser utilizado em processos inflamatórios.

Da geoprópolis de *M. scutellaris* foi demonstrada atividades antinociceptiva e antiinflamatória por Franchin et al. (2012; 2013), atividades antimicrobiana e antiproliferativa por Cunha et al. (2013) e Da Cunha et al. (2016) e propriedades gastroprotetoras (RIBEIRO-JUNIOR, et al., 2015)

Cinegália et al. (2013) observaram que a geoprópolis de *M. fasciculata* apresenta atividade antitumoral *in vitro* para osteosarcoma canino.

Atividade antioxidante foi demonstrada por Souza et al. (2013) em geoprópolis de *M. subnitida*, por Silva et al. (2013), em geoprópolis de *M. interrupta* e *M. seminigra*, por Dutra et al. (2014) e Araújo et al. (2016) em geoprópolis de *M. fasciculata* e *M. scutellaris*, por Campos et al. (2014) e De Sousa et al. (2015), em geoprópolis de *M. orbignyi* e *M. subnitida* respectivamente que além da atividade antioxidante, também apresentam atividade antimicrobiana e citotóxica.

Araújo et al. (2015) observaram atividades antibacteriana, antitumoral e imunomodulatória em geoprópolis de *M. fasciculata*, enquanto que Bartolomeu et al. (2016) observaram que a geoprópolis combinada com a doxorubicina (medicamento antitumoral), potencializou o efeito da mesma e poderia ser utilizado em associação para o tratamento de câncer de laringe.

Os principais dados quanto às propriedades biológicas da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona* estão sumarizados na Tabela 2, e mostram que a atividade antimicrobiana, seguida da atividade antioxidante, são as mais pesquisadas. Também foram avaliadas as atividades antitumorais, antiinflamatória, antinociceptiva, antiproliferativa, citotóxica imunomodulatória e gastroprotetora.

Tabela 2. Dados da literatura sobre as atividades biológicas da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*

Espécies	Local de origem	Atividade biológica	Microorganismos/Células/ Teste	Referências
<i>M. (Melikerria) compressipes</i> (Fabricius, 1804)	Brasil/ Venezuela	Antimicrobiana Antioxidante	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Influenza aviário</i> ; <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Micrococcus luteus</i> KMnO4	Kujumgiev, et al., 1999 ; Duailibe, et al., 2007 ; Manrique & Santana, 2008.
<i>M. (Melipona) quadrifasciata</i> (Lepeletier, 1836)	Brasil/ Venezuela	Antimicrobiana Citotóxica Antioxidante	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Influenza aviário</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Artemia salina</i> KMnO4	Kujumgiev, et al., 1999; Velikova, et al., 2000 a,b; Manrique & Santana, 2008; Farnesi, et al., 2009.
<i>M. (Melipona) favosa</i> (Fabricius, 1798)	Brasil	Antimicrobiana Citotóxica	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Artemia salina</i>	Velikova, et al., 2000 a.
<i>M. (Eomelipona) marginata</i> (Lepeletier, 1836)	Brasil	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i>	Velikova, et al., 2000 a.

			<i>albicans</i>
		Citotóxica	<i>Artemia salina</i>
<i>M. (Melipona) mandacaia</i> (Smith, 1863)		Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , Fernandes Jr., et al., <i>Enterococcus sp e</i> 2001. <i>Escherichia coli</i>
<i>Melipona sp.</i>		Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , Fernandes Jr., et al., <i>Enterococcus sp e</i> 2001. <i>Escherichia coli</i>
<i>M. (Michmelia) scutellaris</i> (Latreille, 1811)	Brasil	Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , Velikova, et al., 2000 a; <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida</i> Fernandes Jr., et al., <i>albicans</i> , <i>Enterococcus sp</i> , 2001; Franchin, et al., <i>Streptococcus mutans</i> 2012;2013; Cunha, et al., Citotóxica <i>Artemia salina</i> 2013; Araújo, et al., Antioxidante DPPH 2016. Da Cunha, et al., Antinociceptiva 2016. Antiinflamatória Antiproliferativa Células tumorais (glioma, melanoma, de mama, ovário multirresistente, rim, pulmão, próstata, ovário, colón) Gastroprotetora Indometacina (indutor de úlceras)

<i>M. (Melikerria) fasciculata</i> (Smith, 1854)	Brasil	Antimicrobiana	<i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Libério, et al., 2011; Cinegália, et al., 2013; Dutra, et al., 2014; Araújo, et al., 2015;
		Antitumoral	Células de osteosarcoma canino, células HEp-2	Bartolomeu, et al., 2016.
		Imunomodulatória	Células mononucleares	
		Antioxidante	DPPH, FRAP, ABTS	
<i>M. (Melipona) subnitida</i> (Ducke, 1910)	Brasil	Antioxidante	DPPH, ABTS, β -caroteno/ácido linoleico	Souza, et al., 2013
<i>M. (Melikerria) interrupta</i> (Latreille, 1811)	Brasil	Antioxidante	DPPH	Silva, et al., 2013.
<i>M. (Michmelia) seminigra</i> (Friese, 1903)	Brasil	Antioxidante	DPPH	Silva, et al., 2013.
<i>M. (Melipona) orbigny</i> (Guérin, 1844)	Brasil	Antimicrobiana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	Campos, et al., 2014.
		Antioxidante	DPPH, células eritrocitárias humanas (hemólise e lipídeo peroxidação)	
		Citotóxica	Células eritroleucemia K562	
<i>M. (Melipona) subnitida</i> (Ducke, 1910)		Antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> ,	

	<i>Salmonella Typhimurium e</i>
	<i>Escherichia coli</i>
Antioxidante	DPPH
Citotóxica	<i>Artemia salina</i>

KMnO₄ (permanganato de potássio); DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl); FRAP (ferric reducing antioxidant power); ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); Carcinoma epidermóide humano de laringe (HEp-2)

Com base nos dados das tabelas 1 e 2, podemos observar que estudos com espécies do gênero *Melipona* tem crescido nos últimos anos, principalmente pesquisas científicas com espécies de abelhas sem ferrão brasileiras, já que o país é uma das principais regiões onde ocorre o predomínio dessas espécies.

A composição química da geoprópolis produzida por estas espécies de abelhas, pode variar de acordo com as fontes vegetais utilizadas pelas abelhas, no entanto algumas classes de compostos são predominantes como compostos fenólicos e terpenos, além disso, a composição pode estar relacionada com as atividades biológicas da geoprópolis. O conhecimento sobre a origem geográfica e, principalmente as principais espécies vegetais utilizadas pelas abelhas, são importantes no controle de qualidade e na padronização das amostras de geoprópolis para uma efetiva aplicação terapêutica.

2.4 Patentes de produtos com geoprópolis do gênero *Melipona*

Patentes com geoprópolis de espécies do gênero *Melipona* são escassas, apesar de as pesquisas científicas terem crescido nos últimos anos. Os pesquisadores ainda não se atentaram para a importância da proteção tecnológica desses produtos com atividades biológicas promissoras que podem gerar bioprodutos.

Foram encontradas três patentes em pesquisa realizada na base de dados de patentes nacionais e internacionais, no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), o primeiro registro de pedido de patente com geoprópolis refere-se, à obtenção de um produto para uso tópico, para ser utilizado no controle de bactérias cariogênicas requerido por Libério et al. (2009) intitulado como “Composições farmacêuticas e odontológicas a base de geoprópolis e uso dessas composições” (PI 0905583-5 A2), publicada em 23/08/2011, o segundo pedido de patente refere-se à obtenção de formulações farmacêuticas com ação cicatrizante, antiinflamatória e analgésica requerido por Costa et al. (2011), intitulado de “Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) para preparação de Formulações farmacêuticas de ação analgésica, antiinflamatória e cicatrizante” (PI 1102701-0 A2) publicada em 03/07/2012 e o terceiro pedido de patente refere-se à obtenção de formulações com extratos e fração da geoprópolis com atividade leishmanicida, requerido por Dutra et al. (2011), intitulado “ Processo de obtenção, formulação de extratos padronizados, fração e substancias isoladas da geoprópolis brasileira da abelha sem ferrão e seu uso como agente leishmanicida” (PI1103291-0).

Ressalta-se que parte dos resultados desta tese gerou uma patente com a geoprópolis de *Melipona fasciculata* e atividade anti-helmítica a qual foi depositada em

fevereiro deste ano com o número (BR 10 2016 002463 3) intitulada: “Formulação farmacêutica anti-helmíntica com o extrato seco da geoprópolis” tornando-se um capítulo desta tese.

2.5 Parasitos gastrointestinais em caprinos e ovinos – Fatores limitantes da caprinovinocultura

A caprinovinocultura no Nordeste brasileiro assume um papel relevante na economia do país por apresentar o maior rebanho, pelo aproveitamento dos seus produtos e subprodutos, com produção de alimentos de alto valor biológico como carne e leite, e venda de animais vivos, peles e esterco, favorecendo um aumento na renda familiar (CHAGAS, et al., 2007a).

Um dos principais fatores limitantes da caprinovinocultura são as parasitoses gastrointestinais que além de debilitar o animal, favorecem a instalação de outras patologias oportunistas que retardam o desenvolvimento, comprometem o rendimento do leite e da carne, diminuem a fertilidade e provocam elevadas perdas econômicas, principalmente para os pequenos criadores (PAIVA, et al., 2009; GOMES, et al., 2010).

Os surtos de nematodiose gastrointestinal ocorrem frequentemente no final do período chuvoso e início da estiagem, que no Brasil, corresponde aos meses de maio a agosto (COSTA, et al., 2009). O desenvolvimento de larvas ocorre em temperaturas variáveis de 10 a 36 °C e em clima quente e úmido (ZAJAC, 2006). Em estudos realizados nos estados do Ceará e Paraíba, foi observado que a contaminação dos caprinos ocorre com maior intensidade em meados do período chuvoso até o início do período seco, visto que nesse período as pastagens encontram-se altamente contaminadas por larvas infectantes (MELO, et al., 2003; CHAGAS, et al., 2007b)

Entre os helmintos que acometem os caprinos e ovinos estão aqueles pertencentes ao Filo Nematoda, que na grande maioria, são da família Trichostrongylidae, compreendendo espécies pertencentes aos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia*. São parasitos pequenos e capilariformes, apresentando ciclo de vida bastante semelhante entre os diferentes gêneros, envolvendo uma fase de vida livre ou fase pré-parasitária, no ambiente, e outra fase parasitária, no hospedeiro. Localizam-se no trato gastrointestinal dos pequenos ruminantes, mais especificamente no abomaso (considerado o estômago verdadeiro dos ruminantes) espécies do gênero *Haemonchus* e *Ostertagia* e no intestino delgado espécies do gênero *Trichostrongylus*, *Nematodirus* e *Cooperia* (UENO &

GONCALVES, 1998; CHAGAS, et al., 2007a; FALBO, et al., 2008; SILVA, 2008; COSTA, et al, 2009).

Os diferentes gêneros de trichostrongilídeos podem simultaneamente parasitar um mesmo animal e a prevalência de um ou mais gêneros sobre outros está diretamente relacionada com o clima da região, estação do ano, faixa etária do hospedeiro, sexo, genótipo, status fisiológico, nutrição e com o sistema de criação adotado (MCCLURE, 2000; VLASSOF, et al., 2001).

Da família Trichostrongylidae, destacam-se as espécies do gênero *Haemonchus* sp, visto que, além da sua alta prevalência no Brasil apresentam grande patogenicidade (AMARANTE, 2005). A espécie *H. contortus* é a espécie de alta prevalência em pequenos ruminantes no Brasil, é causador da hemoncose (AMARANTE, et al., 2004) e apresenta alto grau de hematofagismo resultando na incapacidade do hospedeiro de compensar as perdas de sangue. O animal infectado pode perder cerca de 0,05 mL de sangue por dia e em casos de infecções graves a perda chega a 200 mL de sangue diariamente (TAYLOR, et al., 2007).

2.6 *Haemonchus contortus* (Rudholphi 1803)

A produção e pesquisas com ovinos e caprinos tem crescido consideravelmente em todo o mundo. Os reduzidos índices de produtividade nos rebanhos de ovinos e caprinos são frequentemente associados às infecções por endoparasitas no Brasil, principalmente por *Haemonchus contortus*. Este parasita apresenta alta patogenicidade e elevada prevalência (MOLENTO, et al., 2004; BURKE, et al., 2007) sendo que as infecções agudas podem causar anemia severa, hipoproteinemia e morte em casos severos (KAPLAN, et al., 2004; COSTA, et al., 2007).

Classificado no filo Nematelminto, classe Nematoda, ordem Strongylida, superfamília Trichostrongyloidea, família Trichostrongylidae, subfamília Haemonchinae, gênero *Haemonchus*; espécie *Haemonchus contortus*, é um parasito que afeta principalmente caprinos e ovinos (GEORGE, 1998; ANDERSON, 2000).

Os parasitas adultos alojam-se no abomaso de pequenos ruminantes e apresentam período pré-patente da infecção de aproximadamente 28 dias. A fêmea realiza postura média de 5.000 ovos por dia, os quais são eliminados nas fezes (LE JAMBRE, 1995).

O ciclo evolutivo (Figura 2) desse gênero pode ser dividido em fase de vida livre e fase parasitária. A fase de vida livre inicia-se quando ovos blastomerados (Figura 3A) são eliminados nas fezes dos animais em condições favoráveis (18 a 26°C, e 80 a 100% de umidade). Em condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, os ovos evoluem para

ovos larvados (Figura 3B) em primeiro estágio de desenvolvimento larval (L₁). Após algumas horas, os ovos eclodem e liberam as larvas rabditóides. Livres, essas larvas prosseguem o desenvolvimento, passando pela fase L₂ e culminando com uma larva de terceiro estágio (L₃) que corresponde à fase infectante (OLIVEIRA, 2013).

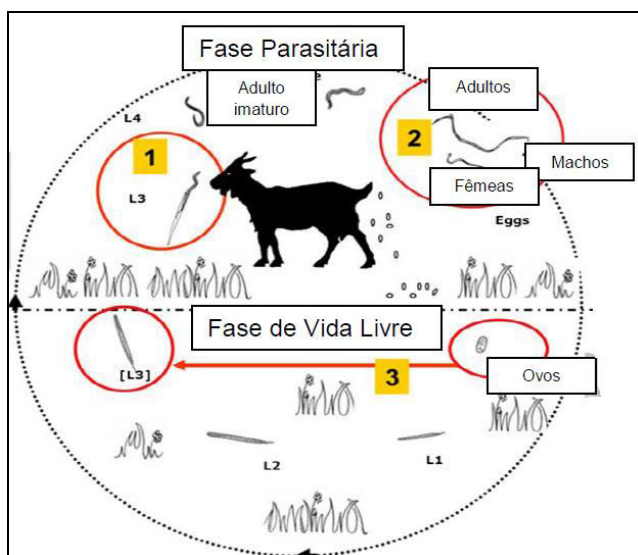


Figura 2. Ciclo de vida de *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. Fonte: Oliveira, 2014

A casca do ovo de *Haemonchus contortus* é constituída por três camadas básicas: uma camada interna composta basicamente por lipídios e proteínas, uma camada média quitinosa, constituída por fibrilas de quitina em associação com proteínas, que fornece certo grau de resistência à ação química e a camada externa vitelina lipoproteica. A eclosão de ovos é iniciada por estímulos ambientais que leva a liberação de enzimas de eclosão. Estas enzimas de eclosão são proteases, lípases, quitinases, α e β glicosidases e leucinas aminopeptidases presentes no fluido de eclosão dos ovos de *H. contortus* (MANSFIELD, et al., 1992).

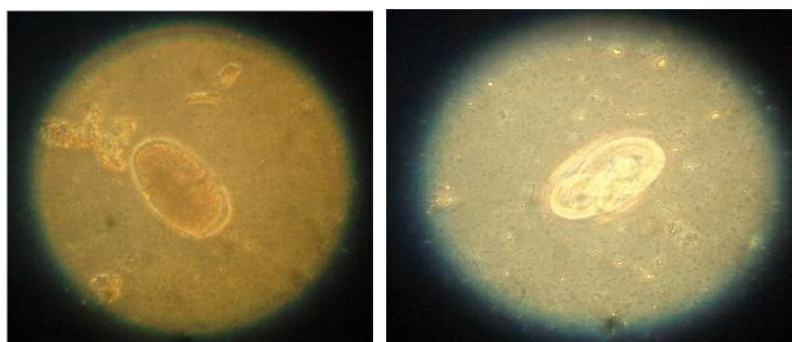


Figura 3. Ovos de *Haemonchus contortus* (visto em microscópio invertido com aumento de 200x) (A) ovo blastomerado, (B) ovo larvado. Fonte: OLIVEIRA, 2013

As larvas L_1 e L_2 (Figura 4A) apresentam esôfago rabditoide, alimentam-se no ambiente de microrganismos e assim, acumulam reservas nas células intestinais (grânulos lipídicos) (Figura 4B). Já a larva infectante L_3 (Figura 4C) apresenta esôfago filarióide e, necessariamente, se alimenta do sangue do hospedeiro. Além disso, a larva L_3 apresenta dupla cutícula rica em glicoproteínas, que tem função lubrificante, impedindo a abrasão entre as cutículas, a primeira cutícula mantida do estágio larvar L_2 e a segunda cutícula revestindo-a, essa dupla camada, garante proteção e resistência às intempéries ambientais, e quando no ambiente, não se alimenta, consumindo as reservas acumuladas nas células intestinais (figura 4), a sobrevivência desta larva pode variar de 1 a 18 meses, dependendo das condições climáticas da região em que se encontra (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008; OLIVEIRA, 2013).

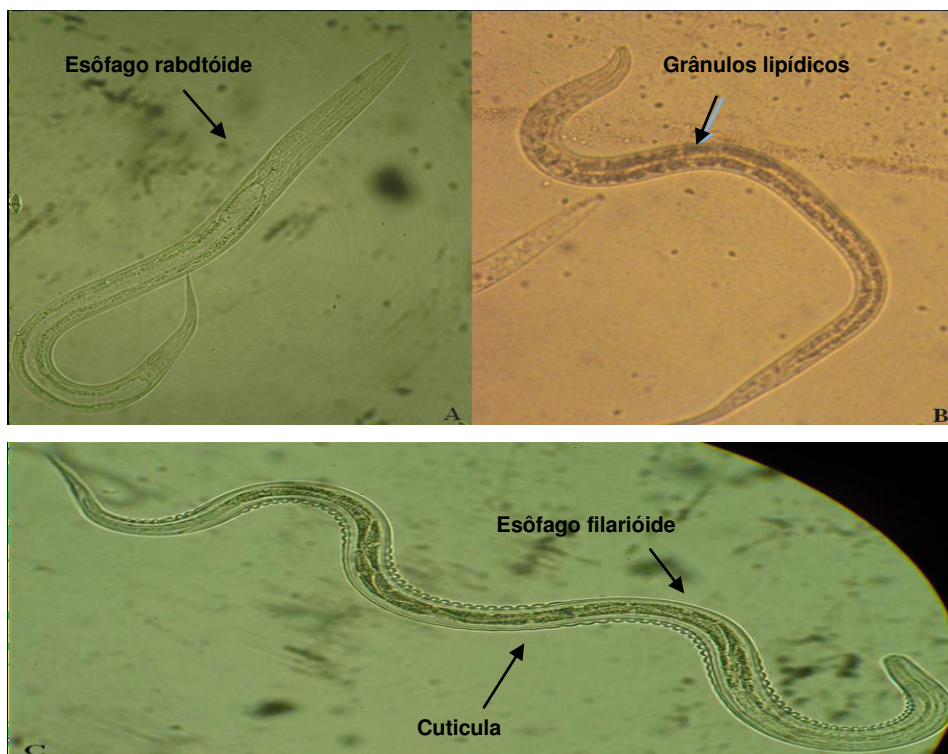


Figura 4. Estádios larvais de *Haemonchus contortus* (Aumento 400x). (A) Primeiro estágio (L_1): esôfago rabditoide. (B) Segundo estágio (L_2): acúmulo de grânulos lipídicos nas células da parede intestinal (seta). (C) Terceiro estágio (L_3): esôfago filarióide e cutícula. Fonte: CARVALHO, 2011.

Este ciclo é continuado quando o hospedeiro ingere a larva L_3 do ambiente, iniciando a fase parasitária. A partir dessa ingestão, as larvas são hematófagas e perdem sua cutícula externa. Ao alcançar o abomaso dos ruminantes, a L_3 penetra na mucosa e, em 48 horas, realiza muda para L_4 . A larva L_4 volta ao lúmen do abomaso, com lanceta bucal

desenvolvida e se fixa na parede do mesmo, com capacidade hematófaga. Em três dias ocorre a muda para o estágio L₅ e em seguida larvas adultas que se movem livremente na superfície da mucosa, culminando na maturação sexual das larvas, onde há a diferenciação entre macho e fêmea. Após 25 dias da infecção, já se tem ovos eliminados nas fezes (COYNE, et al., 1991; OLIVEIRA, 2013).

Macroscopicamente, os adultos podem ser identificados devido a sua localização específica no abomaso e seu tamanho, que varia de 1,1 a 2,7 cm de comprimento. Microscopicamente, o macho apresenta um lobo dorsal assimétrico e espículos em ganchos. Nas fêmeas, observam-se os ovários brancos enrolados em espiral ao redor do intestino repleto de sangue. A fêmea apresenta três tipos de processos vulvares, lisa, botão e linguiforme. Em ambos os sexos existem papilas cervicais e uma lanceta minúscula no interior da cápsula bucal. A relação do número de fêmeas com o número de machos adultos é em torno de 1:1, mas em infecções mais prolongadas, verifica-se que os espécimes machos são predominantes (MELO, 2005).

A infecção por *H. contortus* pode ocasionar a hemoncose que é caracterizada por anemia hemorrágica em função do hábito hematófago do parasito, por inoculação de substâncias anticoagulantes no abomaso onde se fixam, provocando grandes perdas de sangue, que é capaz de remover cerca de 0,05 mL de sangue diariamente por ingestão e extravasamento das lesões, causando alterações no abomaso, como edema da mucosa, submucosa e serosa, descamação das células epiteliais, ulceração e infiltração de leucócitos, com predominância de eosinófilos (SANTA ROSA, 1996; MACIEL, et al., 2014).

A intensidade da infecção e o aparecimento de sinais clínicos dependem de fatores como idade do animal, estado fisiológico, genética e exposição prévia ao parasito (AGUILAR-CABALLERO, et al., 2008). Estas infecções podem seguir diferentes cursos clínicos, variando de casos crônicos, em animais adultos com baixas cargas parasitárias, a casos agudos e frequentemente surtos fatais, em animais jovens ou sem contato prévio com o parasito (FOX, 1997; HOSTE, 2001).

Na hemoncose aguda, verifica-se anemia, hipoproteinemia, edema submandibular, ascite, letargia e fezes escuras, enquanto que a hemoncose crônica está associada à perda de peso progressiva e fraqueza (TAYLOR, et al., 2010).

Casos de diarreia não são comuns em infecções por *H. contortus*, porém a palidez das membranas mucosas, decorrente da anemia, é o sinal clínico mais comum e o diagnóstico de uma forma geral pode ser realizado pela observação dos sintomas, podendo ser realizados exames coprológicos, verificando a presença de ovos e larvas nas fezes. (BATH & VAN WYK, 2009; ENDO, et al., 2014).

2.7 Fármacos anti-helmínticos x resistência anti-helmíntica

O controle dos nematoides gastrointestinais é realizado através da utilização frequente de anti-helmínticos sintéticos (PAPADOPOULOS, 2008). Entretanto a eficácia destes compostos tem sido comprometida pela seleção de parasitos resistentes à maioria dos produtos disponíveis no mercado (CEZAR, et al., 2010).

Os antiparasitários utilizados em pequenos ruminantes podem ser de amplo ou pequeno espectro. Os anti-helmínticos de pequeno espectro são as salicilanilidas (closantel, radoxanida) e os nitrofenóis ou substituto fenólicos (niclofan e bitionol), organosfosforados (triclorvós e triclorfon) e os de amplo espectro são divididos em três principais grupos, os imidotiazóis (Levamisol), benzimidazóis (febendazol, albendazol, oxbendazol) e as lactonas macrocíclicas (avermectinas/mebemicina). O monepantel é um anti-helmíntico de amplo espectro, que pertence à classe de moléculas derivados de amino-acetonitrilo (ADDs), entretanto, seu uso possui limitações, tais como altos custos, resíduos nos alimentos e risco de poluição ambiental, sendo considerado um dos mais graves problemas à exploração racional de caprinos e ovinos (MELO, et al., 2003; STARLING, 2015)

A eficácia do tratamento anti-helmíntico depende de fatores como o grau de absorção do fármaco utilizado, intensidade da infecção, a possibilidade de reações alérgicas, o tempo de meia vida do fármaco no interior do organismo animal e outros efeitos secundários. A alternância nos quimioterápicos administrados ao rebanho diminui a possibilidade de resistência parasitária. Entretanto, à ausência de conhecimento relevante sobre dinâmica biológica e epidemiologia dos endoparasitas gastrintestinais associada ao custo dos insumos químicos contribui para que a maioria dos produtores não realize anualmente de forma racional a alternância dos grupos químicos (ZACHARIAS, et al., 2004; CEZAR, et al., 2008).

Segundo Torres-Acosta & Hoste (2008), a resistência anti-helmíntica pode ser definida como a habilidade de uma população de parasitos sobreviver frente a doses anti-helmínticas letais para populações susceptíveis. Diversos fatores podem ser responsáveis pelo surgimento da resistência anti-helmíntica, dentre eles cita-se a falha no controle parasitário uso intenso das drogas, subdoses medicamentosas e o uso contínuo do mesmo princípio ativo (SANGSTER, 2001; MELO, et al., 2003).

A falta de informação na maioria das bulas dos anti-helmínticos em relação a dose para caprinos levou os criadores a utilizarem a mesma dose dos ovinos em caprinos, no entanto a absorção e metabolização em caprinos é mais rápida que em ovinos e para obter a mesma eficácia é necessário que a dose seja superior, caso contrário será subdosagem, fator

que pode facilitar a resistência anti-helmíntica já que os parasitos são expostos a concentrações inferiores das drogas e por curtos períodos de tempo (BEVILAQUA, et al., 2015).

Segundo, Fortes et al. (2013) a seleção e o crescimento de populações resistentes aos grupos de anti-helmínticos, avermectinas, imidotiazóis e benzimidazóis, constituem um sério obstáculo a ovinocultura e o monitoramento de populações resistentes se tornam imprescindíveis, principalmente, nas decisões relacionadas ao controle parasitário no rebanho.

A resistência anti-helmíntica tem reduzido o controle efetivo dos nematoides gastrointestinais em pequenos ruminantes (VIEIRA, 2008), contribuindo para o aumento dos custos de produção, diminuição da produtividade e redução do número de produtos químicos eficazes para o controle destes parasitos (LIMA, et al., 2010).

No Brasil, essa resistência já foi detectada em vários Estados (SALGADO & SANTOS, 2016), como Ceará (MELO, et al., 2009), Alagoas (AHID, et al., 2007), Paraíba (RODRIGUES, et al., 2007; MELO, et al., 2013), Rio Grande do Sul (MATTOS, et al., 2000; CEZAR, et al., 2010), Rio de Janeiro (CRUZ, et al., 2010), São Paulo (ALMEIDA, et al., 2010), Mato Grosso do Sul (SCZESNY-MORAES, et al., 2010) e Bahia (BORGES, 2003; BARRETO, et al., 2005), Paraná (NOVA, et al., 2014) o que caracteriza uma disseminação da resistência em pequenos ruminantes no país.

2.8 Práticas de manejo para o controle anti-helmíntico

Métodos alternativos de controle de parasitoses, que não resultam em impacto ao animal e ao ambiente, estão sendo elaborados no intuito de desenvolver medidas de controle biológico, entretanto, enfrentam barreiras de custo/benefício, aplicabilidade e segurança na obtenção de resultados (CEZAR, et al., 2008).

Desta forma, na tentativa de minimizar a problemática da resistência anti-helmíntica e ao mesmo tempo controlar efetivamente estes parasitos, algumas alternativas de controle vêm sendo pesquisadas (PAPADOPOULOS, 2008), como o controle integrado nas pastagens através da rotação de piquetes ou do uso de diferentes espécies de animais no mesmo piquete, o tratamento de animais somente quando ocorrem sinais clínicos evidentes ou morte por parasitismo no rebanho (RIET-CORREA, et al., 2013).

O controle estratégico utilizando o método FAMACHA, o qual permite tratar seletivamente somente os animais altamente parasitados comparando-se a coloração da mucosa ocular com um cartão em cores, baseando-se na anemia resultante da ação hematófaga de *H. contortus*. Os animais que não forem tratados com o anti-helmíntico continuarão a eliminar ovos de nematoides, permitindo que haja persistência de uma

população de parasitas sensível no meio ambiente, mantém a eficácia anti-helmíntica por um período maior. Este sistema necessita, no entanto, ser validado em cada propriedade devido às diferenças na coloração da mucosa existente entre caprinos e ovinos, e também entre raças (SCHEUERLE, et al., 2010).

O método FAMACHA foi desenvolvido na África do Sul, por um grupo de pesquisadores, com o objetivo de se tornar uma ferramenta para a identificação e tratamento seletivo de ovinos parasitados por *H. contortus* (VAN WYK, 2001). Seu nome é uma homenagem ao pesquisador que originou a ideia: FA (Faffa) MA (Malan) CHA (Chart). E encontra-se entre os melhores indicadores de tratamento seletivo para rebanhos infectados pelo parasita *H. contortus* (BESIER, 2012). A utilização do método não gerou perdas produtivas quando comparado a métodos tradicionais em diferentes rebanhos e possui um custo relativamente baixo, sendo necessário apenas o treinamento de quem realizará as avaliações, e é possível identificar a necessidade de tratamento no momento da avaliação do animal (MAHIEU, et al., 2007; MOLENTO, et al., 2009).

O controle biológico através da utilização de fungos nematófagos presentes no meio ambiente, que atuam diretamente nas fezes controlando os estádios de vida livre, como ovos e larvas de helmintos, favorecem a redução da contaminação ambiental com estes parasitos. Alguns fungos como, *Pochonia chlamydosporia* têm apresentado ação ovicida *in vitro* sobre ovos de *Toxocora canis* (FRASSY, et al., 2010) e *Candelabrella musiformis*, que também demonstrou ação *in vitro* sobre nematoides gastrointestinais de caprinos e ovinos (SOTO-BARRIENTO, et al., 2011) e o fungo *Duddingtonia flagrans*. (HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011, TORRES-ACOSTA, et al., 2012).

Proteínas antigênicas de excreção/secreção de larvas de nematoides vêm sendo utilizadas para desenvolver vacinas capazes de induzir imunidade e consequentemente, proteger os animais contra infecção com helmintos (MCCLURE, 2009). No entanto, ainda não existem vacinas comercialmente viáveis (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008; FITZPATRICK, 2013).

Pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina contra *H. contortus* vem sendo realizadas desde os anos 80 e foram identificados antígenos capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro (KNOX, et al., 2003; SMITH & ZARLENGA, 2006; FITZPATRICK, 2013). A Austrália, nos próximos anos, pode vir a se tornar o primeiro país em que esta opção de tratamento esteja comercialmente disponível; entretanto, segundo Fitzpatrick (2013), serão necessárias cinco doses para imunização dos animais durante a época em que *H. contortus* seja o parasito mais prevalente.

A redução do número de nematoides e eliminação de ovos fecais, com consequente redução da contaminação das pastagens, tem sido possível através da seleção genética de animais dentro de uma determinada raça. Entretanto, melhoria na resistência sobre nematoides ocorre apenas após a seleção de várias gerações (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008).

A suplementação com proteínas e minerais podem ser alternativas de controle de verminoses, pois os animais apresentarão resposta imunológica mais eficiente, importante na sua proteção contra endoparasitas (LOUVANDINI, et al., 2015)

Nesse contexto surge também o controle integrado com o uso de produtos naturais dentre estes os fitoterápicos, apresentando como vantagens: suprimento sustentável, baixo custo, biodegradabilidade, grande possibilidade de utilização da biodiversidade da flora nacional, além da fácil aceitação pela população. Contribui aumentando os lucros da criação, uma vez que pode reduzir o uso de anti-helmínticos convencionais, além de estender a vida útil dos produtos químicos disponíveis e com a vantagem de reduzir ou evitar a contaminação dos produtos de origem animal com resíduos de antiparasitários convencionais, o que constitui preocupações de saúde pública (CHAGAS, 2004; TIRABASSI, et al., 2013).

Os estudos com extratos de plantas, de uma forma geral, concentram-se em identificar as propriedades anti-helmínticas e testar a toxicidade dos compostos *in vitro*, identificar mecanismos de ação, avaliar eficiência do composto *in vivo* e por fim avaliar a viabilidade em propriedades rurais (GITHIORI, et al., 2006; HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011).

2.9 Testes anti-helmínticos *in vitro*

Vários estudos *in vitro* e com menor frequência *in vivo*, têm sido desenvolvidos com o objetivo de confirmar a atividade anti-helmíntica de extratos de plantas, sendo que uma grande gama de famílias botânicas pode ser considerada como potenciais princípios ativos a serem estudados (AKHATAR, et al., 2000; WALLER, et al., 2001; STEPEK, et al., 2004; BEHENKE, et al., 2008; BURKE, et al., 2009; MUIR, 2011).

Os testes *in vitro* mais utilizados são o teste de eclodibilidade de ovos (TEO) (COLES, et al., 1992) e o teste de desenvolvimento larvar (TDL) (HUBERT & KERBOEUF, 1992). Testes de inibição de migração larvar (TIML) (WAGLAND, et al., 1992; RABEL, et al., 1994) e de motilidade de vermes adultos (TMVA) (HOUNZANGBE-ADOTE, et al., 2005). Estes quatro testes são baseados na hipótese de que a atividade nematicida observada *in vitro* indica potencial atividade *in vivo* (MARIE-MAGDELEINE, et al., 2009).

As principais vantagens destes estudos *in vitro* para testar as propriedades anti-helmínticas desses produtos são o baixo custo, rapidez dos resultados e possibilidade de se fazer screenings e avaliar substâncias isoladas sem interferência de outros compostos (GITHIORI, et al., 2006).

2.10 Fitoconstituintes com atividade anti-helmíntica

Varios metabólitos secundários têm sido identificados com atividade anti-helmíntica: saponinas, alcaloides, proteínas, taninos, lignina e outros polifenóis, além de glicosídeos (GITHIORI, et al., 2006; HOSTE & TORRES-ACOSTA, 2011, RIOS-DE-ÁLVAREZ, et al., 2012).

Dentre esses metabólitos os taninos são conhecidos por apresentarem atividade anti-helmíntica, desta forma, inúmeras plantas taníferas têm sido investigadas quanto a seu uso no tratamento da parasitose em ovinos e caprinos (COSTA et al., 2008; VILLALBA, et al., 2010; KATIKI, et al., 2013; WILLIAMS, et al., 2014). Entretanto, apesar de apresentar ação anti-helmíntica os taninos são também conhecidos por sua ação tóxica quando administrados em grandes quantidades em ruminantes, devido à sua capacidade de complexar proteínas (MONTEIRO, et al., 2005; OLIVEIRA, 2011; OKUDA & ITO, 2011).

A capacidade dos taninos de se ligarem a algumas proteínas, segundo Hoste & Torres-Acosta (2011), em ruminantes ocorre com proteínas relativamente grandes e hidrofóbicas, que têm uma estrutura aberta, flexível e são ricas em prolina (BAXTER, et al., 1997). Em menor extensão podem complexar com íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos (MAKKAR, et al., 2007), outros mecanismos conhecidos são fosforilação oxidativa e atividade antioxidante (KATIKI, et al., 2013; ENGSTRÖM, et al., 2016).

Os taninos são classificados em taninos hidrolisáveis (TH) e taninos condensados (TC), conforme sua estrutura molecular (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011). Os TH normalmente estão presentes em baixas concentrações nas plantas e podem sofrer facilmente hidrólise por bases, ácidos e esterases. Quimicamente, são polímeros constituídos por um carboidrato central, como a D-glucose, com os grupos hidroxila esterificados pelo ácido gálico ou elágico (MIN, et al., 2003). Dependendo da concentração ingerida, nos ruminantes, os TH podem ser degradados pelos micro-organismos ruminais e originar compostos potencialmente tóxicos. Provavelmente, a toxicidade é causada pela absorção dos produtos da degradação e alta concentração de fenóis no sangue, que é maior do que a capacidade de detoxificação do fígado (MAKKAR, et al., 2007).

Poucos estudos têm demonstrado a atividade anti-helmíntica de taninos hidrolisáveis, e a capacidade destes compostos para precipitar proteínas (KATIKI, et al., 2013; ENGSTRÖM, et al., 2016).

Os taninos hidrolisáveis afetam a atividade anti-helmíntica de acordo com o tamanho molecular, a flexibilidade, os tipos e grupos funcionais, e existem três possibilidades para afetar ovos e larvas, sendo a capacidade de precipitação com proteínas, através de interações não covalentes ou covalentes; atividade oxidativa, produtos de oxidação que ligam-se covalentemente aos ovos e as larvas e por hidrólise, que resulta na geração de produtos de hidrólise que interagem com ovos e larvas (ENGSTRÖM, et al., 2016).

Os TC ou proantocianidinas são os taninos mais comumente encontrados em leguminosas forrageiras, árvores e arbustos (MIN, et al., 2003). Estruturalmente, são polímeros formados por unidades de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol unidas por ligações carbono-carbono, não suscetíveis à degradação enzimática. Os taninos condensados podem ser classificados de acordo com a presença de OH na posição C-3 do anel B em prodelfinidina ou na ausência desta OH em procianidina. Portanto, são relativamente estáveis no trato digestório dos ruminantes e raramente tóxicos. O comprimento da cadeia dos TC pode variar desde dímeros até polímeros com mais de 20 unidades de flavanol e normalmente existem diversas estruturas de flavan-3-ol dentro de cada polímero. (WAGHORN, 2008).

As características estruturais dos taninos condensados estão envolvidas em seus efeitos anti-helmínticos, como: tamanho da molécula, o tipo de subunidades de flavan-3-ol presença de OH na posição C-3 do anel B em prodelfinidina ou na ausência desta OH em procianidina, a estereoquímica do anel C em subunidades destes (*trans* ou *cis* de flavan-3-ols) (COSTA, et al., 2008; QUIJADA, et al., 2015)

A atividade biológica é afetada pela hidroxilação no anel B em monômeros de flavan-3-ol e em polímeros, em que a presença de um grupo hidroxila adicional (OH) aumenta a interação com as proteínas. Isto poderia explicar o geralmente a atividade mais elevada de prodelfinidinas em comparação com as procianidinas. Além disso, a atividade também aumenta quando os grupos galloyl estão presentes (QUIJADA, et al., 2015)

Monômeros de taninos condensados, procianidinas, prodelfinidinas e seus derivados galloyl, foram responsáveis pela inibição da eclosão de ovos, desenvolvimento e paralisia larvar de *Trichostrongylus colubriformis* (MOLAN, et al., 2003).

A atividade anti-helmíntica dos taninos também está na dependência da espécie de parasita. Isso foi observado por Brunet & Hoste (2006) que ao testarem, *in vitro*, os monômeros de taninos condensados sobre o desbainhamento das larvas de terceiro estágio de *H. contortus* e *T. colubriformis* observaram diferença de susceptibilidade entre as espécies

testadas, além disso os monômeros de prodelfinidinas foram mais potentes que procianidinas na inibição do desembainhamento larvar.

O efeito dos taninos em se ligar com proteínas, provocam ações diretas sobre e a cutícula do parasito (região bucal e vulva de fêmeas, entre outras) provocando alterações em sua arquitetura, quadros degenerativos na musculatura e em células intestinais (BRUNET, et al., 2011).

Em consequência a estas lesões, pode haver redução da motilidade do indivíduo, em virtude de alterações metabólicas advindas de quebras estruturais da cutícula. A nutrição do parasito pode ser afetada em decorrência das alterações na extremidade anterior, também ocorrendo prejuízos na liberação de ovos em fêmeas que tenham seu apêndice reprodutivo desestruturado (HOSTE, et al., 2012).

Vários compostos fenólicos simples, incluindo ácidos gálico, elágico e cafeico, flavonóides, também são conhecidos por exercer ação anti-helmíntica (MONDAL, et al., 2015).

Propriedades anti-helmínticas também tem sido atribuída aos flavonoides. A isoflavona genisteína, extraída de *Flemingia vestia*, causou paralisia e danos ao tegumento de *Fasciolopsis buski*, trematódeo de suínos. Este efeito tem sido relacionado com a redução dos teores de alguns aminoácidos livres, aumento nos níveis de ácido glutâmico, citrulina, ácido gama aminobutírico (GABA), amônia e óxido nítrico deste parasito (KAR, et al., 2004).

Flavonoides isolados da planta *Andira anthelmia*, biochanina A, genisteina, biochanina A 7-O- β -D-glucopiranoside, biochanina A 7-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6) β -D-glucopiranosideo e biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6) β -D-glucopiranosideo e catequina apresentaram atividade anti-helmíntica para *Aspicularis tetraptera* em ratos (SILVA, et al., 2008).

O estudo da ação de treze flavonoides sobre o nematoide *Caenorhabditis elegans*, revelou que os compostos apigenina e 5,7,3',4',5'-penta hidroxiflavona inibiram o crescimento larval deste parasito (YOON, et al., 2006).

Os efeitos dos flavonoides (rutina, flavona, naringenina, hesperetina, crisina e narigina) foram avaliados contra o nematoide *Brugia malayi*, parasito responsável pela filariose linfática humana. Nos testes, *in vitro*, esses compostos inibiram a motilidade de microfilárias e de fêmeas adultas, e reduziram a viabilidade de parasitos adultos (LAKSHMI, et al., 2010).

Os estudos *in vitro* com flavonoides glicosilados presentes na *Onobrychis viciifolia* revelaram efeito sobre larvas infectantes de *H. contortus*. Os compostos rutina, nicotiflorina e narcissina reduziram a migração de larvas (BARRAU, et al., 2005). Flavonas

isoladas de *Shepherdia argentea* também inibiram *in vitro* a motilidade de larvas de *H. contortus* (AYERS, et al., 2008).

Klongsiriwet et al. (2015) observaram o efeito sinérgico de flavonoides quercetina e luteolina com taninos condensados na inibição *in vitro* no processo de desembainhamento larvar de *H. contortus*.

Além dos compostos fenólicos, Rios-de-Álvarez et al. (2012) sugerem que as lectinas poderiam ter dois possíveis modos de ação contra *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*, um efeito anti-helmíntico direto sobre a fecundidade de nematóides e um efeito indireto por ativação da resposta imune local do hospedeiro.

Duas espécies de helmintos já podem ser diferenciadas entre si nas suas diferentes fases de desenvolvimento a partir da utilização de lectinas (HILLRICHS, et al., 2012) como ocorre em *Teladorsagia circumcincta* e *Haemonchus contortus*, isso devido a capacidade que as lectinas possuem em se ligar a açúcares localizados na superfície do parasito. Nesse sentido pode-se observar que a constituição química da cutícula em relação aos carboidratos de superfície pode variar entre espécies e que as lectinas podem evidenciar algum grau de seletividade de ligação, devendo esse fato ser levado em consideração no estudo dessas substâncias e suas implicações no controle parasitário. Além disso, algumas lectinas podem possuir propriedades inibidoras sobre ribossomos (WINK, 2008) impedindo a síntese protéica.

Salles et al. (2014) também observaram que algumas proteínas vegetais, tais como lectinas, hemolisinas e proteases possuem efeito anti-helmíntico. Além disso proteases de cisteína, têm mostrado que estas enzimas podem atuar sobre a cutícula dos parasitos, causando danos e conduzindo à morte destes (PHIRI, et al., 2013; LUOGA, et al., 2015).

Os níveis elevados de protease e quitinase em extratos proteicos podem afetar a eclodibilidade de ovos de *H. contortus*. Acredita-se que o mecanismo ativo pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento da nematoide e, por conseguinte, as diferenças de cutícula e de proteínas entre os ovos e as larvas. (SOARES, et al., 2015).

Os efeitos antiparasitário de saponinas extraídas de plantas têm sido descritas (DOLIGALSKA, et al., 2011). As saponinas são constituídas por um núcleo lipofílico (esteroidal ou triterpênico) ligado a uma ou mais cadeias de carboidratos hidrossolúveis, e apresentam ação detergente e emulsificante. As atividades biológicas das saponinas estão relacionadas com sua capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolípídeos das membranas, o que pode levar a desestabilização das membranas e consequente aumento da permeabilidade celular (SCHENKEL, et al., 2010).

No ambiente intestinal de mamíferos, expostos ao contato com saponinas processos de absorção de moléculas são prejudicados e transporte de açúcares inibidos (ACAMOVIC & BROOKER, 2005)

As saponinas esteroidais obtidas de *Balanites aegyptiaca* apresentaram efeito *in vitro* sobre o nematoide de vida livre, *Caenorhabditis elegans* (GNOULA, et al., 2007). As saponinas, tribulosina e β -sitosterol-D-glicosídeo presentes em *Tribulus terrestris*, também mostraram eficácia contra *C. elegans* (DEEPAK, et al., 2002).

O efeito anti-helmíntico de saponinas esteroidais (polyphyllin D e dioscina) isoladas de *Paris polyphylla* foi verificado em ensaio *in vivo* utilizando peixe dourado parasitado com *Dactylogyrus intermedius*. A maior atividade para a dioscina pode estar relacionada às diferenças nas cadeias de açúcar entre os compostos. Este efeito foi associado a alterações na permeabilidade das membranas causada pelas saponinas, levando a vacuolização e desintegração do tegumento dos parasitos (WANG, et al., 2010).

Os estudos com saponinas triterpênicas, contendo como aglicona o ácido oleanóico, de *Calendula officinalis* e de *Beta vulgaris* evidenciaram a inibição da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar e alterações na morfologia de larvas de *Heligmosomoides bakeri*, nematoide tricostrongilídeo encontrado no intestino de ratos. Inibição da função da glicoproteína *p* também foi detectada nos estádios de vida livre do parasito, que possivelmente corresponde ao mecanismo de ação destas saponinas sobre helmintos (DOLIGALSKA et al., 2011). Outros trabalhos também demonstraram interação de saponinas com proteínas, como albumina sérica humana e caseína (POTTER, et al., 1993; LIU, et al., 2003).

A presença de saponinas em extratos de diferentes plantas como *Cucurbita moschata*, *Hedera helix* e *Combretum molle* tem sido relacionada com seus efeitos anti-helmíntico sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos (EGUALE, et al., 2007; AL-SHAIBANI, et al., 2008; MARIE-MAGDELEINE, et al., 2009; ADEMOLA & ELOFF, 2010).

Os efeitos de saponinas de *Pulsatilla chinensis* contra *Schistosoma japonicum* em diferentes estágios de desenvolvimento *in vitro* demonstraram que as saponinas podem, eventualmente, ter um potencial terapêutico no tratamento ou prevenção de infecção por *S. japonicum* e deverá tornar-se uma nova droga anti-schistosomose (CHEN, et al., 2013)

Representantes de outras classes de metabólitos secundários também tiveram suas atividades anti-helmínticas demonstradas. Vasconcelos (2006) observou a atividade anti-helmíntica dos óleos de *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* de seus principais constituintes,

anetol e timol (terpenos), a partir de testes de inibição da eclodibilidade e de desenvolvimento larval em *Haemonchus contortus*.

A investigação de óleos essenciais para o tratamento de parasitoses gastrointestinais é crescente havendo relatos de susceptibilidade de *Haemonchus contortus* aos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Croton zehntneri*, *Lippia sidoides*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus*, *Mentha piperita*, *Citrus sinensis* e *Melaleuca quinquenervia* os quais obtiveram concentrações capazes de inibir a eclodibilidade de ovos e do desenvolvimento larvar e os principais responsáveis pela atividade anti-helmíntica são os terpenos (PESSOA, et al., 2002; CAMURÇA-VASCONCELOS, et al., 2007; MACEDO, et al., 2010; KATIKI, et al., 2011; CARVALHO, et al., 2012; GAÍNZA, et al., 2015).

Efeitos promissores de terpenos em agentes parasitários têm sido relatados como no caso do citral, limoneno, geraniol. O citral é um composto formado pela mistura de duas substâncias denominadas geranial e neral e estudado como anti-helmíntico em larvas de terceiro estágio de *Anisakis simplex* (HIERRO, et al., 2006). O limoneno teve eficácia contra *Ascaridia galli* (ABDELQADER, et al., 2012). O geraniol possui relatos de atividades contra *Caenorhabditis elegans* (KUMARAN, et al., 2003).

Barbieri et al. (2014) avaliaram a atividade anti-helmíntica de constituintes de óleos essenciais, timol, cinamaldeído, carvona, carvacrol, anetol, linalol, vanilina, cineol, limoneno e eugenol, com o teste *in vitro* de inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* e observaram que o cinamaldeído apresentou melhor eficácia no controle da eclodibilidade, seguido de anetol, carvona, carvacrol e o timol, respectivamente. Já os menos eficientes foram, respectivamente, o limoneno e cineol.

Alcaloides também têm sido relatados com atividade anti-helmíntica, três alcalóides tetracíclicos foram nematotóxicos a duas espécies não identificada de nematoides de vida livre (ONDA, et al., 1965). Dados da literatura relacionam também atividades anti-helmínticas de alcaloides esteroidais contra *Panagrellus redivivus* (ALLEN & FELDMESSER), carbazol, duas quinolonas e nicotina contra *C. elegans*. (PERRETT & WHITFIELD, 1995; KUSSANO, et al., 2000; SRIVASTAVA, et al., 2000; SOBKOWIAK, et al., 2011), quinolina e alcaloides bromados contra *Haemonchus contortus* (NARKOWICZ, et al., 2002; AYERS, et al., 2007), paraherquamida oxindol contra *H. contortus* e *T. colubriformis* (BLANCHFLOWER, et al., 1991), o alcalóide pentacíclico aromático plaquiinidina contra *Nippostrongylus brasiliensis* (INMAN, et al., 1990), quinolona contra *Teladorsagia circumcincta* (PERRETT & WHITFIELD, 1995) e alcalóides isoquinolínicos contra duas espécies de *Strongyloides* (SATOU et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar da composição química, atividade antioxidante e anti-helmíntica *in vitro* da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do Estado do Maranhão contra *Haemonchus contortus* de pequenos ruminantes.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a composição química da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de diferentes regiões fitogeográficas do estado do Maranhão;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos e frações da geoprópolis;
- Avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* do extrato hidroalcoólico e frações da geoprópolis;
- Identificar substâncias bioativas anti-helmínticas da geoprópolis.

4. JUSTIFICATIVA

O grupo de produtos naturais da Universidade Federal do Maranhão há alguns anos vem estudando as propriedades biológicas e a composição química da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, visando agregar valor econômico a este produto, dentre as atividades biológicas já analisadas como antimicrobiana, antitumoral, citotóxica, antiproliferativa, antinociceptiva, leishmanicida e antioxidante havendo predomínio de algumas classes de compostos químicos, principalmente compostos fenólicos e terpenos que podem estar relacionados com as propriedades biológicas.

Nesse contexto, mais estudos químicos e biológicos são importantes para demonstrar a eficácia desse produto natural promissor, e quais compostos podem estar relacionados com tais atividades. Neste trabalho avaliou-se a atividade anti-helmíntica da geoprópolis de *M. fasciculata*, pois o uso descontrolado de fármacos anti-helmínticos vem ocasionando um aumento da resistência dos helmintos aos fármacos, e pesquisadores vem estudando maneiras alternativas de controle principalmente com produtos naturais que tenham eficácia anti-helmíntica, assim a geoprópolis pode ser uma alternativa nesse controle. No entanto, dados da literatura sobre atividade anti-helmíntica da geoprópolis são escassos.

Considerando que a tíuba é uma espécie de abelha bem disseminada no Estado do Maranhão e diante dos problemas com o uso de anti-helmínticos no controle das parasitoses em pequenos ruminantes e que tanto a meliponicultura como a caprinovicultura fazem parte dos arranjos produtivos dos estados do Norte e Nordeste, tais atividades são relevantes para a economia dos Estados, à medida que, a produção de caprinos e ovinos e o cultivo de abelhas sem ferrão, constituem alternativas na oferta de carne, leite, mel, geoprópolis e derivados, tornando-se atividades rentáveis.

Assim, propomos estudos químicos e biológicos com a geoprópolis maranhense de *Melipona fasciculata* com o objetivo de avaliar sua atividade anti-helmíntica, antioxidante e identificar sua composição química, contribuindo com dados científicos para a elaboração de produtos a base da geoprópolis com ação anti-helmíntica, que possam no futuro substituir os fármacos sintéticos com mais eficácia e segurança.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em 3 capítulos, o primeiro capítulo refere-se à composição química da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de duas regiões fitogeográficas do estado do Maranhão, desmonstrando predominância das classes de compostos presentes, além da avaliação da atividade antioxidante que está relacionada com a composição química e as fontes botânicas utilizadas pelas abelhas para coleta de resinas e formação da geoprópolis. O segundo capítulo trata-se de um deposito de patente com a obtenção de um produto com o extrato seco geoprópolis e sua atividade anti-helmíntica e o terceiro capítulo, refere-se à atividade anti-helmíntica da geoprópolis, fracionamento biomonitorado e identificação dos constituintes das frações mais ativas e a relação com a atividade antioxidante.

5.1 CAPÍTULO 1 – ARTIGO

Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil

Artigo aceito para publicação na revista Acta Amazônica

ISSN: 1809-4392

Marisa Cristina Aranha BATISTA¹; Bruno Vinicius de Barros ABREU¹; Richard Pereira DUTRA¹; Mayara Soares CUNHA¹; Flavia Maria Mendonça do AMARAL¹; Luce Maria Brandão TORRES²; Maria Nilce de Sousa RIBEIRO^{1*}

¹ Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Avenida dos Portugueses 1966, Campus Bacanga, 65080-805, São Luís- Maranhão, Brazil.

² Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Av. Miguel Stéfano 3687, Água Funda, 04301-9012, São Paulo, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: mnribeiro@ufma.br

Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil

Marisa Cristina Aranha BATISTA¹; Bruno Vinicius de Barros ABREU¹; Richard Pereira DUTRA¹; Mayara Soares CUNHA¹; Flavia Maria Mendonça do AMARAL¹; Luce Maria Brandão TORRES²; Maria Nilce de Sousa RIBEIRO^{1*}

¹ Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Avenida dos Portugueses 1966, Campus Bacanga, 65080-805, São Luis-Maranhão, Brazil.

² Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Av. Miguel Stéfano 3687, Água Funda, 04301-9012, São Paulo, São Paulo, Brazil

* Corresponding author: mnribeiro@ufma.br

ABSTRACT

Geopropolis, a mixture of plant resin, wax, soil and salivary secretion, is produced by the stingless bee *Melipona fasciculata*. This aim of this study was to investigate the chemical composition and antioxidant activity of geopropolis collected from beehives in two phytogeographical regions, flooded fields and cerrado, in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, Maranhão State, northeastern Brazil. The geopropolis compounds were identified by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). Additionally, total phenolic content was determined with the Folin–Ciocalteu reagent and antioxidant activity was evaluated *in vitro* by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The four geopropolis samples varied in terms of total phenolic content and antioxidant activity and the highest values were observed for geopropolis from Fernando Falcão. Triterpenes such as cycloartane, ursane and oleanane and phenolic acids (protocatechuic acid and gallic acid) were identified in the geopropolis from Palmeirândia, while the phenolic acids, gallic and ellagic acid were the main compounds in geopropolis from Fernando Falcão. The antioxidant property of geopropolis is due to its high total phenolic content and predominance of gallic acid and ellagic acid. The results showed that the plant resources in two phytogeographical regions of Maranhão used by bees for the production of geopropolis contribute to the chemical composition and bioactivity of this product.

KEYWORDS: stingless bee, polyphenols, triterpenes, phytogeographical regions.

Composição química e atividade antioxidante da geoprópolis de *Melipona fasciculata* (Meliponinae) produzida em áreas de campos alagados e de cerrado no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil

RESUMO

Geoprópolis, uma mistura de resinas vegetais, cera, terra e secreção salivar, produzida pela abelha sem ferrão *Melipona fasciculata*. Este estudo investigou a composição química e a atividade antioxidante da geoprópolis coletada em colmeias em duas regiões fitogeográficas de campos alagados e de cerrado, nos municípios de Palmeirândia e Fernando Falcão, no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil. Os compostos da geoprópolis foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Foram determinados os teores de fenólicos totais pelo reagente de Folin–Ciocalteu, e atividade antioxidante utilizando o ensaio *in vitro* com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e capacidade redutora do ferro (FRAP). As quatro amostras de geoprópolis apresentaram variações no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, as geoprópolis de Fernando Falcão, apresentaram maiores teores. Nas geoprópolis do município de Palmeirândia foram identificados, triterpenos do tipo cicloartano, ursano e oleanano e ácidos fenólicos (ácido protocatecuico e ácido gálico), enquanto que na geoprópolis de Fernando Falcão, ácidos fenólicos, ácido gálico e elágico foram os principais constituintes. A propriedade antioxidante da geoprópolis pode ser atribuída aos altos teores de fenólicos totais e de ácido gálico e elágico. Os resultados demonstram que as fontes vegetais das duas regiões fitogeográficas do Maranhão, Brasil, utilizadas pelas abelhas para a produção da geoprópolis contribuem para a composição química e bioatividade deste produto.

PALAVRAS-CHAVE: abelhas sem ferrão, polifenóis, triterpenos, regiões fitogeográficas.

INTRODUCTION

Stingless bees are found in Tropical and Neotropical regions and play an important role in pollination and agriculture (Slaa *et al.* 2006). In Brazil, 244 stingless bee species have been identified mainly in the northern and northeastern regions of Brazil, corresponding to about 20% of all Neotropical species of stingless bees (Pedro 2014).

In the State of Maranhão (northeastern Brazil), *Melipona fasciculata* Smith, popularly known as tiuba, is the species most frequently cultivated for honey production by rural populations, especially in flooded fields and cerrado areas, because of its high economic value and the production of wax, pollen, and geopropolis. The last product has potential applications in the fields of chemistry and biology, but few studies have been conducted (Bezerra 2002; Bankova and Popova 2007; Holanda *et al.* 2012).

In the beehives, geopropolis is produced by bees from the resinous material of buds, leaves, and plant exudates, mixed with salivary secretions, wax, and soil. Geopropolis is used to protect beehives against insects and pathogenic microorganisms, to restrict entry into the hive, to line the interior walls of the hive, to strengthen the honeycombs, and embalm animals (Nogueira-Neto 1997).

Geopropolis and its subproducts are used by the population for the treatment of inflammatory diseases, fatigue, hemorrhoids, gastritis, and cough (Kerr 1987). Several studies have demonstrated the biological properties of geopropolis, such as antimicrobial, cytotoxic, antitumor, antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, immunomodulatory, and gastroprotective (Libério *et al.* 2011; Souza *et al.* 2014; Araújo *et al.* 2015).

The chemical composition of geopropolis is complex. It has been reported the presence of polyphenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, and tannins) (Silva *et al.* 2013; Souza *et al.* 2013; Dutra *et al.* 2014), terpenes (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, and triterpenes), fatty acids, steroids, and saponins (Dutra *et al.* 2008; Cunha *et al.* 2009; Araújo *et al.* 2015). However, its chemical composition varies according to the flora visited by stingless bees, the region, and the time of collection (Bankova 2009; Ribeiro *et al.* 2013; Barth and Freitas 2015).

In view of the scarcity of studies on the chemical composition and biological activity of *M. fasciculata* products in Brazil, the aim of this study was to investigate the chemical composition of geopropolis produced by *M. fasciculata* collected from beehives of two phytogeographical regions of Maranhão, and evaluate its antioxidant activity.

MATERIALS AND METHODS

Geopropolis samples

Four geopropolis samples: G1 (660.5 g), G2 (496.4 g), G3 (1519.0 g) and G4 (2534.8 g) were collected from meliponaries located in two phytogeographical regions of Maranhão State, northeastern Brazil. Samples G1 and G2 were collected in two beehives of the same meliponary in the municipality of Palmeirândia (2°40'80.3"S e 44°52'66.1"W). Palmeirândia is located in the region of periodically flooded fields (lowlands of the northern micro-region of Maranhão, northeastern Brazil) with the predominance of "castanha do Pará" (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.), "embaúba" (*Cecropia* sp.), "gameleira" (*Clusia burchellii* Engl.), "cedro" (*Cedrella fissilis* Vell.) and "babaçu" (*Orbignya phalerata* Mart.). During the rainy season, the lowlands are flooded, forming islands of dry land with occurrence of "buriti" (*Mauritia flexuosa* L.f.), "aninga" (*Montrichardia linifera* Schott), among others (Martins *et al.* 2011).

Samples G3 and G4 were collected from two beehives of the same meliponary in the municipality of Fernando Falcão (6°08'99.2"S e 44°54'99.4"W), region of cerrado of the southern micro-region of Maranhão, northeastern Brazil. This region is characterized by typical cerrado vegetation with species of great ecological and economic value, such as "barbatimão" (*Stryphnodendron barbatiman* M.), "gonçalave" (*Astronium graveolens* Jacq.), "mangabeira" (*Hancornia speciosa* Muell. Arg.), "piqui" (*Caryocar brasiliensis* Camb.), "fava d'anta" (*Dimorphandra gardneriana* L.), "candia" (*Platymenia reticulata* Benth.), "tamboril" (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong), "puça" (*Mouriri pusa* Gardn.), "sucupira" (*Bowdichia virgilioides* HBK.), "murici" (*Byrsonima crassifolia* HBK.), "cagaíta" (*Eugenia dysenterica* DC.) and "pau terra" (*Qualea grandiflora* Mart.) (Muniz 2002; Ribeiro *et al.* 2013).

Preparation of hydroalcoholic extracts of geopropolis (HEG)

The geopropolis samples (500 g) were separately macerated with 1:2 (w/v) in 70% ethanol for 48 h and filtered to separate the inorganic part (soil). The extractive solutions were concentrated in a rotating evaporator (Q344B2, Quimis, São Paulo, Brazil) to yield HEG (Dutra *et al.* 2014). The extracts were codified as HEG1 and HEG2 (geopropolis collected from Palmeirândia), and as HEG3 and HEG4 (geopropolis collected from Fernando Falcão).

Total phenolic content (TPC)

Total phenolic compounds were determined by the *Folin-Ciocalteu* reagent and 20% sodium carbonate method (Dutra *et al.* 2014). The reaction mixture was kept in the dark for 2 h at room temperature, and absorbance was measured at 760 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35,

Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, USA). TPC was expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of geopropolis extracts (mg GAE g⁻¹).

Determination of the antioxidant activity

DPPH radical scavenging activity

The antioxidant activity of geopropolis samples was evaluated using the *in vitro* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay (Dutra *et al.* 2014). The samples were diluted in methanol at different concentrations (1.0 to 100.0 µg mL⁻¹) and added to a methanol solution of DPPH (40.0 µg mL⁻¹). After 30 min of reaction at room temperature in the dark, the absorbance of each solution was read at 517 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35, Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, USA). Methanol was used as the control and DPPH solution was used as the blank. Standards of gallic acid and 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, Sigma) were treated under the same conditions as the samples. The percent inhibition was calculated according to equation.

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

where A_{sample} = absorbance of the sample after 30 min of reaction, and A_{control} = absorbance of the control. The percent of scavenging activity was plotted against the sample concentration to obtain the IC₅₀, defined as the concentration of sample necessary to cause 50% inhibition.

Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

The FRAP's method was used to determine the antioxidant activity based on iron reduction. FRAP measures the ferric-reducing ability of a sample in acid medium (pH 3.6), yielding an intense blue color attributable to the reduction of the ferric tripyridyltriazine (Fe^{III}-TPTZ) complex to the ferrous (Fe^{II}) form (Dutra *et al.* 2014). FRAP reagent was prepared immediately before analysis by mixing 25 mL of acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 2.5 mL of TPTZ solution (10 mM TPTZ in 40 mM HCl), and 2.5 mL of FeCl₃·6 H₂O (20 mM) in aqueous solution. Different concentrations of 100 µL of the samples (1 to 100 µg mL⁻¹) were added to 300 µL of distilled water and 3 mL of FRAP reagent, and the mixtures were incubated in a water bath at 37 °C for 30 min. The absorbance of the reaction mixture was read at 593 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35, Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, USA), with FRAP solution as a blank. The calibration curve was constructed using different concentrations of FeSO₄·7H₂O (100 to 2000 µM) ($r^2 = 0.9987$) and the results are expressed as millimole of Fe^{II} per gram of sample. Standards of gallic acid and Trolox (Sigma) were treated under the same conditions as the samples.

UV-Vis analysis of geopropolis extracts

The UV-Vis spectra was obtained for each extract (50 µL) in methanol (3 mL), and the absorption spectra was measured at the wavelength range of 200 to 450 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35, Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, USA).

Analysis of geopropolis extracts by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

To assess geopropolis chemical composition, 1 mg of dry HEGs was added of 300 µL of pyridine and 100 µL of bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) including 1% of trimethylchlorosilane (TMCS) in a sealed glass tube for 1 h at 80 °C to prepare samples for gas chromatography according to Campos *et al.* (2014). The analyses were carried by gas chromatograph and mass spectrometry (GC/MS), using an Agilent GC (6890 Series gas chromatography system; Agilent Technologies, California, USA) quadrupole mass-selective detector (MSD) system (5973, Agilent Technologies, California, USA), and capillary column fused silica HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness, 0.25 µm). The oven temperature was programmed to linearly increase from 70 °C to 310 °C at 5 °C min⁻¹, with 1 min heating at 310 °C and 60 min elution time. The system was balanced for 6 min at 70 °C before automatic injection of the subsequent sample. Injector temperature was 230 °C and detector temperature was 250 °C; an ion source at 200 °C, carrier Helium gas at 1.0 mL min⁻¹, constant pressure mode, injection volume 1 µL; split ratio 10:1. Electron-impact mass spectra (EI-MS; 70 eV) were acquired over the mass-to-charge ratios (m/z) range to 50 to 650 and a scan interval of 2 scan s⁻¹. The identification of geopropolis compounds was based on the percentage of similarity plus comparison of mass spectra (MS) using software NIST AMIDS version 2.0 data library, with the percentage of total ion chromatograms (TIC%). Gallic acid and ellagic acid, standards, were co-chromatographed and identified on the basis of the retention times (RT) and mass spectra (MS) fragmentation.

Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) and were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 software. Comparisons between groups were made using analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's test p value ≤ 0.05 and Pearson's correlation.

RESULTS

Total phenolic content ranged from 126.6 to 847.5 mg GAE g⁻¹ (Table 1), and antioxidant activity (expressed as IC₅₀ in µg mL⁻¹ and as mmol Fe^{II} g⁻¹) of the hydroalcoholic extracts

ranged from 4.24 to 44.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1.29 to 18.42 $\text{mmol Fe}^{\text{II}} \text{g}^{-1}$ (Table 1).

In the DPPH assay, HEG4 (IC_{50} value of 4.24 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and HEG3 (5.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$) had higher antioxidant activity than HEG1 and HEG2 (IC_{50} value of 19.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 44.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). The FRAP assay showed that HEG3 and HEG4 exhibited the best ferric-reducing property (13.59 and 18.42 $\text{mmol Fe}^{\text{II}} \text{g}^{-1}$, respectively), which was higher than that observed for Trolox. The correlations between the results of DPPH and FRAP assays and TPC are shown in Table 2.

A negative correlation was observed between DPPH and TPC (-0.878) and DPPH and FRAP (-0.836), in which a low IC_{50} value in the DPPH assays was correlated with a high TPC and a high FRAP value and vice versa. The correlation between TPC and FRAP was positive (0.843), indicating a high reducing power.

The UV spectra of the geopropolis extracts were also evaluated. All four extracts had absorption peak at λ_{max} at 268-275 nm, which was compatible with the presence of phenolic compounds.

Table 1. Total phenolic content (TPC) concentrations (mg GAE g^{-1}) and antioxidant activity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH (IC_{50} in $\mu\text{g mL}^{-1}$), and ferric reducing antioxidant power, FRAP (in $\text{mmol Fe}^{\text{II}} \text{g}^{-1}$), mean values (\pm standard deviation; $n = 3$) of the hydroalcoholic extract of geopropolis (HEG) in two phytogeographical regions, flooded fields and cerrado, in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, Maranhão State, northeastern Brazil. HEG1 and HEG2 are geopropolis collected at Palmeirândia; HEG3 and HEG4 are geopropolis collected at Fernando Falcão.

Extracts (HEG)	TPC (mg GAE g^{-1})	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FRAP ($\text{mmol Fe}^{\text{II}} \text{g}^{-1}$)
HEG1	212.30 \pm 0.290 a	19.05 \pm 0.012 a	1.78 \pm 0.007 a
HEG2	126.60 \pm 0.840 b	44.44 \pm 0.813 b	1.29 \pm 0.016 a,d
HEG3	847.50 \pm 0.040 c	5.92 \pm 0.120 c	13.59 \pm 0.430 b
HEG4	348.30 \pm 0.005 d	4.24 \pm 0.015 c	18.42 \pm 0.210 c
Gallic acid	-	1.83 \pm 0.030 d	0.73 \pm 0.040 d
Trolox	-	5.11 \pm 0.040 c	9.09 \pm 0.100 e

Different letters in the same column indicate a significant difference by Tukey test, $p < 0.05$.

Table 2. Pearson correlation coefficient between the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays and total phenolic content (TPC).

	DPPH	FRAP
TPC	-0.878	0.843
DPPH		-0.836
FRAP	-0.836	

The chromatograms obtained by GC/MS permitted the identification of a large number of compounds in the four geopropolis extracts (Table 3). HEG1 and HEG2 had a similar composition. Triterpenoids were the main compounds, including cycloartane- (cycloartenol, 5.39% and 4.12%), oleanane- (β -amyrin, 1.23% and 2.66%), and ursane-type triterpenoids (cycloursane, 1.62% and 0.83% and 3-oxo-urs-

Table 3. Chemical composition of the hydroalcoholic extract of geopropolis (HEG) in two phytogeographical regions, flooded fields and cerrado, in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, Maranhão State, northeastern Brazil, expressed in percentage of total ion chromatograms (TIC%). HEG1 and HEG2 are geopropolis collected at Palmeirândia; HEG3 and HEG4 are geopropolis collected at Fernando Falcão. Each value denotes the mean of three analyses.

Compound class	Chemical constituents	Extracts (HEG) TIC (%)			
		HEG1	HEG2	HEG3	HEG4
Fatty acids	Palmitic	0.16	0.12	0.52	1.05
	Stearic	0.46	0.39	1.53	3.44
	Linoleic	0.15	-	-	-
	Melissic	-	1.35	-	-
	Octenoic	-	0.14	-	-
Organic acids	Glycolic	-	0.01	-	-
	Gluconic	0.07	-	-	-
	Quinic	-	-	1.68	1.85
Sugars	Glucose	0.08	0.02	24.3	14.93
	Fructose	-	-	0.32	1.34
	Mannose	-	-	12.80	-
	Arabinose	0.15	-	0.13	1.24
	Galactose	0.22	0.04	-	-
	Fucose	0.13	-	-	-
	Sorbose	0.05	-	-	-
	Xylose	0.45	-	0.61	-
Alcohols	Ribose	0.12	-	-	-
	Aucubin	0.17	0.07	-	-
	Erythritol	0.25	0.14	-	0.28
	Arabitol	0.06	-	-	-
	Sorbitol	0.11	-	-	-
	Glycerol	-	-	0.22	0.27
	Xylitol	-	-	0.92	-
Phenolic acids	Inositol	-	-	0.10	0.45
	Protocatechuic	1.04	0.38	0.10	0.13
	Gallic	0.66	1.03	22.30	18.90
Triterpenes	Ellagic	-	-	14.70	13.60
	Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo	0.99	0.61	-	-
	β -Amyrin	1.23	2.66	-	-
	Unknown triterpene	1.26	1.65	-	-
	Cycloartenol	5.39	4.12	-	-
Steroids	Cycloursane	1.62	0.83	-	-
	Lanosterol	0.18	0.47	-	-
	Lanosterol acetate	0.02	-	-	-

12-en-24-oic acid, 0.99% and 0.61%, respectively). The extracts also contained steroids, the phenols protocatechuic acid (1.04% and 0.38%) and gallic acid (0.66% and 1.03%), fatty acids, and sugars.

The chemical composition of HEG3 and HEG4 did not contain triterpenoids or steroids, but had a high concentration of phenolic compounds such as gallic acid (22.3% and 18.9%, respectively) and ellagic acid (14.7% and 13.6%). These phenolic acids were identified and confirmed using an authentic standard based on mass-spectral fragmentation, total ion chromatograms (TIC%), and retention times (RT). Sugars, especially glucose (24.3% and 14.93%) and mannose (12.8%) were identified.

DISCUSSION

In the state of Maranhão, meliponiculture is predominant activity in flooded fields and cerrado areas, especially in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão where the geopropolis samples were collected.

HEG3 and HEG4 contain higher levels of polyphenols than HEG1 and HEG2; thus, the determination of total phenol content has become a standard test and is usually evaluated by Folin-Ciocalteu method (Sawaya *et al.* 2011). Our findings are in line with the results of studies conducted by Cunha *et al.* (2009) on geopropolis extracts from Palmeirândia, Maranhão State, by Dutra *et al.* (2014) on geopropolis from Fernando Falcão, Maranhão State, and by Silva *et al.* (2013) on geopropolis produced by the Amazonian species *M. interrupta* and *M. seminigra*.

Two different methods, the DPPH scavenging and FRAP metal ions, were used to determine the antioxidant properties of geopropolis, which allowed us to obtain information about the activity of these extracts during different stages of the oxidation reactions (Souza *et al.* 2013).

According to Campos *et al.* (2003), extracts and natural substances are considered active at $IC_{50} < 500 \mu\text{g mL}^{-1}$. In the DPPH and FRAP assays, all extracts exhibited significant *in vitro* antioxidant activity. The correlations between the results of the DPPH and FRAP assays and TPC suggest that total phenols were responsible for the antioxidant activity and are consistent with results of studies investigating geopropolis produced by *M. interrupta*, *M. seminigra*, *M. fasciculata*, and *M. subnitida* (Silva *et al.* 2013; Souza *et al.* 2013; Dutra *et al.* 2014; Souza *et al.* 2014). A high phenolic content is related to antioxidant activity and all extracts exhibited high levels of polyphenols (Table 1), as confirmed by GC/MS (Table 3).

Chromatographic methods are essential for the analysis of products that contain complex mixtures, permitting the identification and quantification of biologically active compounds (Sawaya *et al.* 2011; Righi *et al.* 2013).

Geopropolis is a complex mixture of chemical substances. Thus, all extracts were subjected to GC/MS for complete analysis. MS provides information of molecular mass and structural information, and thereby the identification of the components of a mixture.

The triterpenic compounds found in our study corroborate the findings by Araújo *et al.* (2015) who analyzed the chemical composition of geopropolis collected in Palmeirândia. Triterpenes have been identified in propolis and geopropolis produced by stingless bees in Brazil and Mexico (Bankova and Popova 2007).

Protocatechuic acid has been detected in propolis produced by the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Pereira *et al.* 2003) and in propolis (Kalogeropoulos *et al.* 2009) and pollen (Bonvchi *et al.* 2001) produced by *Apis mellifera*. However, there are no reports on the presence of this compound in geopropolis produced by *M. fasciculata*.

The chemical composition of HEG3 and HEG4 is similar, but differs from that of HEG1 and HEG2, as the former do not contain triterpenoids and steroids but exhibit high concentrations of phenolic compounds. Gallic acid and its derivatives have been identified in geopropolis and propolis of stingless bees in the Brazilian states of Maranhão (Dutra *et al.* 2014), Pernambuco, Paraná, São Paulo (Velikova *et al.* 2000), Piauí (Bankova *et al.* 1998) and Tocantins (Araújo *et al.* 2016).

HEG3 and HEG4 exhibited the highest *in vitro* antioxidant activities of the four extracts, suggesting a positive relationship between high levels of ellagic and gallic acids and antioxidant activity. Phenolic acids (gallic acid, ellagic acid, and protocatechuic acid) have been reported to be strong antioxidants (Kakkar and Bais 2014; Zhang *et al.* 2014).

The botanical sources used by stingless bees for the production of geopropolis can influence its chemical composition. Analysis of the geopropolis collected in Fernando Falcão suggests that the botanical sources are rich in phenolic compounds, particularly phenolic acids and hydrolyzable tannins found in HEG3 and HEG4, as it was also observed by Dutra *et al.* (2014).

It is noteworthy the presence of phenolic acids, triterpenoids, and steroids in geopropolis because it may predict the pharmacological properties of this natural product such as antimicrobial (Libério *et al.* 2011), antioxidant (Dutra *et al.* 2014), anticancer and immunomodulatory activities (Araújo *et al.* 2015).

CONCLUSIONS

The geopropolis collected in Palmeirândia contained triterpene compounds of the cycloartane, ursane, and oleanane type as the main compounds, in addition to phenolic acids, protocatechuic and gallic acid. In contrast,

geopropolis collected in Fernando Falcão contained high concentrations of phenolic acids (gallic acid and ellagic acid) and exhibited high antioxidant activity, suggesting that the high levels of phenolic acids are responsible for the antioxidant property of this geopropolis. The chemical composition and antioxidant activity contribute to the identity and quality of the types of geopropolis produced by *M. fasciculata* collected in two phytogeographical regions of the Maranhão State, northeastern Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Project No 925/2010), the National Council for Scientific and Technological Development (Project No. 554318/2010-5) and the Foundation for the Support of Research Scientific and Technological Development of the State of Maranhão (Project No. 00963/09) for financial support. Thanks to the beekeepers for donating the geopropolis samples.

REFERENCES

- Araújo, M.J.A.M.; Búfalo, M.C.; Conti, B.J.; Fernandes Junior, A.; Trusheva, B.; Bankova, V.; Sforcin, J.M. 2015. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *Journal of Molecular Pathophysiology*, 4: 12-20.
- Araújo, K.S.S.; Santos Júnior, J.F.; Sato, M.O.; Finco, E.D.B.A.; Soares, I.M.; Barbosa R.S.; Alvim, T.C.; Ascêncio, S.D.; Mariano, S.M.B. 2016. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amazonica*, 46: 61-68.
- Bankova, V.; Christov, R.; Marcucci, M.C.; Popov, S. 1998. Constituents of Brazilian geopropolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 53: 402-406.
- Bankova, V. 2009. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1: 23-28.
- Bankova, V.; Popova, M. 2007. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 88-92.
- Barth, O. M.; Freitas, A.S. 2015. Palynology as a tool to distinguish between propolis and geopropolis: southern Brazilian samples. *Open Access Library Journal*, 2: e2217.
- Bezerra, J.M.D. 2002. Meliponicultura: Uma atividade essencial para a economia familiar do Trópico Úmido. In: Moura, E.G. (Org). *Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido: Atributos, alterações e uso na produção familiar*. Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, p.144-203. (<http://www.iica.org.br/docs/publicacoes/publicacoesiica/agroambientestransicao.pdf>) Accessed on 20/09/2015.
- Bonvehí, J.S.; Torrentó, M.S.; Lorente, E.C. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1848-1853.
- Campos, M.G.; Webby, R.F.; Markham, K. R.; Mitchell, K.A.; Cunha, A.P. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 742-745.
- Campos, J.F.; Santos, U.P.; Macorini, L.F.B.; Melo, A.M.M.F.; Balestieri, B.P.J.; Paredes-Gamero, E.J.; Cardoso, C.A.L.; Souza, K.P.; Santos, E.L. 2014. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*, 65: 374-380.
- 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. 2009. Padronização de extrativos de geopropolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). *Cadernos de Pesquisa*, 16: 31-38.
- Dutra, R.P.; Nogueira, A.M.C.; Marques, R.R.O.; Costa, M.C.P.; Ribeiro, M.N.S. 2008. Pharmacognostic evaluation of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith from Baixada Maranhense, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 557-562.
- 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. 2014. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 2549-2557.
- Holanda, C.A.; Oliveira, A.R.; Costa, M.C.P.; Ribeiro, M.N.S.; Souza, J.L.; Araújo, M.J.A.M. 2012. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do Cerrado maranhense. *Química Nova*, 35: 55-58.
- Kakkar, S.; Bais, S. 2014. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *International Scholarly Research Notices Pharmacology*, 2014: ID 952943.
- Kalogeropoulos, N.; Konteles, S.J.; Troullidou, E.; Mourtzinis, I.; Karathanos, V.T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 116: 452-461.
- Kerr, W.E. 1987. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geopropolis e cera. *Informe Agropecuário*, 13: 15-27.
- Libério, S.A.; Pereira, A.L.A.; Dutra, R. P.; Reis, A.S.; Araújo, M.J.A.M.; Mattar, N.S.; et al. 2011. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, 11: 108.
- Martins, A.C.L.; Rêgo, M.M.C.; Carreira, L.M.M.; Albuquerque, P.M.C. 2011. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). *Acta Amazonica*, 41: 183-190.
- Muniz, F.H. 2002. A vegetação da região de transição entre a Amazônia e o Nordeste, diversidade e estrutura. In: Moura,

- E.G. (Org). *Agroambientes de Transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido: Atributos, alterações e uso na produção familiar*. Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, p.44-60.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Nogueirapis, São Paulo, São Paulo, 446p.
- Pedro, S.R.M. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61: 348-354.
- Pereira, A.S.; Bicalho, B.; Aquino-Neto, F.R. 2003. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*, 34: 291-298.
- Ribeiro, M.H.M.; Luz, C.F.P.; Albuquerque, P.M.C. 2013. Pollen analysis of geopropolis of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 (Meliponini, Apidae, Hymenoptera) in areas of restinga, cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. *Grana*, 52: 81-92.
- Righi, A. A.; Negri, G.; Salatino, A. 2013. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: ID 267878.
- Sawaya, A.C.H.F.; Cunha, I.B.S.; Marcucci, M.C. 2011. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5: 27.
- Silva, E.C.C.; Muniz, M.P.; Nunomura, R.C.S.; Nunomura, S.M.; Zilse, G.A.C. 2013. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Química Nova*, 36: 628-633.
- Slaa, E.J.; Chaves, L.A.S.; Malagodi-Braga, K.S.; Hofstede, F.E. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37: 293-315.
- Souza, S.A.; Camara, C.A.; Silva, E.M.S.; Silva, T.M.S. 2013. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: ID 801383.
- Souza, S.A.; Dias, T.L.M.F.; Silva, T.M.G.; Falcão, R.A.; Moreira, M.S.A.; Silva, E.M.S.; Camara, C.A.; Silva, T.M.S. 2014. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, 61: 560-565.
- Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M.C.; Tsvetkova, I.; Kujungiev, A. 2000. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55: 785-789.
- Zhang, L.L.; Wang, Y.M.; Xu, M.; Wu, D.M.; Chen, J.H. 2014. Quantification of gallic acid and ellagic acid from the seed of *Cornus officinalis* by UHPLC method and their antioxidant activity. *Chemical Engineering Communications*, 201: 545-556.

Recebido em 08/01/2016

Aceito em 25/03/2016

5.2 CAPÍTULO 2 – Patente



04/02/2016 870160003109

09:25



00.000.2.2.16.0089229.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 002463 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Maranhão

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária, Bacanga

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO FARMACÉUTICA ANTI-HELMÍNTICA COM O EXTRATO SECO DA GEOPRÓPOLIS

Resumo: Esta invenção trata-se da obtenção de formulação farmacêutica anti-helmíntica, contendo extrato seco da geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* Smith, como ativo natural, destinado ao combate de parasitas gastrointestinais que acometem animais ruminantes de pequeno porte.

5.3 CAPÍTULO 3 – Artigo

Anthelmintic activity of hydrolyzable tannins and phenolic acids, constituents of geopropolis against *Haemonchus contortus* nematode

Artigo a ser submetido ao Journal of Agricultural and Food Chemistry

ISSN: 1520-5118

Marisa Cristina Aranha Batista[‡], Livio Martins Costa Junior[†], Maria Nilce de Sousa Ribeiro^{*‡}

[‡]Laboratório de Farmacognosia and [†]Laboratório de Parasitologia Animal, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses 1966, 65085-580 São Luís, Maranhão, Brazil

Corresponding Author

*(M.N.S.R.) E-mail: mnribeiro@ufma.br. Phone: (+55) 98-32728592.

ABSTRACT

Synthetic drugs are the most used anthelmintic to control gastrointestinal nematodes, however, the global anthelmintic resistance are increasing, and geopropolis can be an alternative to control of these parasites. Geopropolis is a complex mixture of plant resins, waxes, salivary secretions and soil produced by the stingless bee *Melipona fasciculata*. In the present work, we describe the *in vitro* anthelmintic activity using by egg hatch and exsheathment larvae of *Haemonchus concortus*, as well as evaluate the antioxidant activity and chemical composition of geopropolis extract and fractions from *Melipona fasciculata*. The extract and fractions of geopropolis, except for the hexane fraction, exhibited anthelmintic activity for eggs hatching (2.01 to 3.73 mg/mL) and exsheathment inhibition (0.12 to 0.55 mg/mL), antioxidant activity for DPPH assay (IC₅₀ 6.50 to 29.80 µg/mL) and FRAP assay (6.91 to 17.19 mM F²⁺/g). The anthelmintic activity of geopropolis studied was significant and may be related to antioxidant activity, total phenolic content. Hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) phenolic acids (brevifolin carboxylate, ellagic acid and derivatives, caftaric acid) were identified in fractions of geopropolis.

Keywords: geopropolis, natural product, antioxidant activity, phenolic acids, hydrolyzable tannins.

INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes (NGIs) in small ruminants is a serious pathological problem across the world affecting animal health, welfare and production. The use of synthetic drugs is the common method of anthelmintic control by gastrointestinal nematodes established around the world.¹ However, the global increase in anthelmintic resistance,² worrying presence of residues in food, and environmental pollution have all been an incentive for research into alternative methods to control helminthes.³

Plants and these derivatives products have been used for centuries as dewormers for both human and livestock, and several studies have explored the anthelmintic effects of plant extracts.^{4,5} Most anti-nematode activities have been obtained with plant extracts rich in polyphenols, especially tannins, able to provide nutritional and antioxidant benefits to ruminants that *in vivo* are linked to neutralization of excessive free radicals in the body, triggering internal antioxidant mechanisms and boosting the immune system.^{6,7} The hypothesis for direct effects of polyphenolic compounds has been substantiated by several *in vitro* assays against diferente life-cycle stages.^{8,9}

Products derived from bees, such as propolis and geopropolis can be alternative controls of these parasites. Propolis is a complex mixture, formed by resinous and balsamic material and is collected by bees in the branches, flowers, pollen, shoots and exudates of trees.

This resin, mixed with salivary secretions of bees is used for the core protection against the proliferation of microorganisms.¹⁰ For centuries propolis has been used in folk medicine due to its biological properties pertaining to, antioxidant, antiviral,¹¹ anthelmintic,¹² antibacterial, antitumor anti-inflammatory and others.¹³

Although a several of studies about propolis have been published, most of them are from *Apis mellifera*, whereas other types of propolis collected by different species of bees have been sparsely studied.

The bee species, *Melipona fasciculata*, which belongs to Meliponini tribe produces a variety of propolis popularly known as geopropolis. Geopropolis differs from propolis by presenting wax and soil in its composition providing different physical and chemical characteristics.^{14,15} Despite of its popular use in folk medicine, very little is known about its chemical composition and biological activity.

The chemical composition of geopropolis is complex with the presence of phenol compounds (phenolic acids, flavonoids, tannins, coumarins, alkylresorcinols)^{16,17}, prenylated benzophenone,¹⁸ terpenes,¹⁹ carbohydrates, sugar alcohols, fatty acids²⁰, steroids,²¹ and saponins.²²

Studies of geopropolis have demonstrated the biological activities such as antimicrobial, antiproliferative, cytotoxic,^{23,24} antitumor,²⁵ antioxidant,^{16,26} antinociceptive,²⁶ anti-inflammatory,^{15,27} immunomodulatory,²⁰ and gastroprotective properties.²⁸ However, geopropolis have no report anthelmintic activity.

The present study aimed to investigate the chemical composition of geopropolis produced by *M. fasciculata* Smith collected in Maranhão state, Brazil, and performed as *in vitro* assays for the evaluation of the anthelmintic activity on the eggs and infective larvae of *Haemonchus contortus*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol, formic acid, acetonitrile, hydrochloric acid, acetic acid, sodium carbonate, sodium acetate trihydrate, and anhydrous sodium sulfate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used in the study were of analytical or HPLC grade. Folin–Ciocalteu reagent, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), potassium persulfate, iron (III) chloride hexahydrate, iron (II) sulfate heptahydrate, phosphate buffered saline (PBS), and gallic acid

were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The solvents were filtered using a Phenomenex solvent filtration apparatus (Torrance, CA, USA). The water used in this experiment was purified in a Millipore Milli-Q apparatus (Purelab UHQ-PS, Elga).

Geopropolis sample. The geopropolis sample were collected from beehive in Fernando Falcão municipality (6°08'99.2''S and 44°54'99.4''W), Maranhão State, northeastern Brazil, in 2012.

Extraction and fractionation of geopropolis extract. The geopropolis sample was triturated using a knife mill and the geopropolis powder (500 g) obtained was extracted by maceration with 1000 mL of 70% ethanol/water (70:30, v/v) for 48 h at a solid to solvent ratio of 1:5 (w/v). The extract was filtered through Whatman no. 1 filter paper (Whatman, Durham, UK) in a Buchner funnel and concentrated to a small volume at 40 °C in a rotary evaporator (Q344B2, Quimis, São Paulo, Brazil) under vacuum, obtaining the geopropolis extract (G). The geopropolis extract (G, 20 g) was dissolved in 100 mL of methanol/water (80:20, v/v) by stirring, and the solution was subjected to fractionation by liquid–liquid partition using hexane, chloroform, and ethyl acetate. The solutions were filtered (anhydrous Na₂SO₄) and concentrated to a small volume at 40 °C in a rotary evaporator under vacuum, obtaining the hexane fraction (HFG), chloroform fraction (CFG), ethyl acetate fraction (EAFG), and hydroalcoholic fraction (HAFG).

Biossays. All procedures were approved through the Ethics Committee for the Animal Experimentation of the Federal University of Maranhão, Brazil under number 23115018061. The eggs were purified from a donor goat with monospecific infection of *H. contortus*.²⁹

Egg Hatch Assay (EHA). Preparation of stock solution (20 mg/mL) of the geopropolis extracts and fractions were diluted in methanol/PBS (0.1 M phosphate, 0.05 M NaCl, pH 7.2) (2:98, v/v) The extract and fractions were conducted following that was previously used to assess anthelmintic.²⁹ The test were performed in multi-well plate (96-wells), 100 µL of the *H. contortus* egg suspension (100 eggs/mL) was added to each well and the treatments

(negative control, extract and fractions) at concentrations that ranged from 5.0 mg/mL and decreased always in a half until 1.0 mg/mL. The methanol/PBS (2:98, v/v) was used for negative control (80 μ L of PBS/methanol (2:98, v/v) plus 20 μ L of PBS). All the extract and fractions concentrations and the negative control were tested with four replicates. The multi-well plates were incubated in BOD (Biological oxygen demand) (27 ° C and RH > 80%) for 48 h, the eggs and larvae were quantified using an inverted microscope and eggs hatching percentage was calculated. The analyses included only those plates with a hatching-rate of 80% or higher in the negative control wells.

Larval Exsheathment Inhibition Assay. The test was performed according to Bahuaud et al.⁸ Using Baermann technique,³⁰ active L3 were separated, concentrated by centrifugation at 6000 rpm for 2 min. to prepare a solution with 1000 L3 for 1000 μ L. The extract and fractions were diluted in methanol/PBS (2:98, v/v), and evaluated at concentrations that ranged from 1.2 mg/mL and decreased always in a half until 0.075 mg/mL. The negative control was done with methanol/PBS (2:98, v/ v) The infective larvae were incubated in the different treatments for 3 h at 22 °C in BOD. Then, the larvae were washed with PBS and centrifuged five times at 3000 rpm for 5 min. Approximately 1000 larvae for tube were subjected to artificial unsheathing process by contact with solution of sodium hypochloride/water (2:98, v/v) diluted 1:300 in PBS (pH 7.2). Tests were performed in tubes and extract and fractions concentrations and control were evaluated in four repetitions. The larval unsheathing process was monitored in the intervals of 0, 20, 40 and 60 min by observation under inverted microscope. At each time the larvae were killed and examined immediately.

Determination of total phenolic content (TPC). The TPC was determined with the Folin–Ciocalteu reagent and 20% sodium carbonate. The reaction mixture was kept in the dark for 2 h at room temperature, and absorbance was then measured at 760 nm in UV–vis spectrophotometer (Lambda 35, Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA, USA).¹⁷ TPC was calculated from the calibration curve constructed with standard solutions of gallic acid

(1.0–30.0 $\mu\text{g/mL}$) and is expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of geopropolis extract or fraction (mg GAE/g). The analyses were carried using three aliquots of each sample, measured in triplicate, and the average value was calculated for each sample.

Determination of the antioxidant activity. DPPH radical scavenging activity. The antioxidant activity of the geopropolis sample was evaluated by in vitro 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay.¹⁷ The extract and fractions were diluted in methanol at different concentrations (1.0-100.0 $\mu\text{g/mL}$) and added to a methanol solution of DPPH (40.0 $\mu\text{g/mL}$). After 30 min of reaction at room temperature in the dark, the absorbance of each solution was read at 517 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35 Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, USA). Methanol was used as the blank and DPPH solution was used as the control. Standards of gallic acid and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, Sigma) were treated under the same conditions as the samples. The percent inhibition was calculated according to equation.

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = 100 \times (\text{A}_{\text{control}} - \text{A}_{\text{sample}}) / \text{A}_{\text{control}}$$

where A_{sample} = absorbance of the sample after 30 min of reaction, and $\text{A}_{\text{control}}$ = absorbance of the control. The percent scavenging activity was plotted against the sample concentration to obtain the IC_{50} , defined as the concentration of sample necessary to cause 50% inhibition.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. This method was used to determine the antioxidant activity based on iron reduction. FRAP measures the ferric-reducing ability of a sample in acid medium (pH 3.6), yielding an intense blue color attributable to the reduction of the ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex to the ferrous (Fe^{2+}) form.¹⁷ FRAP reagent was prepared immediately before analysis by mixing 25 mL of acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 2.5 mL of TPTZ solution (10 mM TPTZ in 40 mM HCl), and 2.5 mL of $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (20 mM) in aqueous solution. Different concentrations of 100 μL of the extract and fractions (1–100 $\mu\text{g/mL}$) were added to 300 μL of distilled water and 3 mL of FRAP

reagent, and the mixtures were incubated in a water bath at 37 °C for 30 min. The absorbance of the reaction mixture was read at 593 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Lambda 35, Perkin Elmer Corporation), with FRAP solution as a blank. The calibration curve was constructed using different concentrations of FeSO₄·7H₂O (100–2000 μM) ($r^2 = 0.9987$) and the results are expressed as mmol Fe²⁺/g sample. Standards of gallic acid and Trolox (Sigma) were treated under the same conditions as the samples.

HPLC/UV–Vis Analysis. HPLC analysis was carried out in a Thermo Finnigan Surveyor Autosampler liquid chromatograph (San Jose, CA, USA) equipped with an injector with 25 μL loop and a UV detector. A Hypersil BDS C-18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA), protected by a C-18 precolumn (4 × 3 mm, 5 μm, Gemini; Phenomenex), was used. The compounds of the geopropolis extract and fractions were separated at room temperature using a gradient elution program at a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phases consisted of Milli-Q water containing 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B). The following linear gradient was applied: 0–35 min, 5%–30 B; 35–50 min, 30–70% B; 50–60 min, 70–100% B. The column was reequilibrated for 10 min before the next run. The injection volume into the HPLC system was 25 μL, and UV–vis detection was performed at 254 nm. Before injection into the HPLC system, the extract and each fraction was dissolved in the same solvent used for extraction (HPLC grade) to obtain a final concentration of about 3 mg/mL and then filtered through a 0.22 μm nylon syringe filter (Allcrom, São Paulo, SP, Brazil).

HPLC-DAD-ESI-MS Analysis. The geopropolis extract and fractions were analyzed with an HPLC system (LC-20AD, Shimadzu) equipped with a photodiode array detector (SPD-20A – Shimadzu), which was coupled to an Esquire 3000 Plus ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using electrospray ionization (ESI). The conditions for dilution of the samples and the mobile phase composition were the same as described above. The ionization conditions were adjusted as follows: electrospray voltage of

the ion source of 40 V, capillary voltage of 4.5 kV, and capillary temperature of 320 °C. Ultrahigh-purity helium (He) was used as the collision gas and high-purity nitrogen (N₂) as the nebulizing gas. Nebulization was aided with a coaxial nitrogen sheath gas provided at a pressure of 27 psi. Desolvation was facilitated using a counter current nitrogen flow set at a rate of 7.0 L/min. Analyses were carried out using full-scan mass spectra in the negative ionization mode and data-dependent MS² scans from *m/z* 100- 3000. The compounds were identified on the basis of the molecular ion mass, fragmentation, UV–visible spectra, or co-injection with standards.

Statistical analysis. For the chemical analysis: all analyses were performed in triplicate. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD); For the biological analysis: all the analyses were performed in quadruplicate. The effective concentration EC₅₀ for egg hatch inhibition and exsheathment inhibition for extract and each fraction were calculated using the software Probit Polo Plus. The results are expressed in EC₅₀. Comparisons between groups were made using analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's test *p* value ≤ 0.05, and all analyses were performed using the GraphPad Prism software, 5.0.

RESULTS

Egg hatch assay. The ovicidal activity of the extract and fractions was summarized in the table 1. The EC₅₀ values for ranged from 2.01 to 3.73 mg/mL (Table 1). The yield of HFG fraction was very low and has not been submitted to test anthelmintics. EAFG showed the best concentration dependant ovicidal activity on the eggs of *H. contortus* with EC₅₀ of 2.01 mg/mL. The G and HAFG showed no differ statistically.

Larval exsheathment inhibition assays (LEIA). The range of EC₅₀ values (0.12 – 0.55 mg/mL) obtained for extract and fractions are shown in Table 1. The HAFG exhibited the best concentration with EC₅₀ of 0.12 mg/mL, for the larval exsheathment inhibition. The CFG and EAFG showed no differ statistically.

Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of the extract and fractions. TPC and antioxidant activity of the extract and fractions are shown in Table 2. Total phenolic content ranged from 64.50 to 650.19 mg GAE/g in the extract and fractions. G (541.96 mg GAE/g) and EAFG (650.19 mg GAE/g) had the highest total phenolic content.

The EAFG and G exhibited the highest activity among the samples analyzed by the DPPH radical scavenging assay, with an IC_{50} value of 6.50 and 8.72 $\mu\text{g/mL}$ respectively, HAFG and CFG and provided IC_{50} values of 17.39 and 29.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

In the FRAP assay, EAFG, G, HAFG, and CFG presented the best ferric-reducing abilities (17.19, 13.01, 11.07 and 6.91 mmol Fe^{2+}/g , respectively). EAFG, G, HAFG were superior to the antioxidant activity of Trolox. No antioxidant activity was observed for HFG in any of the antioxidant assays (Table 2).

Identification of phenolic compounds. Because EAFG and HAFG were more effective against eggs hatch and larval exsheathment respectively, the chemical composition of these samples were analyzed by HPLC/UV-vis and HPLC-DAD-MS/MS.

The chromatogram obtained by HPLC/UV-Vis (254 nm) for EAFG and HAFG (Figure 1) revealed similar chemical compositions, with various peaks corresponding to phenolic acids and hydrolyzable tannins on the basis of the analysis, but HAFG has a lower number of compounds.

The HPLC-DAD-ESI-MS/MS method allowed for the separation of 11 peaks of EAFG and 5 peaks of HAFG corresponding to compounds with related structures were tentatively identified as phenolic acids and hydrolyzable tannins on the basis of their retention times, UV spectra, and MS pattern and also taking into account data in the related literature (Figure 1 and table 3 and 4).

Tentatively identified compounds **1-11** are described below for the EAFG fraction and illustrated in Figure 2. Compound **1** showed $[\text{M-H}]^-$ at m/z 481 and its fragmentation

produced m/z 301 after loss of a glucose unit (180 Da), and was tentatively identified as HHDP-glucose.^{17,31}

Compound **2** showed $[M - H]^-$ at m/z 483 yielded fragment ions a m/z 331 after loss of a galloyl moiety $[M - H - 152]$ and m/z 169 $[M - H - 162]$ after removal of the glucosyl group and was tentatively identified digalloyl glucose.^{32,33}

Compound **3** exhibited $[M - H]^-$ at m/z 635 yielded fragments of m/z 483 $[M-H-152]$ the loss galloyl, at m/z 465 $[M - H - 18]$, from the loss of water and decarboxylation of a gallic acid group m/z 421 $[M-H-44]$ and m/z 313 $[M - H - 152]$, indicating the loss of another galloyl group, along with cross-ring fragmentation of glucose, and at m/z 301 and was tentatively identified trigalloyl glucose.^{17,32}

Compound **4** showed $[M-H]^-$ at m/z 785, indicating the presence of digalloyl-HHDP-glucose (pedunculagin II). The deprotonated molecule with an m/z 785 $[M - H]^-$ ion fragmented at m/z 767 $[M - H - 18]$ from the loss of a water, at m/z 483 $[M-H- 302]$ due to loss of one HHDP group, and at m/z 301 after the loss of glucose molecule.^{33,34}

Compound **5** showed ion at m/z 463 and MS^2 ion fragmented at m/z 403 $[M-H-60]$, from the removal of two formaldehyde moieties from glucose moiety, and at m/z 301 $[M - H - 102]$ indicating the loss of a glucosyl group moieties, also identified by its ellagic acid fragment, m/z 301, was identified as ellagic acid glucoside.^{35,36}

Compound **6** exhibited an $[M-H]^-$ ion at m/z 951 and produced fragments at m/z 933 in the MS/MS experiment. Furthermore, were obtained from the loss of water from the major fragment (m/z 951) and was tentatively identified galloyl-HHDP-DHHDP-glucose (granatin B).^{36,37}

Compound **7** exhibited the $[M - H]^-$ ion at m/z 291 and fragment ions at m/z 247 $[M-H-44]$ after loss decarboxylation coincided with the MS/MS data of brevifolin carboxylate.³⁸

Compound **8** and compound **11** exhibited the m/z 467 and m/z 603 respectively, revealed typical ellagic acid fragment (m/z 301) and, thus, was assumed to be ellagic acid

derivatives and ellagic acid hexoside derivate. However, further information for a more detailed characterisation of these compound was not obtained.³⁷

Compound **9**, galloyl-bis-HHDP-glucose ($[M - H]^-$ at m/z 935) yielded fragment ions at m/z 917 after the loss of a water $[M - H - 18]$, at m/z 633 after loss of HHDP (M-H-302) and, m/z 301 $[M-H-332]$ after loss galloylglucose.³⁹

Compound **10**, trigalloyl-HHDP-glucose showed several peaks including the base peak ion at m/z 937 and fragments at m/z 919, 767, 465, and 301. The fragment at m/z 919 after the loss of a water $[M - H - 18]$, at m/z 767 was attributed to the loss of galloyl $[M-H-152]$ and the m/z 465 fragments were to the loss of HHDP moieties from the $[M- H- 302]$. Again, evidence of an HHDP group was observed (m/z at 301 and $[M - 302 - H]^-$ ion) as one of the major fragments in the mass spectrum.⁴⁰

Compounds **1-6** were also tentatively identified and are described below for the HAFG fraction, however, that the compound **1** and **3** were also identified in the EAFG. Compound **2** exhibited an $[M-H]^-$ ion at m/z 331 and produced fragments at m/z 271 in the MS² experiment, indicating the loss of a hexose moiety and m/z (60Da). Therefore, this compound was identified as monogalloyl glucose.³⁷

Compound **4** is typical ellagic acid fragment at m/z 301.¹⁷ Compound **5** was identified as caftaric acid exhibited an $[M-H]^-$ ion at m/z 311. Additionally, identified by their pseudomolecular ions at m/z 311, respectively in the MS² experiment revealed a loss of 132Da corresponding to a tartaric acid. It also produced product ions at m/z 179 (caffeic acid).⁴¹

DISCUSSION

The presence of the phenolic compounds is important when related to biological activity as antioxidant activity or anthelmintic activity. In the DPPH and FRAP assays, EAFG, G,

HAFG and CFG exhibited significant *in vitro* antioxidant activity and presence of the phenolic compounds. HFG did not show antioxidant activity.

The highest antioxidant activity finding can be due to the high content of polyphenols, such as hydrolyzable tannins (HT) and phenolic acids, compounds identified in the EAFG and HAFG fractions that were more effective against eggs hatch and larval exsheathment inhibition, respectively.

The antioxidant activity of the phenolic compounds occurs by the formation of less reactive species or the action as hydrogens donors, depend on the molecular structure, including the polarity and position of constituent groups in the formation of these compounds.⁴²

Phenolic compounds have strong antiradical activity, such as tannins, flavonoids and phenolic acids. Tannins with high molecular weight and complex and variable structure, exhibits a strong antioxidant activity.⁴³ Several studies relate the biological activities of hydrolyzable tannins with their antioxidant and antihelmintic properties.⁴⁴

Ellagic acid and derivatives are excellent acceptors of free radicals and related as antioxidants. Thus, they can also quench electrons from various biological systems including that of electron transport system (ETS). Disruption of electron flow in ellagitannins results in the inhibition of oxidative phosphorylation, it may be related to anthelmintic activity.^{45,46}

Tannins are known to produce anthelmintic activity through a number of mechanisms which include uncoupling oxidative phosphorylation, antioxidant activity and their ability to bind with metals and proteins.⁷ It has been suggested that the direct effect of tannins is based on their interactions with egg and larvae proteins vital for the development and biological functions of the larvae.^{4,47,48}

The hydrolyzable tannins affect the anthelmintic activity according to molecular size, flexibility, types and functional groups, and there are three possibilities to affect eggs and larvae: (1) precipitating proteins and can interact with eggs and larvae through non-covalent

or covalent interactions. (2) a high oxidative activity, oxidation products covalently bind to eggs and larvae. (3) hydrolysis, and the hydrolysis products interact with eggs and larvae,^{7,49} as in the EAFG and HAFG, result in effective inhibition of egg hatching and larval exsheathment respectively and good antioxidant activity.

The egg hatch test is an *in vitro* assay for assessing the potential anthelmintic activities of natural products. Positive results on the inhibition of hatching eggs of a particular species of nematodes are considered to be an indicator that the substance tested was effective against free-living stages, infective larvae or adult worms in the host.⁵⁰

The capacity to reduce egg hatching could be of significant epidemiological importance, and it could help to modulate the risk of parasitism by limiting the infectivity of pastures grazed by ruminants.⁵¹ It is observed with some plant species rich in tannins.^{52,53} The extract and fractions showed a dose-dependent inhibition of egg hatching at EC₅₀ below 3.73 mg/mL, however the EAFG exhibited better EC₅₀ at 2.01 mg/mL, and hydrolyzable tannins (HT) were identified as likely responsible for this activity.

The HTs bound to the surface of the egg shell, presumably via tannin–protein interactions, and either disturbed the proteins that evoke the actual hatching process or, alternatively, the HT coat around the egg simply mechanically disabled the penetration of the larvae through the egg shell or could also disable vital functions such as oxygen exchange between the inside and outside of the egg, but this again would more likely disturb the development of the larvae inside the egg.⁴⁹

Another *in vitro* test used to explore the interactions between tannins and infective third-stage larvae of gastrointestinal nematodes is a larval exsheathment inhibition assay (LEIA). The L3 exsheathment represents the transition from the free-living to the parasitic phase, and is essential in the life cycle of nematodes. The LEIA has proved to be simple and reproducible, it also has the advantage that it allows calculation of EC₅₀ values. Moreover, LEIA has been related to similar *in vivo* processes.⁵⁴

It has been reported that tannins, interrupt the process of exsheathment, thus preventing the establishment of infective larvae in the host and consequently the infection.^{54,55} Tannins have been shown to deform nematode surfaces.^{56,57} Interestingly, exposure to extracts from tannin caused degeneration of muscle cells, accumulation of electron-dense vesicles and marked intracellular disorganization.⁵⁸ These authors speculated whether the lesions observed in the cuticle of ensheathed L3 larvae could have been due to accumulation of metabolic products, which in turn could have produced cellular toxicity by blocking the metabolic exchange with the environment.⁵⁹

The results demonstrated that the extract and fractions showed EC_{50} below 0.600 mg/mL, and HAFG inhibited the process of *H. contortus* larvae exsheathment, showing superior efficacy as compared to others, but this activity may be related to the presence of phenolic compounds, especially ellagic acid and derivatives, or polar compounds that were not identified the information were not sufficient to detail the structures of compounds.

In a recent study, ellagic acid, one of the major constituents of *Alternanthera sessilis*, caused the death of adult nematodes, as well as inhibited the larval production from the eggs of *H. contortus*,⁴⁶ and has been found to inhibit the parasite *Caenorhabditis elegans*.⁶⁰

The geopropolis have no report anthelmintic activity, but have a few works related propolis and anthelmintic activity. Propolis was showed as anthelmintic control reduced eggs per gram of feces (EPG) in sheep,⁶¹ and in bovines.¹²

Hydrolyzable tannins are classified into gallotannins and ellagitannins. Gallotannins consist of a glucose molecule in which hydroxyl groups are partly or completely substituted with galloyl groups, and ellagitannins are esters of the hexahydroxydiphenoyl (HHDP) group consisting of a polyol core (glucose or quinic acid).³⁹

On the basis of MS data, the main fragmentation pattern from gallotannins involved the loss of one or more galloyl groups (152 Da) and/or gallic acid (170 Da) from the deprotonated molecule $[M - H]^-$. Typical neutral losses of ellagitannins during MS fragmentation are

galloyl (152 Da), gallic acid (170 Da), HHDP (302 Da), galloylglucose (332 Da), HHDP glucose (482 Da), and galloyl-HHDP-glucose (634 Da) residues (Figure 3).⁶²

MS/MS of these compounds indicated a common fragment ion m/z 301 (Table 1), corresponding to ellagic acid (a hydrolytic release of HHDP ester groups). Ellagic acid is a dimeric derivative of gallic acid and is generally recognized as the hydrolytic by product following the release of a hexahydroxydiphenoyl (HHDP) ester group from ellagitannins, which spontaneously converts to its characteristic bislactone structure.⁶³ This fragment ion is a key feature of ellagitannins and considered to be a chemical marker compound for hydrolyzable tannins.⁶⁴

Ellagitannins were the main compounds identified but phenolic compounds also identified. Monogalloyl glucose, digalloyl-glucose, ellagic acid hexoside, galloyl-HHDP-DHHDP-glucose, brevifolin carboxylate, galloyl-bis-HHDP-glucose, ellagic acid hexoside derivate, and caftaric acid were detected for the first time on geopropolis by *Melipona fasciculata*, however HHDP-glucose, trigalloyl glucose, digalloyl-HHDP-glucose, trigalloyl-HHDP-glucose and elagic acid were found on geopropolis by *Melipona fasciculata*.¹⁷

This study provided the first evidence of anthelmintic activity of geopropolis inhibiting hatching eggs and exsheathment larvae of *H. contortus*, effects that may be related to antioxidant activity, total phenolic content, hydrolyzable tannins and phenolic acids identified in fractions, EAFG and HAFG showed better activity.

ABBREVIATIONS USED

Geopropolis extract (G); hexane fraction (HFG); chloroform fraction (CFG); ethyl acetate fraction (EAFG); and hydroalcoholic fraction (HAFG); DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl FRAP, ferric reducing antioxidant power; HHDP, hexahydroxydiphenic acid; DHHDP, Dehydrohexahydroxydiphenic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; UV- Vis, ultra violet visible; ESI, electrospray ionization; MS, mass

spectrometry; DAD, diode array detection; MS/MS, tandem mass spectrometry; TPC, total phenolic content; HT, hydrolyzable tannins; larval exsheathment inhibition assay (LEIA); ETS, electron transport system; EPG eggs per gram of feces; ETS, electron transport system

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to the beekeepers for donating the geopropolis samples.

FUNDING SOURCES

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Project No 925/2010), the National Council for Scientific and Technological Development (Project No. 554318/2010-5) and the Foundation for the Support of Research Scientific and Technological Development of the State of Maranhão (Project No. 00963/09)

REFERENCES

- (1) Papadopoulos, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Res.* **2008**, *76*, 99-103.
- (2) Fortes, F. S.; Molento, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesqui. Vet. Bras.* **2013**, *33*, 1391-1402.
- (3) Cezar, A. S.; Catto, J. B.; Bianchin, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciênc. Rural.* **2008**, *38*, 2083-2091.
- (4) Athanasiadou, S.; Kyriazakis, I.; Jackson, F.; Coop, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* **2001**, *99*, 205-219.
- (5) Acharya, J.; Hildreth, M. B.; Reese, R. N. *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* **2014**, *201*, 75-81.
- (6) Rochfort, S.; Parker, A. J.; Dunshea, F. R. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry.* **2008**, *69*, 299-322.
- (7) Katiki, L. M.; Ferreira, J. F.; Gonzalez, J. M.; Zajac, A. M.; Lindsay, D. S.; Chagas, A. C. S.; Amarante, A. F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. *Vet. Parasitol.* **2013**, *192*, 218-227.
- (8) Bahuaud, D.; De Montellano, C. M. O.; Chauveau, S.; Prevot, F.; Torres-Acosta, F.; Fouraste, I.; Hoste, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology.* **2006**, *132*, 545-554.
- (9) Novobilský, A.; Mueller-Harvey, I.; Thamsborg, S. M. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Vet. Parasitol.* **2011**, *182*, 213-220.

- (10) Bezerra, A. M. F.; Bezerra, K. K. S.; Fernandes Filho, A.; Casimiro, G. S.; Pereira, R. S. M.; Nunes, E. M.; Cavalcante, J. C. B.; da Silva, E. M. L.; Brasilino, I. M. V.; de Abrantes, K. S. M.; de Abreu, L. C.; Maracajá, P. B.; Araújo, A. dos S.; da Silva, R. A. Action of propolis on microorganisms of the oral cavity: an integrative review. *Int. Arch. Med.*, **2015**, *8*, 1-13.
- (11) Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernandez-Lopez, J.; Perez-Alvarez J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.*, **2008**, *73*, 117– 124.
- (12) Heinzen, E. L.; de Mello Peixoto, E. C. T.; Jardim, J. G.; Garcia, R. C.; Oliveira, N. T. E.; de Oliveira Orsi, R. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. *Acta Vet. Bras.* **2012**, *6*, 40-44.
- (13) Wagh, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2013**, *2013*, 308249.
- (14) Barth, O. M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. *Apiacta.* **2006**, *41*, 71-85.
- (15) Franchin, M.; da Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Koo, H.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 709-715.
- (16) Silva, E. C. C.; Muniz, M. P.; Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Zilse, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quím. Nova.* **2013**, *36*, 628-633.
- (17) 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. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2549–2557.

- (18) Da Cunha, M. G.; Rosalen, P. L.; Franchin, M.; de Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Ransom, T.; Beutler, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* **2016**, *82*, 190-194.
- (19) 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). *Cad. Pesq.* **2009**, *16*, 31-38.
- (20) 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. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, *4*, 12-20.
- (21) Dutra, R. P.; Nogueira, A. M. C.; Marques, R. R. O.; Costa, M. C. P.; Ribeiro, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 557-562.
- (22) Bankova, V.; Popova, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Phcog. Rev.* **2007**, *1*, 88-92.
- (23) Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L. C. C.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 1-9.
- (24) Campos, J. F.; Santos, U. P.; Macorini, L. F. B.; Melo, A. M. M. F.; Balestieri, B. P. J.; Paredes-Gamero, E. J.; Cardoso, C. A. L.; Souza, K. P.; Santos, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 374–380.
- (25) Cinegaglia, N. C.; Bersano, P. R. O.; Araújo, M. J. A. M.; Búfalo, M. C.; Sforcin, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in vitro*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 737386.

- (26) Souza, S. A.; Dias, T. L. M. F.; Silva, T. M. G.; Falcão, R. A.; Moreira, M. S. A.; Silva, E. M. S.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, **2014**, *61*, 560-565.
- (27) Franchin, M.; Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Bueno-Silva, B.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 907041.
- (28) Ribeiro-Jr, J. A.; Franchin, M.; Cavallini, M. E.; Denny, C.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 459846.
- (29) Bizimenyera, E. S.; Githiori, J. B.; Eloff, J. N.; Swan, G. E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* **2006**, *142*, 336-343.
- (30) De Carli, G.A. Parasitoses intestinais. In. *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*, 2 ed. Atheneu Ed.; São Paulo, Brasil, 2001, pp.116-117.
- (31) Álvarez-Fernández, M. A.; Hornedo-Ortega, R.; Cerezo, A. B.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Effects of the strawberry (*Fragaria ananassa*) purée elaboration process on non-anthocyanin phenolic composition and antioxidant activity. *Food Chem.* **2014**, *164*, 104-112.

- (32) Meyers, K. J.; Swiecki, T. J.; Mitchell, A. E. Understanding the native Californian diet: Identification of condensed and hydrolyzable tannins in tanoak acorns (*Lithocarpus densiflorus*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7686-7691.
- (33) Sandhu, A. K.; Gu, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4681-4692.
- (34) Silva, N. A. D.; Rodrigues, E.; Mercadante, A. Z.; de Rosso, V. V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5072-5084.
- (35) Fracassetti, D.; Costa, C.; Moulay, L.; Tomás-Barberán, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chem.* **2013**, *139*, 578-588.
- (36) Lantzouraki, D. Z.; Sinanoglou, V. J.; Zoumpoulakis, P. G.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; Soković, M.; Heropoulos, G.; Proestos, C. Antiradical–antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. *RSC Advances*, **2015**, *5*, 2602-2614.
- (37) Fischer, U. A.; Carle, R.; Kammerer, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chem.* **2011**, *127*, 807-821.
- (38) Wu, H. Y.; Lin, T. K.; Kuo, H. M.; Huang, Y. L.; Liou, C. W.; Wang, P. W.; Chuang, J. H.; Huang, S. T. *Phyllanthus urinaria* induces apoptosis in human osteosarcoma 143B cells via activation of Fas/FasL and mitochondria mediated pathways. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 925824.

- (39) Zhu, M.; Dong, X.; Guo, M. Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules*. **2015**, *20*, 22463-22475.
- (40) Sanz, M.; Cadahía, E.; Esteruelas, E.; Muñoz, A. M.; Fernández de Simón, B.; Hernández, T.; Estrella, I. Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9631-9640.
- (41) Khoza, B. S.; Gbashi, S.; Steenkamp, P. A.; Njobeh, P. B.; Madala, N. E. Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, *103*, 95-100.
- (42) Galano, A.; Mazzone, G.; Alvarez-Diduk, R.; Marino, T.; Alvarez Idaboy, J. R.; Russo, N. Food antioxidants: Chemical insights at the molecular level. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2016**, *7*, 335–352.
- (43) Shalaby, E.; Shanab, S. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *7*, 528-539.
- (44) Arapitsas, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chem.* **2012**, *135*, 1708-1717.
- (45) Vatter, D. A.; Shetty, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. *J. Food Biochem.* **2005**, *29*, 234-266.
- (46) Mondal, H.; Hossain, H.; Awang, K.; Saha, S.; Rashid, S. M. U.; Islam, M. K.; Rahman, M. S.; Jahan, I. A.; Rahman, M. M.; Shilpi, J. A. Anthelmintic activity of ellagic acid, a major constituent of *Alternanthera sessilis* against *Haemonchus contortus*. *Pak. Vet. J.* **2015**, *35*, 58-62.
- (47) Molan, A. L.; Faraj, A. M. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: *Trichostrongylidae*). *Folia parasitol.* **2010**, *57*, 62-68.

- (48) Molan, A. L. Effect of purified condensed tannins from pine bark on larval motility, egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: *Trichostrongylidae*). *Folia Parasitol.* **2014**, *61*, 371-376.
- (49) Engström, M. T.; Karonen, M.; Ahern, J. R.; Baert, N.; Payré, B.; Hoste, H.; Salminen, J. P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 840–851.
- (50) Foster, J. G.; Cassida, K. A.; Turner, K. E. *In vitro* analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. *Vet. Parasitol.* **2011**, *180*, 298-306.
- (51) Max, R. A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. *Vet. Parasitol.* **2010**, *169*, 138-143.
- (52) Lopes, S. G.; Barros, L. B.; Louvandini, H.; Abdalla, A. L.; Junior, L. M. C. Effect of tanniniferous food from *Bauhinia pulchella* on pasture contamination with gastrointestinal nematodes from goats. *Parasit. Vectors.* **2016**, *9*, 1-7.
- (53) Costa-Júnior, L. M.; Costa, J. S.; Lôbo, Í. C.; Soares, A. M.; Abdala, A. L.; Chaves, D. P.; Batista, Z. S.; Louvandini, H. Long-term effects of drenches with condensed tannins from *Acacia mearnsii* on goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* **2014**, *205*, 725-729.
- (54) Brunet, S.; Aufrere, J.; El Babili, F.; Fouraste, H.; Hoste, H. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in presence of tannin-rich plant (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitol.* **2007**, *134*, 1253–1262.
- (55) Alonso-Díaz, M. A.; Torres-Acosta, J. F. J.; Sandoval-Castro, C. A.; Capetillo- Leal C.; Brunet, S.; Hoste, H. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of

larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* **2008**, *153*, 187-192.

(56) Hoste, H.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Thamsborg, S. M.; Hoskin, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 253-261.

(57) Williams, A. R.; Ropiak, H. M.; Fryganas, C.; Desrues, O.; Mueller-Harvey, I.; Thamsborg, S. M. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasit. Vectors.* **2014**, *7*, 1-12.

(58) Brunet, S.; Fourquaux, I.; Hoste, H. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* **2011**, *60*, 419-424.

(59) Lespine, A.; Ménez, C.; Bourguinat, C.; Prichard, R. K. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2012**, *2*, 58-75.

(60) Ndjinka, D.; Abladam, E. D.; Djafsia, B.; Ajonina-Ekoti, I.; Achukwi, M. D.; Liebau, E. Anthelmintic activity of phenolic acids from the axlewood tree *Anogeissus leiocarpus* on the filarial nematode *Onchocerca ochengi* and drug-resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Helminthol.* **2014**, *88*, 481-488.

(61) Principal J.; Hernández I.; D'Aubeterre R.; Rodrigues J. G. Eficacia del propóleo en el control de las helmintiasis de ovinos naturalmente infestados. *Rev. Cient.* **2002**, *12*, 604-607.

(62) Aaby, K.; Ekeberg, D.; Skrede, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria× ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4395-4406.

(63) Lee, J. H.; Talcott, S. T. Ellagic acid and ellagitannins affect on sedimentation in muscadine juice and wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3971-3976.

(64) Grace, M. H.; Warlick, C. W.; Neff, S. A.; Lila, M. A. Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-IT-TOF-MS. *Food Chem.* **2014**, *158*, 229-238.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. HPLC chromatograms of compounds detected at 254 nm in ethyl acetate fraction (EAFG) and hydroalcoholic fraction (HAFG) of geopropolis extract. Peak numbers correspond to the compounds shown in Table 3 and 4.

Figure 2. Chemical structures of hydrolyzable tannins detected in ethyl acetate fraction (EAFG). Compounds **8** and **11**, the information were not sufficient to detail the structures.

Figure 3. Typical fragmentation of ellagitannins. HHDP, hexahydroxydiphenolic acid.

TABLES

Table 1. Effective concentration of extract and fractions (mg/mL) required for achieving 50% inhibition of egg hatching (EC₅₀) after a 48 h incubation period with the most active and the exsheathment inhibition assay of *Haemonchus contortus* third stage larvae.

Sample	Egg hatching	Exsheathment inhibition
	EC ₅₀ (95% CI)	EC ₅₀ (95% CI)
G	2.78 (2.63-2.98) ^a	0.27 (0.21-0.35) ^a
CFG	3.73 (3.48-4.18) ^b	0.50 (0.45 – 0.56) ^b
EAFG	2.01 (1.95-2.08) ^c	0.55 (0.49-0.61) ^b
HAFG	3.03 (2.92-3.16) ^a	0.12 (0.12-0.13) ^c

95% CI: 95% confidence intervals. Different letters in the same column means a significant difference by turkey test (p<0.05). G, geopropolis extract; CFG, chloroform fraction; EAFG, ethyl acetate fraction; HAFG, hydroalcoholic fraction.

Table 2. Total phenolic content and antioxidant activity of the extract and fractions of geopropolis ^a.

Sample	TPC (mg GAE/g)	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	FRAP (mM Fe ²⁺ /g)
G	541.96 ± 0.02 ^a	8.72 ± 0.49 ^a	13.01 ± 0.15 ^a
HFG	64.50 ± 0.02 ^b	Nd ^b	Nd ^b
CFG	288.37 ± 0.05 ^c	29.80 ± 0.76 ^c	6.91 ± 0.34 ^c
EAFG	650.19 ± 0.03 ^d	6.50 ± 0.53 ^d	17.19 ± 0.23 ^d
HAFG	384.94 ± 0.01 ^e	17.39 ± 0.23 ^e	11.07 ± 0.12 ^e
Trolox	-	5.11 ± 0.04 ^f	9.09 ± 0.10 ^f

^aValues represent the mean ± standard deviation (n=3). Different letters in the same column indicate a significant difference (Tukey test, p < 0.05). TPC, total phenolic content; G, geopropolis extract; HFG, hexane fraction; CFG, chloroform fraction; EAFG, ethyl acetate fraction; HAFG, hydroalcoholic fraction; nd, not detected. DPPH, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; FRAP - ferric reducing antioxidant power

Table 3. Summarizes the tentatively identified phenolic compounds, molecular weight, molecular ion $[M - H]^-$, and main product ions obtained by HPLC-MS/MS for the 11 fragmentation peaks of ethyl acetate fraction (EAFG).

Peak	Compounds	MW	$[M-H] (m/z)$	$MS^2 (m/z)$
1	HHDP-glucose	482	481	301,275
2	Digalloyl-glucose	484	483	331,313,169 331
3	Trigalloyl-glucose	636	635	483, 465,421,313
4	Digalloyl-HHDP-glucose isomer	786	785	767,483, 301
5	Ellagic acid glucoside	464	463	403,301,275,231,214
6	Galloyl-HHDP-DHHDP-glucose	952	951	933
7	Brevifolin carboxylate	292	291	247
8	Ellagic acid derivate	468	467	391,301
9	Galloyl-bis-HHDP-glucose	936	935	917, 633,301
10	Trigalloyl-HHDP-glucose isomer	938	937	919,767,465,301
11	Ellagic acid glucoside derivate	604	603	301

The most abundant ions are shown in bold; MW, molecular weight; $[M - H]^-$ molecular ion; HHDP, hexahydroxydiphenic acid.

Table 4. Summarizes the tentatively identified phenolic compounds, molecular weight, molecular ion $[M - H]^-$, and main product ions obtained by HPLC-MS/MS for the 5 fragmentation peaks of hydroalcoholic fraction (HAFG).

Peak	Compounds	MW	$[M-H]$ (m/z)	MS^2 (m/z)
1	HHDP-glucose	482	481	301,275
2	Monogalloyl glucose	332	331	271
3	Ellagic acid glucoside derivate	604	603	301
4	Ellagic acid	302	301	301
5	Caftaric acid	312	311	311,179

The most abundant ions are shown in bold; MW, molecular weight; $[M - H]^-$ molecular ion; HHDP, hexahydroxydiphenic acid.

FIGURE GRAPHICS

Figure 1

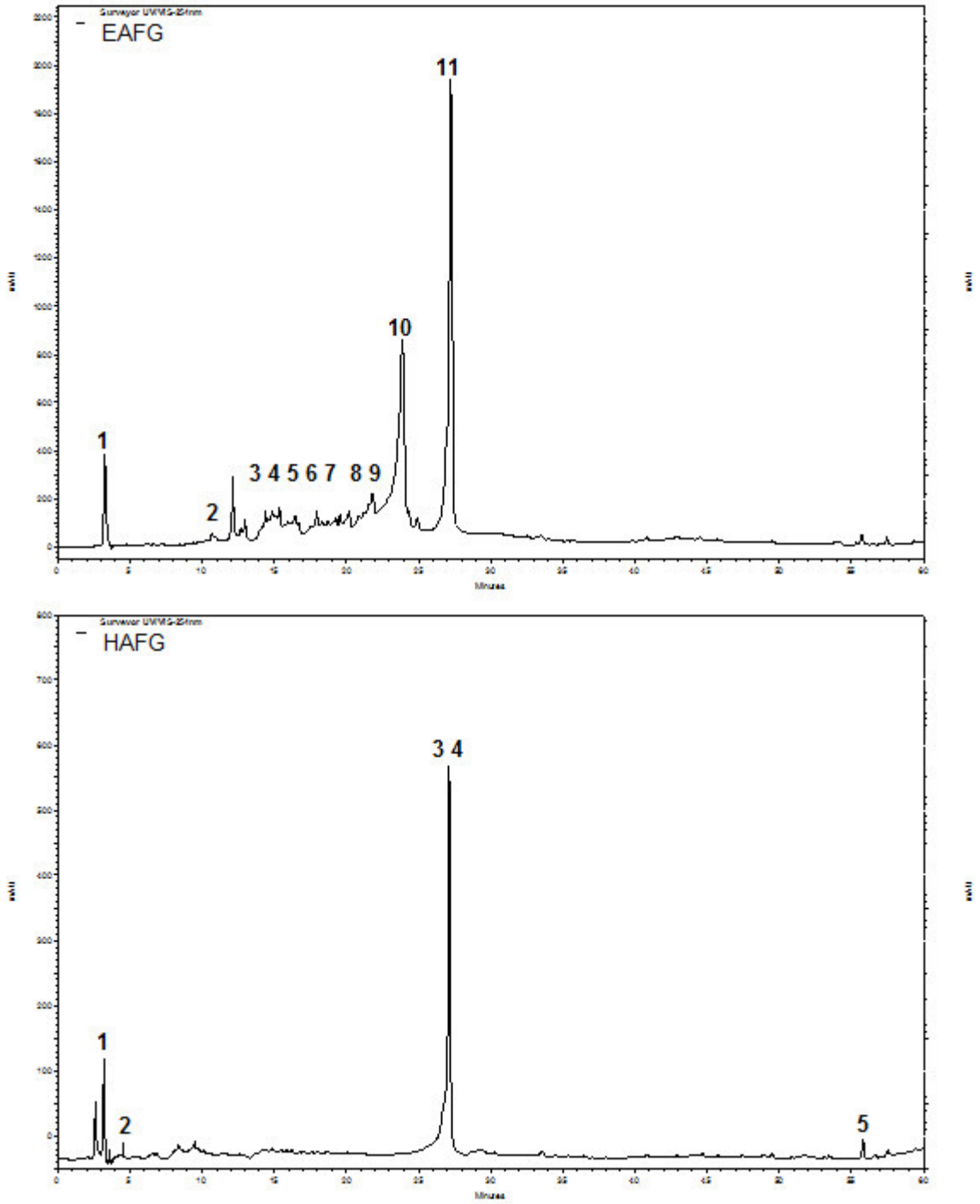


Figure 2

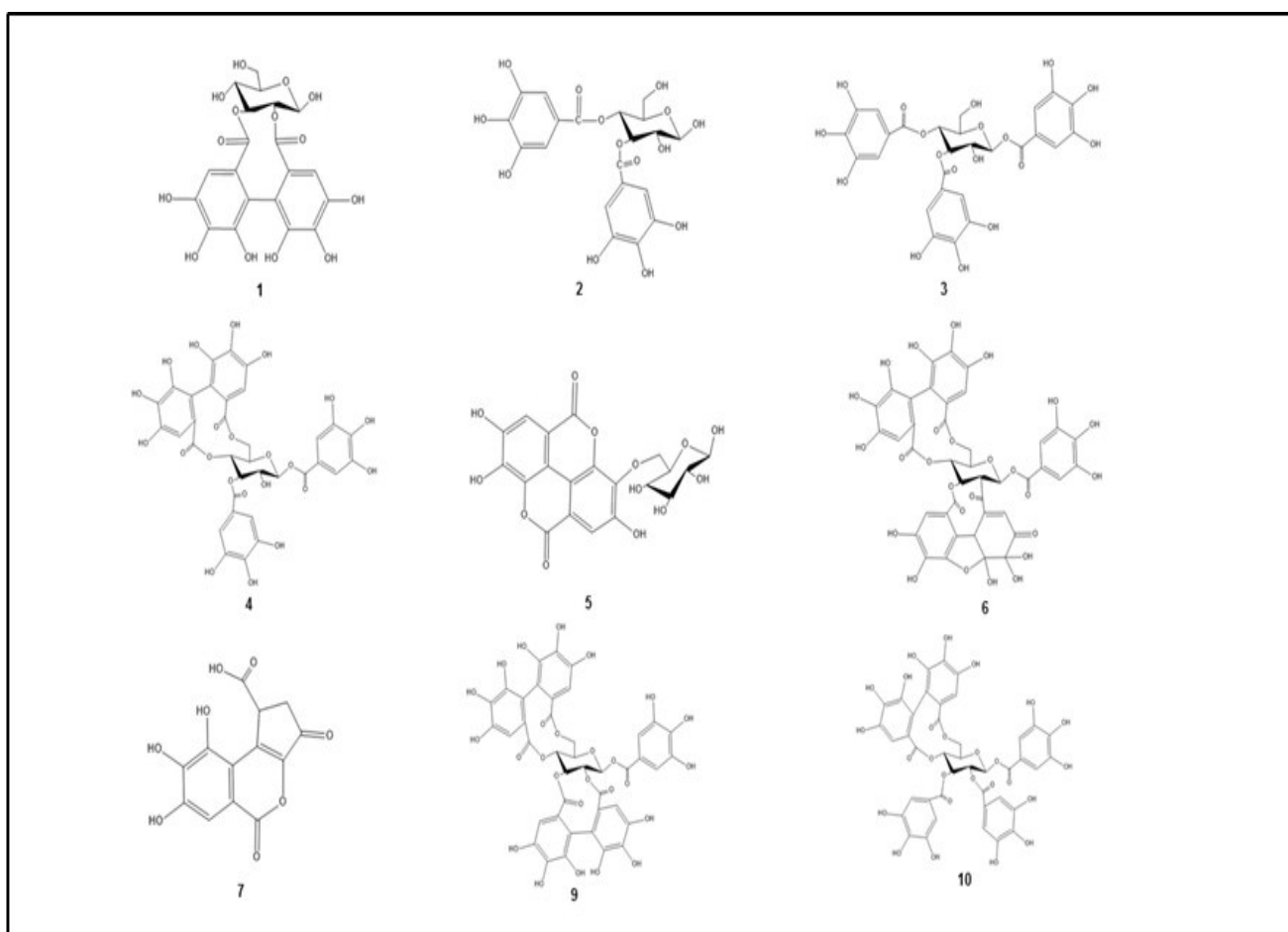
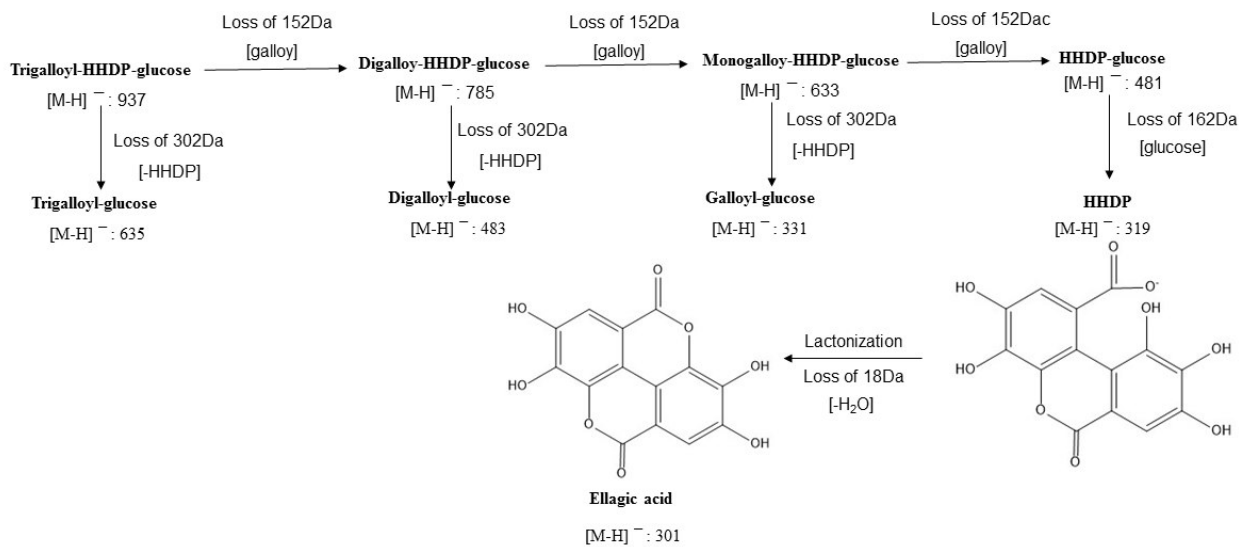


Figure 3



6. CONCLUSÕES

- Os extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de diferentes regiões fitogeográficas do estado do Maranhão apresentam composição química distinta, que dependem das fontes vegetais das regiões, utilizadas pelas abelhas para a produção da geoprópolis;
- A composição química e atividade antioxidante contribuem para a identidade e qualidade dos tipos de geoprópolis produzida por *M. fasciculata* coletadas em duas regiões fitogeográficas do Estado Maranhão, nordeste do Brasil;
- O extrato hidroalcoólico e frações da geoprópolis oriunda do Cerrado maranhense apresentaram atividade antioxidante e atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* de pequenos ruminantes, sendo que a fração acetato foi mais ativa para inibição da eclodibilidade de ovos e a fração hidroalcoólica para inibição do desembainhamento larvar. A fração hexânica não apresentou atividade;
- A atividade anti-helmíntica apresentada pelo extrato hidroalcoólico da geoprópolis permitiu a obtenção de um bioproduto com um depósito de patente;
- As frações ativas apresentaram em sua composição taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e ácidos fenólicos (ácido elágico e derivados, brevifolin carboxilato e ácido caftárico) provavelmente os responsáveis pela atividade anti-helmíntica;
- A geoprópolis de *Melipona fasciculata* é um promissor insumo na obtenção de produtos com ação anti-helmíntica e antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABDELQADER, A.; QARALLAH, B.; AL-RAMAMNEH, D.; DAŞ, G. Anthelmintic effects of *Citrus* peels ethanolic extracts against *Ascaridia galli*. **Veterinary Parasitology**, 188, 1-2, 78-84, 2012.
- 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 geópropolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, 8, 1, 18-24, 2006.
- ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, 64, 403-412, 2005.
- ADEMOLA, I.O.; ELOFF, J.N. *In vitro* anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. Ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, 169, 1-2, 198-203, 2010.
- AGUILAR-CABALLERO, A. J.; CÁMARA R. C.; HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Inmunidad contra los nematodos gastrointestinales: La historia caprina. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, 1, 9, 73-82, 2008.
- AHID, S. M. M.; CAVALCANTE, M. D. A.; BEZERRA, A. C. D. S.; SOARES, H. S.; PEREIRA, R. H. M. A. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, 1, 2, 56-59, 2007.
- AKHTAR, M. S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, 38, 2, 99-107, 2000.
- ALLEN, E. H.; FELDMESSER J. Nematicidal activity of α -chaconine: Effect of hydrogen-ion concentration. **Journal of Nematology** 3, 58-61, 1971.

ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International.**, 59, 622-625, 2010.

AL-SHAIBANI, I. R. M.; PHULAN, M. S.; ARIJO, A.; QURESHI, T. A. Ovicidal and larvicidal properties of *Adhatoda vasica* (L.) extracts against gastrointestinal nematodes of sheep *in vitro*. **Pakistan Veterinary Journal**, 28, 2, 79-83, 2008.

AMARANTE, A. F. T. Controle de verminose. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, 34, 19-30, 2005.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, 120, 91-106, 2004.

ANDERSON, R. C. **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission**. 2 ed. Oxford: CABI Publishing, 672p. 2000.

ARAÚJO, J. S.; GARCIA, R. C.; LEVISTKI, I. C.; HEINZEN, E. L.; POLESE, C. Incentivo a utilização da própolis como alternativa de controle de verminose em ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 3, Florianópolis. **Anais...** Santa Catarina, CD-ROM, 2006.

ARAÚJO, M. J. A. M., BÚFALO, M. C., CONTI, B. J., FERNANDES JUNIOR, 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**, 4, 1, 12-20, 2015.

ARAÚJO, K. S. D. S.; SANTOS JÚNIOR, J. F. D.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M., BARBOSA, R. D. S.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARIANO, S. M. B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, 46,1, 61-68, 2016.

ASSUNÇÃO, A. K. M. **Efeito antitumoral do tratamento com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em modelo experimental de tumor de Ehrlich.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

AYERS, S.; ZINK, D. L.; MOHN, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUS, S.; STEVENSON, D.; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Anthelmintic activity of aporphine alkaloids from *Cissampelos capensis*. **Planta Medica**, 73, 296–297, 2007.

AYERS, S.; ZINKA, D. L.; MOHNB, K.; POWELL, J. S.; BROWN, C. M.; MURPHY, T.; BRAND, R.; PRETORIUSD, S.; STEVENSON, D; THOMPSON, D.; SINGH, S. B. Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. **Phytochemistry**, 69, 2, 541-545, 2008.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIOGIO, S. Effects of brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 2, 215-220, 2007.

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

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 1, 23–28, 2009.

BANKOVA, V; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, 1, 1, 88-92, 2007.

BANKOVA, V; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, 48, 28, 1-8, 2014.

BARBIERI, A. M. E.; LOUVANDINI, H.; DE ARAUJO, R. C.; KATIKI, L.M. Potencial anti-helmíntico de óleos essenciais em nematóides gastrintestinais de ovinos. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIIC, 8,

Campinas, **Anais...** São Paulo, 2014. Disponível em: [http://www.iac.br/areadoinstituto/ciiciac/resumo2014/RE14704 .pdf](http://www.iac.br/areadoinstituto/ciiciac/resumo2014/RE14704.pdf). Acesso em: 12/02/2016.

BARRAU, E; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, 131, 4, 531-538, 2005.

BARRETO, M. A.; MEDEIROS, M. A.; ALMEIDA, M. A. O.; SILVA, A.; MENDONÇA, L. R. Resistência de nematódeos gastrintestinais de caprinos a ivermectina, albendazole, levamisole e abamectina nos pólos Remanso, Coité e Jaguarari no semi-árido baiano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 19, Porto Alegre. **Anais...** Rio Grande do Sul, CD-ROM, 2005.

BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; DA SILVA, L. M.; ROMAGNOLI, G. G.; DE OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 81, 48-55, 2016.

BATH, G.F.; VAN WYK, J.A. The Five Point Check for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. **Small Ruminant Research**, 86, 1-3, 6-13, 2009.

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.

BAXTER, N. J.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E.; WILLIAMSON, M. P. Multiple interactions between polyphenols and salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. **Biochemistry**, v. 36, p. 5566-5577, 1997.

BEHNKE, J.; BUTTLE, D. J.; STEPEK, G.; LOWE, A.; DUCE, I. R. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. **Parasite & Vectors**, 29, 1, 1-18, 2008.

BESIER, R. B. Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. **Veterinary Parasitology**, 186, 1-2, 2-9, 2012.

BEVILAQUA, C. M. L.; CABARET, J.; DOS SANTOS, J. M. L. Resistência anti-helmíntica em ovinos e caprinos. In: COSTA JUNIOR, L. M.; AMARANTE, A. F. T. (Org.). **Controle de Helmintos de Ruminantes no Brasil**. 1ed., São Paulo: Paco Editorial, v. 1, p. 57-87, 2015.

BEZERRA, A. M. F.; FARIAS, M. C. A. D.; BEZERRA, K. K. S. B.; FILHO, A. F.; CASIMIRO, G. S.; PEREIRA, R. S. M.; NUNES, E. M.; CAVALCANTE, J. C. B.; SILVA, E. M. L.; BRASILINO, I. M. V.; ABRANTES, K. S. M.; ABREU, L.C.; MARACAJÁ, P.B.; ARAÚJO, A.S.; SILVA, R. A. Action of propolis on microorganisms of the oral cavity: an integrative review. **International Archives of Medicine**, 8, 118, 1-18, 2015.

BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J. N.; SWAN, G. E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, 142, 336-343, 2006.

BLANCHFLOWER, S. E.; BANKS, R. M.; EVERETT, J. R.; MANGER, B. R.; READING, C. New paraherquamide antibiotics with anthelmintic activity. **The Journal of Antibiotics**, 44, 492-497, 1991.

BORGES, C. C. L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitologia Latinoamericana**, 58, 142-147, 2003.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, 73, 53-63, 2002.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 20, 7481-7, 2006.

BRUNET, S.; FOURQUAUX, I.; HOSTE, H. Ultrastructural changes in the third stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sanfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. **Parasitology International**, v. 60, p. 419-424, 2011.

BURKE, J. M.; KAPLAN, R. M.; MILLER, J. E.; TERRIL, T. H.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; VATTA, A. F. Accuracy of the FAMACHA system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. **Veterinary Parasitology**, 147, 89-95, 2007.

BURKE, J. M.; WELLS, A.; CASEY, P.; KAPLAN, R. M. Herbal dewormer fails to control gastrointestinal nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, 160, 1-2, 168-170, 2009.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em: 10/04/2016.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; MELO, A. M. M. F.; JOSÉ BALESTIERI, B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, 65, 374–380, 2014.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 7, 3, 97-106, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, 148, 288-294, 2007.

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

CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; SCHINEIDER, C. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R. Variabilidade química de geoprópolis

produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, 7, 6, 2456-2474, 2015.

CARVALHO, C. O. **Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas: avaliação *in vitro* em *Haemonchus contortus* e avaliação *in vivo* em *Strongyloides venezuelensis***. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2011.

CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L. G.; CHAVES, F. C.; STEPHANF, M. P.; BIZZO, H. R.; AMARANTE, A. F. T. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, 183, 3-4, 260-268, 2012.

CASTAGNARA, D. D.; BUSARELLO, J. J.; ARAÚJO, J. S.; LEVISTKI, M. A.; DREIER, L.; Utilização da própolis no controle de parasitas gastrointestinais em ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 17., Londrina. **Anais...** Paraná, CD-ROM, 2007.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F.; Propolis an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 73, 1, 1-6, 2002.

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; Controle Alternativo de Nematódeos Gastrointestinais dos Ruminantes: Atualidade e Perspectivas. **Ciência Rural**, 38, 7, 2083-2091, 2008.

CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 173, 157-160, 2010.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 13, 1, 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S.; ARAGAO, W. R.; NAVARRO, A. M. C.; VILELA, L. C.; Anthelmintic action of eprinomectin in lactating anglo-nubian goats in Brazil. **Parasitology Research**, 100, 2, 391-394, 2007 a.

CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S.; Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazil of Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.44, n.1, 2007 b.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S.; FREITAS, A. R.; ARAÚJO, M. R. A.; ARAÚJO-FILHO, J. A.; ARAGUÃO, W. R.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product fator vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, 151, 68–73. 2008.

CHEN, Y. Q.; ZHANG, Q. Y.; LI, X. R.; ZHUGE, H. X.; YANG, S. L.; XU, Q. M. Effect of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins against juvenile and adult *Schistosoma japonicum* *in vitro*. **Chinese journal of schistosomiasis control**, 25, 6, 604-609, 2013.

CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, P. R. O.; ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in Vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 1-6, 2013.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, 44, 35-44, 1992.

COSTA, R. L. D.; BUENO, M. S.; VERISSIMO, C. J.; CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E.; OLIVEIRA, S. M.; SPOSITO FILHA, E.; OTSUK, I. P. Performance and nematode infection of ewe lambs on intensive rotational grazing with two different cultivars of *Panicum maximum*. **Tropical Animal Health Production**, 39, 255-263, 2007.

COSTA, C. T. C; BEVILAQUA, C. M. L; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 10, 4, 108-116, 2008.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 29, 7, 563-568, 2009.

COSTA, M. C. P.; CÂMARA, A. L.; RIBEIRO, M. N. DE S.; SANTOS, D. M. S.; BORGES, M. O. DA R.; DUTRA, R. P.; OLIVEIRA, A. R.; MACHADO, J. L.; ARAÚJO, O. C.; MELO W. **Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) para preparação de formulações farmacêuticas de ação analgésica, antiinflamatória e cicatrizante.** BR n. PI 1102701-0 A2. 15/06/2011.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 31, 1, 65-71, 2011.

COYNE, M. J.; SMITH, G.; JOHNSTONE, C. A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. **International Journal for Parasitology**, 21, 7, 847-853, 1991.

CRUZ, D. G.; ROCHA, L. O.; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G. B.; CORDEIRO, R. C.; JUNIOR, E. S.; MOLENTO, M. B.; SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 170, 340-343, 2010.

CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C. Factors that influence the yield and composition of brazilian propolis extracts. **Journal Brazilian Chemical Society**, 15, 964-970, 2004.

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**, 16, 3, 31-38, 2009.

CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2013,13-23, 2013.

CUNHA, M. S. **Bioprospecção antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.** 2013.63f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

DA CUNHA M. G.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. DE; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, 82,190–194, 2016

DE SOUSA, D. M. N.; OLINDA, R. G.; MARTINS, C. G; ABRANTES, M. R; COELHO, W. A. C.; DA SILVA, J. B. A.; DE MORAIS, S. M; BATISTA, J. S. Prospecção fitoquímica, toxicidade *in vitro* e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, 9, 2, 134-140, 2015.

DEEPAK, M.; DIPANKAR, G; PRASHANTH, D; ASHA, M. K; AMIT, A.; VENKATARAMAN, B. V. Tribulosin and β -sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. **Phytomedicine**, 9, 3, 753-756, 2002.

DOLIGALSKA, M.; JÓZWICKA, K.; KIERSNOWSKA, M.; MROCZEK, A.; PAÇZKOWSKI, C.; JANISZOWSKA, W. Triterpenoid saponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free living stages of *Heligmosomoides bakeri*. **Veterinary Parasitology**, 179, 1, 144-151, 2011.

DUAILIBE, S. A. C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, 15, 5, 420- 423, 2007.

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.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O.; COSTA, M. C. P; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 4, 557-562, 2008.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; BATISTA, M. C. A.; SANTOS, J. R.; CUNHA, M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Chemical composition of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis produced in the savana of the state of Maranhao, Brazil. In: APIMONDEA, Argentina. **Anais...** Buenos Aires, CD-ROM, 2011.

DUTRA, R. P.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Processo de obtenção, formulação de extratos padronizados, fração e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira como agente leishmanicida.** Br n. PI 1103291-0, 05/07/2011.

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 of Agricultural and Food Chemistry**, 62, 2549–2557, 2014.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. *Haemonchus contortus*: *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, 116, 4, 340-345, 2007.

ENDO, V. T.; DE OLIVEIRA, T. C.; CABRAL, A. P. M.; SAKAMOTO, C. A. M.; FERRARO, G. C.; PEREIRA, V., LOPES, W.D.Z.; MAZZUCATTO, B. C. Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de Anatomia Patológica–UEM. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, 1, 2, 112-118, 2014.

ENGSTRÖM, M. T.; KARONEN, M.; AHERN, J. R.; BAERT, N.; PAYRÉ, B.; HOSTE, H.; SALMINEN, J. P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64, 840–851, 2016.

FALBO, M. K.; SANDINI, I. E.; ISHIY, H. M.; FÁVARO, J. L.; SANTOS, C. D.; FALBO, S.; RODIGHIERI, D.; GUZZO, D.; Atividade Anti-Helmíntica do fruto da *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Semina: Ciências Agrárias**, 29, 4, 881-886, 2008.

FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; JONG, D. D.; BASTOS, J. K.; SOARES, A. E. E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, 8, 2, 635-640, 2009.

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

FITZPATRICK, J. L. Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. **Veterinary Parasitology**, 195, 3-4, 233-248, 2013.

FORTES, F. S.; KCOSTER, F. S.; SCHAFER, A. S.; BTER, D.; BUZDTTI, A.; YOSHITANI, U. Y. E.; MOLENTO, M. B. Evaluation of Resitance ind Selected Field Stratmof *Haemochus contortus* to ivermectina and moxidectin using the larval migration on agar test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, 2, 183 – 187, 2013.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, 72, 3-4, 285-308, 1997.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology**, 143, 709–715, 2012.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M; ROSALEN, P. L. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 1-9, 2013.

FRASSY, L. N.; BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; FERREIRA, S. R.; FREITAS, L. G. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43, 1, 102-104, 2010.

GAÍNZA, Y. A.; DOMINGUES, L. F.; PEREZ, O. P.; RABELO, M. D.; LÓPEZ, E. R.; DE SOUZA, A. C. Anthelmintic activity *in vitro* of *Citrus sinensis* and *Melaleuca quinquenervia* essential oil from Cuba on *Haemonchus contortus*. **Industrial Crops and Products**, 76, 647-652, 2015.

GEORGE, J. R. **Parasitologia Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, 379p., 1998.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, 139, 4, 308-328, 2006.

GNOULA, C.; GUISSOU, P.; DUEZ, P.; FREDERICH, M.; DUBOIS, J. Nematocidal compounds from the seeds of *Balanites aegyptiaca* isolation and structure elucidation. **International Journal of Pharmacology**, 3, 3, 280-284, 2007.

GOMES, R. V. R. S.; ARAUJO, M. M.; GOMES, E. N.; VILELA, V. L. R.; ATHAYDE, A. C. R.; Ação antiparasitária *in vitro* dos extratos etanólicos de *Operculina hamiltonii* (batata de purga) e *Mormodica charantia* (melão-de-são-caetano) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos no semi-árido paraibano. **Acta Veterinária**, 4, 2, 92-99, 2010.

GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, 46, 111- 121, 1990.

HEINZEN, E. L.; PEIXOTO, E. C. T. de M.; JARDIM, J. G.; GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, N. T. E.; ORSI, R. de O. Extrato de própolis no controle de helmintoses em bezerros. **Acta Veterinaria Brasilica**, 6, 40-44, 2012.

HIERRO, I.; VALERO, A.; NAVARRO, M. C. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. **Phytomedicine**, 13, 7, 527-531, 2006.

HILLRICHS, K.; SCHNIEDER, T.; FORBES, A. B.; SIMCOCK, D. C.; PEDLEY, K. C.; SIMPSON, H. V. Use of fluorescent lectin binding to distinguish *Teladorsagia circumcincta*

and *Haemonchus contortus* eggs, third-stage larvae and adult worms. **Parasitology Research** 110, 1, 449-58, 2012.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. **International Journal for Parasitology**, 31, 3, 231-244, 2001.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, 180, 1-2, 144-154, 2011.

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, 186, 18-27, 2012.

HOUZANGBE-ADOTE, M. S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MOUTAIROU, K.; HOSTE, H. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research on Veterinary Science**, n.78, p. 155–160, 2005.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The Veterinary Record**, 130, 442–446, 1992.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico 2013**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 07 de janeiro de 2016.

IDRIS, A.; MOORS, E.; SOHNREY, B.; GAULY, M. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. **Parasitology Research**, 110, 1453-1459, 2012.

INMAN, W. D.; O'NEILL-JOHNSON, M.; CREWS, P. Novel marine sponge alkaloids. 1. Plakinidine A and B, anthelmintic active alkaloids from a *Plakortis* sponge. **Journal of the American Chemical Society**, 112, 1–4, 1990.

KAPLAN, R. M.; BURKE, J. M.; TERRILL, T. H.; MILLER, J. E.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M.; WILLIAMSON, L. H.; LARSEN, M.; VATTA, A. F.

Validation of the FAMACHA eye color chart for detecting clinical anemia on sheep and goat farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, 123,105-120, 2004.

KAR, P.K; TANDON, V.; SAHA, N. Anthelmintic efficacy of genistein, the active principle of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alterations in the free amino acid pool and ammonia levels in the fluke, *Fasciolopsis buski*. **Parasitology International**, 53, 4, 287-291, 2004.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F. S.; AMARANTE, A. F. T Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. **Veterinary Parasitology**, 183, 1-2, 103-108, 2011.

KATIKI, L, M.; FERREIRA, J. F.; GONZALEZ, J. M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY DS, A. C.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, 18, 1, 192-218, 2013.

KERR, W. E.; ABSY, M. L.; MARQUES-SOUZA, A. C. Espécies nectaríferas e poliníferas utilizadas pela abelha *Melipona crassipes fasciculata* (Meliponinae, Apidae) no Maranhão. **Acta Amazonica**, 17, 145-156, 1986.

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

KLONGSIRIWET, C.; QUIJADA, J.; WILLIAMS, A. R.; MUELLER-HARVEY, I.; WILLIAMSON, E. M.; HOSTE, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 5, 3, 127-134, 2015.

KNOX, D. P.; REDMOND, D. L.; NEWLANDS, G. F.; SKUCE, P. J.; PETTIT, D.; SMITH, W. D. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology**, 33, 11, 1129-1137, 2003.

KNOX, M. R.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, 139, 385-393, 2006.

KRYCHAK-FURTADO, S.; PALHANO, A. L.; FUNAYAMA, S.; DIAS, J. DE F. G.; CERDEIRO, A. P. DOS S. Uso de própolis de *Apis mellifera* no controle do desenvolvimento dos ovos de Trichostrongilídeos de pequenos ruminantes. **Revista eletrônica Bociência, Biotecnologia e Saúde**, 3, 2, 2011.

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

KUMARAN, A. M.; D'SOUZA, P., AGARWAL, A., BOKKOLLA, R. M., & BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, 17, 8, 957, 2003.

KUSANO, M.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 64, 2559–2568, 2000.

LAKSHMI, V.; JOSEPHB, S. K.; SRIVASTAVAA, S.; VERMA S. K; SAHOO, M. K.; DUBE, V.; MISHRAA, S. K.; MURTHY, P. K. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malay*. **Acta Tropica**, 116, 2, 127-133, 2010.

LE JAMBRE, L. F. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. **Internacional Journal Parasitology**, 25, 269-273, 1995.

LIBÉRIO, S. A.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO-NETO, V.; RIBEIRO, M. N. S. **Composições farmacêuticas e odontológicas à base de geoprópolis e uso dessas composições**. BR n. PI 0905583-5 A2, 22/12 2009.

LIBÉRIO, S. A. **Efeitos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* sobre a microbiota cariogênita: prospecção de um produto.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

LIBÉRIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A.; DUTRA, R. P.; ARAMYS, S. R.; ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 11, 1-10, 2011.

LIMA, W. C.; ATHAYDE, A. C. R.; MEDEIROS, G. R.; LIMA, D. A. S. D.; BORBUREMA, J. B.; SANTOS, E. M.; VILELA, V. L. R.; AZEVEDO, S. S. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 12, 1003-1009, 2010

LIU, Y.; Xie, M. X.; Kang, J.; Zheng, D. Studies on the interaction of total saponins of panax notoginseng and human serum albumin by fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 59, 12, 2747-2758, 2003.

LOUREIRO, C. M. B. **Redução de verminoses, parâmetros hematológicos e bioquímicos de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, São Paulo, 2007.

LOUVANDINI, H.; CANOVA, E. B.; DE CAMPOS, F. C.; ABDALLA, A. L.; MCMANUS, C. M.; KATIKI, L. M.; AMARANTE, A. F. T. Resistência anti-helmíntica em ovinos e caprinos. In: COSTA JUNIOR, L. M.; AMARANTE, A. F. T. (Org.). **Controle de Helmintos de Ruminantes no Brasil**. 1ed., São Paulo: Paco Editorial, v. 1, p. 185- 202, 2015.

LUOGA, W.; MANSUR, F.; BUTTLE, D. J.; DUCE, I. R.; GARNETT, M. C.; LOWE, A.; BEHNKE, J. M. The relative anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases on intestinal nematodes. **Journal of Helminthology**, 89, 2, 165-174, 2015.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M.; DE OLIVEIRA, L. M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L.; VIEIRA, L. D. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; TOMÉA, A. DA R.; NASCIMENTO, N. R. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, 173, 1-2, 93-98, 2010.

MACHADO, G. M. C; LEON, L. L; CASTRO, S. L. Activity of brazilian and bulgarian propolis against different species of Leishmania. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. 102, 1, 73-77, 2007.

MACIEL, W. G.; FELIPPELLI, G.; LOPES, W. D. Z.; TEIXEIRA, W. F. P.; CRUZ, B. C.; SANTOS, T. R. D.; BUZZULINI, C.; FAVERO, F.; GOMES, L. C.; DE OLIVEIRA, G. P.; DA COSTA, A. J.; DE MATOS, L. V. S. Helminth fauna of sheep from the micro region of Jaboticabal, São Paulo State, Brazil. **Ciência Rural**, 44, 3, 492-497, 2014.

MAHIEU, M.; ARQUET, R.; KANDASSAMY, T.; MANDONNET, N.; HOSTE, H. Evaluation of targeted drenching using Famacha method in Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination. **Veterinary Parasitology**, 146, 1-2, 135-147, 2007.

MAKKAR, H.P.S; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, 1, 9, 1371-1391, 2007.

MANRIQUE, A. J.; SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp.* de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Tropical**, 26, 2, 157-166, 2008.

MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R.; FETTERER, R. H. Characterization of the eggshell of *Hemonchus contortus* – I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 103B, 3, 681-686, 1992.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, 19, 5, 529-535, 1996.

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of *Curcubita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 161, 1-2, 99-105, 2009.

MARTINS, A. C. L.; RÊGO, M. M. C.; CARREIRA, L. M. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico de mel de tíuba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae), **Acta Amazonica**, 41, 2, 183 – 190, 2011.

MATTOS, M. J. T.; SCHMIDT, V.; BASTOS, C.D. Atividade ovicida de dois fármacos em caprinos naturalmente parasitados por nematódeos gastrintestinais, RS, Brasil. **Ciência Rural**, 30, 5, 893-895, 2000.

MAVROT, F.; HERTZBERG, H.; TORGERSON, P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, 8, 557, 1-11, 2015.

MCCLURE, S. J. Mucosal delivery of native and recombinant protein vaccines against *Trichostrongylus colubriformis*. **Internacional Journal Parasitology**, 39, 599-606, 2009.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S. ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a antihelmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, 33, 2, 339-344, 2003.

MELO, A.C.F.L. **Caracterização do nematódeo de ovinos *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis no estado do Ceará, Brasil.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2005.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, 10, 1, 294-300, 2009.

MELO, L.; VILELA, V.; FEITOSA, T., NETO, J. A.; MORAIS, D. Resistência anti-helmíntica em pequenos ruminantes do semiárido da Paraíba, Brasil. **Ars Veterinaria**, 29, 2, 104-108, 2013.

MIN, B.R.; MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T.; MCNABB, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 106, 1, 3-19, 2003.

MOLAN, A. L.; MEAGHER, L. P.; SPENCER, P. A.; SIVAKUMARAN, S. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, 33, 14, 1691-1698, 2003.

MOLENTO, M. B.; GAVIÃO, A. A.; DEPNER, R. A.; PIRES, C. C. Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA method compared with preventive control in ewes. **Veterinary Parasitology**, 162, 3-4, 314-319, 2009.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, 34, 1139-1145, 2004.

MONDAL, H., HOSSAIN, H., AWANG, K., SAHA, S., RASHID, S. M. U., ISLAM, M. K., RAHMAN, M.S., JAHAN, I.A., RAHMAN, M.M., SHILPI, J. A. Anthelmintic activity of ellagic acid, a major constituent of *Alternanthera sessilis* against *Haemonchus contortus*. **Pakistan Veterinary Journal**, 35, 1, 58-62, 2015.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, 28,5, 892-896, 2005.

MOURA, L. P. P., SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; FRANCO, S. L.; RIBEIRO, M. C. M. Efeito da solução hidroalcolica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocisto por grama de fezes de *Eimeria ssp* em coelhos Nova Zelândia branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 27, 2, 320-325, 1998.

MUIR, J. P. The multi-faceted role of condensed tannins in the goat ecosystem. **Small Ruminant Research**, 98, 1-3, 115-120, 2011.

NARKOWICZ, C. K.; BLACKMAN, A. J.; LACEY, E.; GILL, J. H.; HEILAND, K.; CONVOLUTINDOLE, A.; CONVOLUTAMINE, H. New nematocidal brominated alkaloids

from the marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Journal of Natural Products**, 65, 938–941, 2002.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 446 p., 1997.

NOVA, L. E. V.; COSTA, M. E.; DE MELO, P. G. C. F.; CUNHA FILHO, L. F. C.; JUNIOR, F. A. B.; DA SILVA, L. C.; OKANO W.; BOGADO, A. L. G. Resistência de nematoides aos anti-helmínticos nitroxinil 34% e ivermectina 1% em rebanho ovino no município de São João do Ivaí, Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 8, 1, 159-171, 2014.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, 16, 16, 2191-2217, 2011.

OLIVEIRA, G. C. **Efeito de *Clitoria fairchildiana* e *Acacia mangium* sobre *Trichostrongilídeos* de caprinos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, 2014.

OLIVEIRA, L. D. R. **Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo***. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2013.

OLIVEIRA, L. M. B. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, 41,11,1967-1974, 2011.

ONDA, M.; TAKIGUCHI, K.; HIRAKURA, M.; FUKUSHIMA, H.; AKAGAWA, M.; NAOI, F. Studies on the constituents of *Bocconia cordata*. Part I. On nematocidal alkaloids. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, 39, 168–170, 1965.

ORSOLIC, N; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal Ethnopharmacology**, 102, 37–45, 2005.

PAIVA; L. J. M.; NEVES, M. F.; Controle Orgânico de Parasitas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 7, 12, 2009.

PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Small Ruminant Research**, 76, 99-103, 2008.

PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J. Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese medicinal plant, *Evodia rutaecarpa*. **Planta Medica**, 61, 276–278, 1995.

PESSOA, L.M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, 109, 1-2, 59-63, 2002.

PHIRI, A. M.; POMERAI, D.; BUTTLE, D. J.; BEHNKE, J. M. B. Developing a rapid throughput screen for detection of nematicidal activity of plant cysteine proteinases: the role of *Caenorhabditis elegans* cystatins. **Parasitology** 141, 2, 164-180, 2013.

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

POTTER, S.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; POLLACK, J.; LONE, T. A.; BERBER-JIMÉNEZ, M. D. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41, 8, 1287-1291, 1993.

PRINCIPAL, J.; HERNÁNDEZ, I.; D'AUBETERRE, R., RODRIGUEZ J. G.; Eficacia del propóleo en el control de las helmintiasis de ovinos naturalmente infestados. **Revista Científica**, 12, 2, 604-607, 2002.

QUIJADA, J.; FRYGANAS, C.; ROPIAK, H. M.; RAMSAY, A.; MUELLER-HARVEY, I.; HOSTE, H. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63, 28, 6346-6354, 2015.

RABEL, B.; MCGREGOR, R.; DOUCH, P. G. C., Improved bioassay for stimulation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. **International Journal of Parasitology**, 24, 671–676, 1994.

REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T; CAPUTO, L. R. G.; PATRÍCIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 9-10, 43-52, 2000.

RIBEIRO, M. H. M.; LUZ, C. F. P.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Pollen analysis of geopropolis of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 (*Meliponini*, Apidae, Hymenoptera) in areas of restinga, cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. **Grana**, 52, 2, 81-92, 2013.

RIBEIRO, M. H. M.; DE ALBUQUERQUE, P. M. C.; DA LUZ, C. F. P. Pollen profile of geopropolis samples collected of “Tiúba” (*Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith 1854) in areas of cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, 1-18, 2016.

RIBEIRO-JUNIOR, J. A., FRANCHIN, M., CAVALLINI, M. E., DENNY, C., ALENCAR, S.M., IKEGAKI, M., ROSALEN, P. L. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015, 1-5, 2015.

RIET-CORREA, B.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido nordestino: controle integrado das parasitoses gastrointestinais visando contornar a resistência anti-helmíntica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, 7, 901-908, 2013.

RIGHI, A.A., ALVES, T.R., NEGRI, G., MARQUES, L.M., BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91, 2363–2370, 2011.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L. J.; GREER, A.; BARTLEY, Y.; BARTLEY, D. J.; GRANT, G.; HUNTLEY, J. F. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. **Veterinary Parasitology**, 186, 3-4, 390-8, 2012.

RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a antihelmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27, 4, 162-166, 2007.

SAEKI, E. K.; MELLO-PEIXOTO, E. C. T.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSSO, P. F.; MONTEIRO, R. M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Vetrinária Basileira**, 5, 284-290, 2011.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 25, 1, 3-17, 2016.

SALLES, H. O.; BRAGA, A. C. L.; NASCIMENTO, M. T. S. C.; SOUSA, A. M. P.; LIMA, A. R.; VIEIRA L. S. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, 2, 136-143, 2014.

SANGSTER, N. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **International Journal for Parasitology**, 32, 637-653, 2002.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. Brasília: Embrapa-SPI; Sobral: Embrapa-CNPC, 220p, 1996.

SATOU, T.; KOGA, M.; MATSUHASHI, R.; KOIKE, K.; TADA, I. ; NIKAIDO, T., Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, 104, 131–138, 2002.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; AIDAR, D. S.; SILVA, E. C. A.; CARVALHO, C. A. L.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native brazilian stingless bees. **Apidologie**, 38, 93-103, 2007.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap. 27, p.711-734.

SCHEUERLE, M.; MAHLING, M.; MUNTWYLER, J.; PFISTER, K. The accuracy of the FAMACHA©-method in detecting anaemia and haemonchosis in goat flocks in Switzerland under field conditions. **Veterinary Parasitology**, 170, 71-77, 2010.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30, 3, 229-236, 2010.

SEBRAE. **Panorama da ovinocaprinocultura no Brasil**. (2012). Disponível em: <http://www.sebrae.com.br>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2016.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, 133, 253–260, 2011.

SHRUTHI, E.; SUMA, B. Health from the hive: potential uses of propolis in general health. **International Journal of Clinical Medicine**, 3, 159-162, 2012.

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

SILVA, H. M. **Parasitismo Gastrintestinal em Diferentes Intensidades de Pastejo no Capim Tanzânia, em Caprinos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Produção animal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SILVA, R. A; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, 36, 1842-1848, 2006.

SILVA, S. S.; MIRANDA, M. M.; COSTA, I. N.; WATANABE, M. A. E.; PAVANELLI, W. R.; FELIPE, I.; SFORCIN, J. M.; CONCHON-COSTA, I. Leishmanicidal activity of brazilian

propolis hydroalcoholic extract in *Leishmania amazonenses*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 36, 2, 25-34, 2015.

SILVA, V. C. DA, C.; MÁRIO, G. DE B.; HÉLCIO, R.; SILVA, S. L. C. Atividade anti-helmíntica dos flavonóides isolados das raízes de *Andira anthelmia* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 4, 573-576, 2008.

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

SMITH, W. D.; ZARLENGA, D. S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, 139, 4, 347-349, 2006.

SOARES, A. M. D. S.; ARAÚJO, S. A. D.; LOPES, S. G.; COSTA JUNIOR, L. M. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 24, 4, 396-401, 2015.

SOBKOWIAK, R.; KOWALSKI, M.; LESICKI, A. Concentration and time dependent behavioral changes in *Caenorhabditis elegans* after exposure to nicotine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 99, 365–370, 2011.

SOTO-BARRIENTO, N.; OLIVEIRA, J.; VEJA-OBANDO, R.; MONTERO-CABALLERO, D.; VARGAS, B.; HERNÁNDEZ-GAMBOA, J.; OROZCO-SOLANO, C. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. **Revista Biología Tropical**, 59, 1, 37-52, 2011.

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

SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 1-5, 2013.

SOUZA, S.A.; DIAS, T.L.M.F.; SILVA, T.M.G.; FALCÃO, R.A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; SILVA, E.M.S.; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, 61, 4, 560-565, 2014.

SPRENGER, L. K.; BUZATTI, A.; CAMPESTRINI, L.H.; YAMASSAKI, F.T.; MAURER, J.B.B.; BAGGIO, S.F.Z.; MAGALHÃES, P.M.; MOLENTO, M.B. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, 67,1, 25-31, 2015.

SRIVASTAVA, S.; PRASAD, D.; SINGH, R. P. Antinemic studies of the chemical constituents of the leaves of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. **Annals of Plant Protection Sciences**, 8, 183–186, 2000.

STARLING, R. Z. V. C. **Diagnóstico *in vivo* da sensibilidade de nematoides a diferentes antihelmínticos em ovinos do município de Alegre, Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado e, Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2015.

STEPEK, G.; BEHNKE, J. M.; BUTTLE, D. J.; DUCE, I. R. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? **Trends in Parasitology**, 20, 7, 322-327, 2004.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasites of sheep and goats. **Veterinary Parasitology**. 3, 152-165, 2007.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.3. p.133-156, 2010.

TIRABASSI, A. H.; MADEIRA, H. M. F.; OLLHOFF, R. D.; SOTOMAIOR, C. S. Manejo integrado de parasitos como alternativa sustentável na produção de pequenos ruminantes. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, 11, 3, 322-338, 2013.

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

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Smaller Ruminants Research**, 77, 159-173, 2008.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO C. A.; HOSTE, H.; AGUILAR, C.; CÁMARA-SARMIENTO, R.; ALONSO-DIAZ, M. A. Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. **Small Ruminant Research**, 103:28-40, 2012.

TORRES-GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ-RIVERA, P.; DUARTE-LISCI, G.; LÓPEZ-RAMÍREZ, Á.; CORREA-BENÍTEZ, A.; RIVERO-CRUZ, J. F. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. **Natural product research**, 30, 2, 237-240, 2016.

UENO, H; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Toqui: Japan International Cooperation Agency, 149p., 1998.

VAN WYK, J. A. Refugia- Overlooked as perhaps the most important factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 68, 1, 55-57, 2001.

VASCONCELOS, A.L.C.F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. Tese (Doutorado em Reprodução e Sanidade Animal) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

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

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

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

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista Ciência e Tecnologia Agropecuária**, 2, 28-31, 2008.

VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D.; HALL, J. O.; LISONBEE, L. D. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. **Journal of Animal Science**, 88, 6, 2189-2198, 2010.

VLASSOFF, A.; LEATHWICK, D. M.; HEATH, A. C. G. The epidemiology of nematode infections of sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, 49, 6, 213- 221, 2001.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, 147, 116-139, 2008.

WAGLAND, B. M.; JONES, W. O.; HRIBAR, L.; BENDIXSEN, T.; EMERY, D.L. A new simplified assay for larval migration inhibition. **International Journal of Parasitology**, 22,183–1185, 1992.

WALLER, P. J.; BERNES, G.; THAMSBORG, S. M.; SUKURA, A.; RICHTER, S. H.; INGEBRIGTSEN, K.; HOGLUND, J. Plants as deworming agents of livestock in the Nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 42, 1, 31-44, 2001.

WANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; ZHU, S.; LI, Y.; LI, M.; YU, B. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15,7, 2528- 2532, 2007.

WILLIAMS, P. Review of modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. **Journal of Natural Products**, 75, 1, 1261–1261, 2012.

WINK, M. E. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Corrent Drug Metabolism**, 9, 996-1009, 2008.

YOON, Y. A.; KIM, H.; LIM, Y.; SHIM, Y. H. Relationships between the larval growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by apigenin derivates and the structures. **Archives of Pharmacal Research**, 29, 6, 582-586, 2006

ZACHARIAS, F. Parasitismo em Pequenos Ruminantes: Novos Conceitos. **Bahia Agrícola**. 6, 3, 17-25, 2004.

ZAJAC, A. M. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics and diagnosis. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, 22, 529-541, 2006.

ANEXOS

Aceite para publicação do artigo

Enviadas: Sexta-feira, 25 de março de 2016 9:58:02
Assunto: AA-2016-0003.R4 - Parecer- Acta Amazonica

25-Mar-2016

Prezada autora Maria Nilce Sousa Ribeiro,

Temos a satisfação de informar a Vossa Senhoria a conclusão da avaliação do seu manuscrito AA-2016-0003.R4 submetido à Acta Amazonica.

A Comissão Editorial concluiu que a sua submissão tem mérito científico para ser aceita para publicação. Por isso foi repassada ao "Setor de Produção" para continuidade do processo.

Por favor observe os prazos estabelecidos pelo Setor de Produção.

Em nome da Revista agradecemos a sua contribuição.

Atenciosamente,

Acta Amazonica Editorial Office

AA-2016-0003.R4 -"Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by Melipona fasciculata (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil"

PS: Para informação adicional sobre o seu manuscrito, por favor entre em contato com o Setor de Produção (acta@inpa.gov.br). Informar ID do manuscrito.

Scope • Policy • Instructions for Authors

(Revised January 2016)

Contents (click on the topic)

1. **Submission of Manuscripts** | 2. **Journal Scope** | 3. **Journal Categories** | 4. **Manuscript Types** | 5. **Ethics, Conflict of Interest** | 6. **Author List and ORCID ID** | 7. **Editorial Peer Review Process** | 8. **Manuscript Preparation** – Title and Authorship – Abstract and Keywords – Introduction – Materials and Methods – Results and Discussion – Abbreviations and Nomenclature – Acknowledgment – References – Tables and Artwork – Table of Contents Graphics – Supporting Information – Currently Acceptable Word-Processing Packages – Word-Processing Details | 9. **Revisions and Resubmissions** | 10. **Journal Publishing Agreement** | 11. **Proofs and Reprints** | 12. **Reporting Specific Data**

1. IMPORTANT MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS

Manuscripts and revised manuscripts must be submitted via the ACS Paragon Plus Web site (<http://paragonplus.acs.org/login>). E-mailed submissions and hardcopy submissions will not be processed. An overview of and complete instructions for the Web submission process are available at the ACS Paragon Plus Web site.

When submitting, please be aware of the following requirements:

- All manuscripts must be accompanied by a **cover letter** that includes an **explicit statement on the manuscript's significance** (not a summary of the abstract), including its originality, its contribution to new knowledge in the field, and its relevance to research in agricultural and food chemistry.
- All **coauthors** listed on the title page of the manuscript must be entered into the Paragon Plus System at step 2 in the manuscript submission process. Only one corresponding author is allowed for each manuscript in Paragon Plus. Additional corresponding authors may be designated on the manuscript title page. Use of the phrase “all authors contributed equally” is discouraged. Instead, statements about author contributions should identify the specific aspect of the author's contribution.

- The **manuscript abstract and text** must appear in a single, double-spaced column; lines in the abstract and text must be numbered consecutively from beginning to end in a separate column at the left. There is **no separate conclusion section** to be used; conclusions should be incorporated into the results and discussion section. All of the manuscript text (including title page, abstract, all sections of the body of the paper, figure captions, scheme or chart titles and footnotes, and references) and tabular material should be in **one file**, with the complete text first followed by the tabular material.
- To ensure that a submitted manuscript meets **sufficient interest of the readership** of the journal, it is expected that articles recently published on the respective topic in the *Journal of Agricultural and Food Chemistry* are cited to a reasonable extent. In general, **references** must be numbered in the order in which they appear in the text.
- The author's preference for **manuscript category** is indicated during the submission process. However, the final decision on the category under which the manuscript will be listed lies with the Editor.
- The system requires authors to supply the names, e-mail addresses, and affiliations of at least **four recommended reviewers**. The recommended reviewers should be experts in the subject matter of the manuscript and not be anyone who is or has been a former adviser/advisee, colleague in the same institution, research collaborator, and/or coauthor of papers and patents or in any other way has a conflict of interest.
- If the manuscript is one of a series of **companion manuscripts** that will be published sequentially, please describe the planned series in the cover letter, mentioning previously published parts and giving an estimate of when subsequent parts will be submitted.
- Authors selecting the ***Just Accepted*** manuscript option when submitting should be sure that the form of author and coauthor names as entered into the Paragon Plus System is identical to the form on the manuscript title page.

Complete instructions for manuscript preparation and the Journal Publishing Agreement form are updated frequently and are available at the *Journal's* Web site. Please conform to these instructions when submitting manuscripts.

<p>Authors whose manuscripts are published in <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> will be expected to review manuscripts submitted by other researchers from time to time.</p>
--

2. JOURNAL SCOPE

The *Journal of Agricultural and Food Chemistry* considers high-quality, original research representing complete studies and scientific advances dealing with the innovative application of chemistry, biochemistry and biological sciences to increase the molecular understanding of product attributes, processes, technologies, and health aspects encompassing the agricultural-food-nutrition continuum.

Manuscripts are expected to involve chemistry, biochemistry and/or molecular biology as the fundamental component and can be combined with novel aspects of process engineering and food technology, authenticity and origin aspects of food, or the biological evaluation of agricultural systems including plant-plant, plant-fungal and plant-insect interactions, and/or food systems. The latter may include microbial, nutritional, physiological, sensory, or toxicological properties, and data must accompany sufficient discussion to demonstrate their relevance to food and nutrition.

Research considered for publication should be of general interest to the scientific community and/or the public, its potential impact should be significant and the technical quality is expected to conform to the highest standards of chemical research.

Current specific categories are as follows:

- Agricultural and Environmental Chemistry
- Bioactive Constituents, Metabolites, and Functions
- Biofuels and Bio-based Materials
- Biotechnology and Biological Transformations
- Chemistry and Biology of Aroma and Taste
- Food and Beverage Chemistry/Biochemistry
- Food Safety and Toxicology
- Functional Structure/Activity Relationships
- New Analytical Methods
- Omics Technologies Applied to Agriculture and Food

These categories are periodically reviewed and may be changed.

3. JOURNAL CATEGORIES

• **Agricultural and Environmental Chemistry**

to advance molecular knowledge (e.g., crop protection chemistry, nanotechnology, natural toxins, fate and biotransformation of residues), elucidate mechanisms of action of agrochemicals, understand mechanisms of plant-plant, plant-fungal and plant-insect interactions including the action of bioactive constituents in desirable plants on control of pests that threaten them, and promote innovative solutions for increased agricultural productivity, a sustainable supply of food and fiber, and protection of public health and the environment including water quality/treatment, agricultural waste, and energy-related issues.

• **Bioactive Constituents, Metabolites, and Functions**

to increase knowledge of chemical structures of bioactive constituents, phytonutrients, and nutraceuticals in foods, their human and animal metabolism, and their mechanisms of biological function to affect human health status, including various aspects of molecular nutrition such as nutritional biochemistry, nutrigenomics and metabolomics. Studies on traditional medicines and herbal remedies are outside the scope of this category. It is mandatory that manuscripts reporting on biological properties of crude extracts include detailed information on the chemical composition of the extracts causing the described properties.

Manuscripts can encompass cell-based or other in vitro assays, animal models, clinical human trails, or a combination thereof as the fundamental component, however, test systems applied must be appropriate and the analytical method used should allow the quantitation of time and dose response effects. It is understood that discussion on nutritional relevance and conclusions on human health aspects are carefully formulated considering the experimental design used (appropriate cell test lines, significance of test/trial, relevant dose levels) and the data obtained.

• **Biofuels and Biobased Materials**

to advance knowledge of chemistry, biology, and processing of biobased products and biofuels including all the related areas of biodiesel, bioethanol, biogas, biotransformations and bioprocesses (plants, algae etc.), waste utilization, biorefinery and bioresource technologies associated with conversion or production of biobased materials, and sustainability, and environmental emissions and effects associated with these processes.

• **Biotechnology and Biological Transformations**

to foster technological advances in plant/agricultural biotechnology (e.g., crop improvement, nutraceuticals, bioenergy, transgenic plants, phytoremediation), microbial and insect biotechnology (metabolic engineering and synthetic/systems biology of bacteria, fungi, insects, yeasts and algae in the context of fermentation/bioproduction, biocatalysis, bioremediation, biodegradation), food and flavor biotechnology (biotransformations/microbiology and metabolic aspects of food/beverage systems), and protein and enzyme technology (recombinant proteins/enzymes, cell-free protein expression systems, and biocatalysis using immobilized enzymes).

• **Chemistry and Biology of Odor and Taste**

to advance molecular knowledge of the instrumental analysis (e.g. bioelectronics sensors), chemical structures, and formation pathways of aroma and taste molecules of plant and animal derived foods and beverages, the chemosensory receptors mediating flavor object recognition (e.g. *in vitro* cell assays), human *in vivo* psychophysics (incl. multisensory integration), and neurological processing of flavor stimuli (imaging technologies).

• **Food and Beverage Chemistry/Biochemistry**

to deepen the fundamental understanding of chemical structures, structural modifications, interactions, and (bio)chemical transformations of minor and major components in foods and beverages, potentially in combination with novel aspects of process engineering, food technology, nanotechnology, packaging and storing, authenticity and origin aspects of food, or the biological evaluation of food and beverage systems.

• **Food Safety and Toxicology**

to advance our knowledge of detrimental health effects and the mechanisms of adverse physiological, or pathological changes induced by natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on foods, crop protection chemicals, contaminants and related chemicals (e.g., nanomaterials, biotechnologically derived products), including agricultural safety and consumer product safety, and the design and action of chemically related processes that enhance food safety.

• **Functional Structure/Activity Relationships**

to increase the knowledge on the relationship between chemical structure and biological (microorganisms, insects, animals, human) or technofunctional activity (e.g., Emulsifying, foaming, gelation) of agricultural and food components.

This category comprises (i) organic synthetic studies and/or structural biological studies (X-ray, NMR, etc.) of relevant ligands and targets with the aim of investigating molecular recognition processes in the action of biologically active compounds, (ii) molecular biological studies (e.g., site-directed mutagenesis) of macromolecular targets that lead to an improved understanding of molecular recognition, and (iii) computational studies that analyze the SAR of compounds of interest and lead to experimental studies or analysis of other available chemical and/or biological data that substantially advance the knowledge in agricultural and food chemistry.

Routine extensions of existing series that do not add significantly to a basic understanding of the structure-activity relationship (SAR) of the series or do not utilize novel chemical/biological approaches will normally not be considered for publication.

- **New Analytical Methods**

to expand the repertoire of analytical methods in agriculture and food research by new analytical method development using chemical, physical, and biological principles. Manuscripts dealing with existing analytical methods should offer a significant, original application of the method or a major improvement going far beyond state-of-the-art.

For manuscripts describing the application of an existing method, even when modified, the category selected should be driven by the application (e.g., Agricultural and Environmental Chemistry, Bioactive Constituents, Metabolites, and Functions, etc.).

- **Omics Technologies Applied to Agriculture and Food**

to promote a more integrative understanding of complex systems in agriculture, food, and nutrition by the application of metabolomics, proteomics, and transcriptomics/genomics technologies combined with, but not limited to, bioinformatics and computational biology.

It is mandatory that manuscripts in this category go beyond a sheer holistic fingerprinting of samples, i.e. metabolic changes need to be identified on a molecular level and validated by means of targeted analysis.

4. MANUSCRIPT TYPES

• **RESEARCH ARTICLES** must report **original research** that is expected to have a definable **impact** on the advancement of science and technology, incorporating a significant component of **innovative chemistry and/or molecular biology**. Novel experimental results, theoretical treatments, interpretations of data, and absence of prior publications on the same/similar topics will document originality. Fragmentation of work into an incremental series of manuscripts is not acceptable.

• **LETTERS** are manuscripts describing results deemed to be highly important and urgent in a field of research. **Only manuscripts reporting complete research, as opposed to preliminary results, will be considered.** The cover letter for these manuscripts must clearly describe why the results are timely and urgent enough to justify the Letters format. In addition, the abstract must also make this plain to the reader. If deemed appropriate by the editors for the format, these manuscripts will be subject to the normal, but expedited, peer review process.

• **REVIEW ARTICLES** will be considered that comprehensively summarize information in a field in which the literature is scattered and/or treat published data or other information so as to provide a new approach or stimulate further research. Authors considering the preparation of a review may contact the Editor with any questions.

• **PERSPECTIVES** are expected to explore needs and opportunities in agricultural and food chemistry in a less technical format than a Review Article. Authors are invited to contact the Editor with any questions before submitting a Perspectives manuscript. For an example, see *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 1155–1159 (DOI: [10.1021/jf305122s](https://doi.org/10.1021/jf305122s)). Perspectives summarizing highlights of symposia will also be considered. For an example, see *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 4676–4691 (DOI: [10.1021/jf305281c](https://doi.org/10.1021/jf305281c)).

• **COMMENTS** related to published papers will be considered from readers if the correspondence is **received within six months of the date of publication of the original paper**; the authors of the original paper will be given the **opportunity to reply** to such comments within two months, if they so desire. Both comments and replies should not exceed 1000 words each, including citations, and will be published consecutively in the same issue of the *Journal* after peer review. For examples, see *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63, 5305–5306 (DOI: [10.1021/jf506172q](https://doi.org/10.1021/jf506172q)) and *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63, 5307–5307 (DOI: [10.1021/acs.jafc.5b01143](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01143)).

• **ADDITIONS/CORRECTIONS** may be used to address important issues or correct errors and omissions of consequence that arise after publication of an article. Additions and Corrections may be requested by the author(s) or initiated by the Editor after discussions with the corresponding author. Readers who detect errors of consequence in the work of others should contact the corresponding author of that work. All Additions and Corrections are subject to approval by the Editor, and minor corrections and additions will not be published. Additions and Corrections from authors should be submitted via the ACS Paragon Plus environment by the corresponding author for publication in the “Addition/Correction” section of the *Journal*. The corresponding author should obtain approval from all of the article coauthors prior to submitting an Addition and Correction or provide evidence that such approval has been solicited. The Addition and Correction should include the original article title and author list, citation including DOI, and details of the correction. For proper formatting, see examples in a current issue of the *Journal*.

SYMPOSIA or TOPICAL COLLECTIONS comprise a series of manuscripts reporting or synthesizing original research that are presented in a symposium or otherwise clustered around a single topic. Prospective organizers should **contact the Editor well in advance** to determine whether the subject matter conforms to the *Journal's* goals, criteria, and available space and to obtain specific instructions for submission of the manuscripts. Each manuscript will be subject to the normal peer-review process. For an example, see *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63, 5837–5840 (DOI: [10.1021/acs.jafc.5b00324](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00324)) and *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63, 5099–5099.(DOI: [10.1021/acs.jafc.5b00159](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00159))

RETRACTION of articles may occur for scientific or ethical reasons. Articles that contain seriously flawed or erroneous data such that their findings and conclusions cannot be relied upon may be retracted to correct the scientific record. Retractions may be requested by the article author(s) or by the journal Editor(s), but are ultimately published at the discretion of the Editor. When an article is retracted, a notice of retraction will be published containing information about the original article title, author list, and the reason for the retraction. Retracted articles will be accompanied by the related retraction notice and will be marked as “Retracted”. The originally published article will remain on the web except in extraordinary circumstances (e.g., when deemed legally necessary or if the availability of the published content poses public health risks). The American Chemical Society follows guidance from the Committee on Publication Ethics (COPE) when considering retractions; for more information see <http://publicationethics.org/>.

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscript Format. Manuscripts must be prepared using accepted word-processing software, and all parts must be **double-spaced**. All pages must be numbered consecutively starting with the title page and including tables and figures. **Lines in the abstract and text should be numbered consecutively from beginning to end in a separate column at the left. Do not put line numbers on pages with tables or figures.** A standard font, in a size of 12 points or greater, must be used. The *Journal* has a **20 typed page limit**, not including references, tables, and figures. Authors must request approval from the Editor in Chief to submit manuscripts exceeding 20 typed pages.

Standard American English usage is required. Authors who are not familiar with standard American English are urged to seek assistance; deficiencies in grammar may be a serious hindrance during the review process.

Assistance with English Language Editing. Authors may want to have their manuscripts edited professionally before submission to improve clarity. The ACS ChemWorx English Editing Service can assist you in improving and polishing the language in your manuscript. You can learn more about the services offered, at <http://es.acschemworx.acs.org>.

The ACS Style Guide (3rd ed., 2006; ISBN 0-8412-3999-1), available from Oxford University Press, Order Department, 201 Evans Road, Cary, NC 27513, provides a detailed treatment of the fundamentals of manuscript preparation. Refer to a current issue of the *Journal* for general style.

The style guide is also available at the Journal's Web site and through ACS ChemWorx.

The various sections of the manuscript should be assembled in the following sequence:

- Title and authorship (single page)
- Abstract and keywords (single page)
- Introduction
- Materials and Methods (including Safety information)
- Results/Discussion
- Abbreviations Used
- Acknowledgment
- Supporting Information description
- References
- Figure captions
- Tables
- Figure graphics
- Graphic for table of contents

TITLE, AUTHORSHIP, AND KEYWORDS

The title, authorship, and institutional affiliations should be included on a single page.

Title. The title should be specific, informative, and concise. Keywords in the title assist in effective literature retrieval. If a plant is referred to in the title or elsewhere in the text by its common or trivial name, it should be identified by its scientific name in parentheses immediately following its first occurrence. This term should also be provided as one of the keywords. If trade names are mentioned, give generic names in parentheses.

Authorship. Be consistent in authorship designation on the manuscript and on all correspondence. **First name, middle initial, and last name** are generally adequate for correct identification, but omit titles. Give the complete mailing address of all institutions where work was conducted and identify the affiliation of each author. If the current address of an author is different, include it in a footnote on the title page. The name of the author to whom inquiries about the paper should be addressed must be marked with an asterisk; provide the telephone and e-mail address of this correspondent.

Keywords. Provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval. The keywords are published immediately before the text, following the abstract.

ABSTRACT

Authors' abstracts are used directly for *Chemical Abstracts*. The abstract should be a clear, concise (100–150 words), one-paragraph summary, informative rather than descriptive, giving scope and purpose, experimental approach, significant results, and major conclusions. Write for literature searchers as well as journal readers.

INTRODUCTION

Discuss relationships of the study to previously published work, but do not reiterate or attempt to provide a complete literature survey. Use of *Chemical Abstracts/Scifinder* and other appropriate databases is encouraged to ensure that important prior publications or patents are cited and that the manuscript does not duplicate previously published work. **The purpose or reason for the research being reported, and its significance, originality, or contribution to new knowledge in the field, should be clearly and concisely stated. Current findings should not be included or summarized in this section.**

MATERIALS AND METHODS

Authors are required to call special attention in their manuscripts to safety considerations such as explosive tendencies, special precautionary handling procedures, and toxicity.

Apparatus, reagents, and biological materials used in the study should be incorporated into a general section. List devices of a specialized nature or instruments that may vary in performance, such that the model used may affect the quality of the data obtained (e.g., spectroscopic resolution).

List and describe preparation of special reagents only. Reagents normally found in the laboratory and preparations described in standard handbooks or texts should not be listed.

Specify the source, vendor [city and state (or city and country if non-U.S.)], and availability of special equipment, reagents, kits, etc. Do not include catalog numbers.

Biological materials should be identified by scientific name (genus, species, authority, and family) and cultivar, if appropriate, together with the site from which the samples were obtained. Specimens obtained from a natural habitat should be preserved by deposit of samples in a herbarium for plants or in a culture collection for microorganisms, with a corresponding collection or strain number listed.

Manuscripts describing studies in which live animals or human subjects are used must include a statement that such experiments were performed in compliance with the appropriate laws and institutional guidelines and **also name the institutional committee that approved the experiments. Authors are encouraged to note the approval code or number or give the**

name of the approving office or official. (See Reporting Specific Data: Animal or Human Studies.) Manuscripts reporting data from inhumane treatment of experimental animals will be rejected.

Specific experimental methods should be sufficiently detailed for others to repeat the experiments unequivocally. Omit details of procedures that are common knowledge to those in the field. Brief highlights of published procedures may be included, but details must be left to the References, and verbatim repeat of previously published methods, even if done by the authors, will not be permitted unless a quotation from a published work is included, and placed in quotation marks, with the reference to the source included at the end of the quotation. Describe pertinent and critical factors involved in reactions so the method can be reproduced, but avoid excessive description. For information on the reporting of certain types of data see Reporting Specific Data.

Describe statistical design and methods in this section.

RESULTS AND DISCUSSION

Results and discussion may be presented in separate sections or combined into a single section, whichever format conveys the results in the most lucid fashion without redundancy. Be complete but concise in discussing findings, comparing results with previous work and proposing explanations for the results observed.

All data must be accompanied by appropriate statistical analyses, including complete information on sampling, replication, and how the statistical method employed was chosen.

Avoid comparisons or contrasts that are not pertinent, and avoid speculation unsupported by the data obtained.

A separate summary or conclusion section is not to be used; any **concluding statements** are to be incorporated under Results and Discussion.

ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE

Standard abbreviations, without periods, should be used throughout the manuscript.

Refer to [The ACS Style Guide](#) for the preferred forms of commonly used abbreviations. Specialized abbreviations may be used provided they are placed in parentheses after the word(s) for which they are to substitute at first point of use and are again defined in this section. Avoid trivial names and “code” abbreviations (e.g., NAR for naringenin) unless such codes are in common usage (e.g., MTBE for methyl *tert*-butyl ether).

If trade names are used, define at point of first use. If nomenclature is specialized, include a “Nomenclature” section at the end of the paper, giving definitions and dimensions for all terms. Use SI units insofar as possible. Refer to [The ACS Style Guide](#) for lists of SI units and a discussion of their use.

Write all equations and formulas clearly and number equations consecutively. Place superscripts and subscripts accurately; avoid superscripts that may be confused with exponents. Identify typed letters and numbers that might be misinterpreted, such as “oh” for zero or “ell” for one. Chemistry numbering requiring primes should be identified as such (i.e., 3,3'-dihydroxy-), not by an apostrophe (e.g., 3,3'-dihydroxy-).

It is the authors' responsibility to provide correct nomenclature. Structures should be included for uncommon chemicals, particularly when the systematic or common name is too complex or

unclear to readily denote the structure. Such structures should be included as a figure or table. All nomenclature must be consistent and unambiguous and should conform to current American usage. Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service, the International Union of Pure and Applied Chemistry, and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Chemical Abstracts* (CA) nomenclature rules are described in Appendix IV of the *Chemical Abstracts Index Guide*. For CA nomenclature advice, consult the Manager of Nomenclature Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012. A name generation service is available for a fee through CAS Client Services, 2540 Olentangy River Road, P.O. Box 3343, Columbus, OH 43210-0334 [telephone (614) 447-3870; fax (614) 447-3747; e-mail answers@cas.org]. In addition, the ACS Web site has links to nomenclature recommendations at <http://chemistry.org>.

ACKNOWLEDGMENT

Include essential credits but hold to an absolute minimum. Omit academic and social titles. Meeting presentation data and acknowledgment of financial support of the work should not be included here; give these instead in a note following the References. It is the responsibility of the corresponding author to notify individuals named in the Acknowledgment prior to submission.

FUNDING SOURCES

When submitting a manuscript to the Journal via ACS Paragon Plus, the submitting author is asked to identify the funding sources for the work presented in the manuscript. Identifying funding sources is optional during submission of an original manuscript. Funding source information is required when a revised manuscript is submitted. Funding should be acknowledged in a separate statement (not in the Acknowledgment paragraph).

REFERENCES

Consult [The ACS Style Guide](#) and current issues of the *Journal* for examples of reference format.

Authors should cite all prior published work directly pertinent to the manuscript. To demonstrate that the submitted manuscript meets sufficient interest of the readership of the journal, **it is expected that articles recently published on the respective topic in the *Journal of Agricultural and Food Chemistry* be cited to a reasonable extent**. As a general guideline, authors should attempt to limit the literature cited to approximately 50 or fewer citations (except for review or perspective manuscripts).

Authors are responsible for the accuracy of their references. References taken from a review or other secondary source should be checked for accuracy with the primary source.

References should be listed on a separate page and numbered in the order in which they are cited in the text.

References should be cited in the text by superscript numbers, for example, ^{1,2-5}, etc.

Give complete information, using the last name and initials of the author, patentee, or equivalent; do not use "Anonymous".

Follow *Chemical Abstracts Service Source Index* for abbreviations of journal titles. Because subscribers to the Web edition of the *Journal* are now able to click on the "Chemport" or other tag following each reference to retrieve the corresponding abstract from various Web resources, reference accuracy is critical.

Typical references follow the styles given below.

For journals:

1. Brown, J.; Jones, M.; Green, D. Article title. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 1–4.
(Issue number must be used if each issue of the periodical begins with page 1.)

For books:

2. Smith, L; Caldwell, A. Chapter title. In *Book Title*, edition no.; Keys, F., Park, G., Eds.; Publisher: City, State (or Country if non-U.S.), Year; Vol. no., pp.

For Web pages:

3. Black, A.; White, B. Page title. URL (<http://...>) (most recent access date).

Papers should not depend for their usefulness on unpublished material, and excessive reference to material “in press” is discouraged. Reference to the authors’ own unpublished work is permitted if the subject is of secondary importance to the manuscript in question, but any unpublished results of central importance must be described in sufficient detail within the manuscript. **If pertinent references are “in press” or unpublished for any reason, furnish copies to enable reviewers to evaluate the manuscript. An electronic copy of these materials should be uploaded according to the directions for review-only Supporting Information. “In press” references should include the Digital Object Identifier (DOI) assigned by the potential publisher.**

TABLES AND ARTWORK

The tables and graphics (illustrations) should be inserted in the manuscript file after the References section. Do not upload tables and graphics that are to be published with the manuscript as Supporting Information files.

Tables and figures should be carefully designed to maximize presentation and comprehension of the experimental data with superfluous information excluded. Useful information not directly relevant to the discussion may be included under Supporting Information.

Tables. Tables may be created using a word processor’s text mode or table format feature. The table format feature is preferred. Ensure each data entry is in its own table cell. Lower case should be used for all table entries unless a capital letter is required. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a line feed (enter) at the end of each row.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be grouped after the figure captions. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by row rather than by column. Each table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings, should make the table, as nearly as possible, self-explanatory. In setting up tabulations, authors are requested to keep in mind the type area of the journal page (17.8 × 25.4 cm), and the column width (8.5 cm), and to make tables conform to the limitations of these dimensions. **Arrangements that leave many columns partially filled or that contain much blank space should be avoided.** Conversely, arrangements that include >20 columns should be broken into two tables if possible. If *significance of values* is to be indicated, use a lower case letter, on line, one space after the value.

Figures and Artwork. The preferred submission procedure is to embed graphic files in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible. Artwork should be sequentially numbered using Arabic numbers. Schemes and charts may have titles and footnotes; figures should have captions. Insert the captions following the References and the graphics after the Tables.

Additional acceptable file formats are TIFF, PDF, EPS (vector artwork), or CDX (ChemDraw file). If submitting individual graphic files in addition to their being embedded in a Word document, ensure the files are named according to graphic function (i.e., Scheme 1, Figure 2, Chart 3), not the scientific name. Labeling of all figure parts should be present, and the parts should be assembled into a single graphic. For EPX files, ensure that all fonts are converted to outlines or embedded in the graphic file. The document setting should be in RGB mode. **Note:** Although EPS files are accepted, the vector-based graphics will be rasterized for production. Please see below for TIFF file production resolutions.

TIFF files (either embedded in a Word document or submitted as individual files) should have the following resolution requirements: black and white line art, 1200 dpi; grayscale art (a monochromatic image containing shades of gray), 600 dpi; color art (RGB color mode), 300 dpi.

The RGB and resolution requirements are essential for producing high-quality graphics within the published paper. Graphics submitted in CMYK or at lower resolution may be used; however, the colors may not be consistent. Graphics of poor quality may not be able to be improved.

Most graphic programs provide an option for changing the resolution when images are saved. Best practice is to save the graphic file at the final resolution and size using the program used to create the graphic.

For bar charts, bars with hatching patterns generally reproduce well. Bars that range in shading from light to dark gray to black can usually be reproduced successfully, although we do not recommend any more than two shades of gray. A legend needs to be included within the figure itself rather than the patterns or shades included in the caption.

For manuscripts containing gel patterns, use of a high-resolution digital scanner is recommended. Only high-quality original, unaltered digital reproductions will allow reviewers to correctly verify the experimental results. For an example of gel patterns see *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (18), 4492–4499 (DOI: [10.1021/jf300563n](https://doi.org/10.1021/jf300563n)).

Only readable and accurately represented images are acceptable; the **Editors reserve the option to reject images that do not satisfactorily support points made in the manuscript or that are not of satisfactory quality for publication.**

The quality of the illustrations published in the *Journal* largely depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. Contrast is important. Each figure or photograph should be properly labeled.

Graphics should be sized at the final production size when possible. Single-column graphics are preferred and can be sized up to 240 points (3.33 in.). Double-column graphics must be sized between 300 and 504 points (4.167 in. and 7 in.). All graphics have a maximum depth of 660 points (9.167 in.) including the caption (please allow 12 points for each line of caption text). Consistently sizing letters and labels in graphics throughout the manuscript will help to ensure consistent graphic presentation for publication. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density. Avoid the use of very large and very small lettering within the same figure.

If artwork that must be reduced will be submitted, use larger lettering and thicker lines so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned parameters.

Avoid using complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect. To show a pattern, choose a simple crosshatch design.

Color illustrations should be submitted **only** if they are essential for clarity of communication. Reproduction of color illustrations will be provided at no cost to the author. Do not submit color prints to be printed in black and white.

Structural Formulas. Structural formulas should be included for all new chemicals and for existing chemicals for which chemical nomenclature and/or trivial names do not convey the structure adequately. Structural formulas are valuable in expressing concisely the precise nature of the compounds under discussion and revealing the essence of the subject to readers unfamiliar with the topic, without their necessary recourse to reference materials. The use of chemical names without accompanying structures may cause readers to overlook the significance of the paper.

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw. Structure drawing preferences (preset in the ACS Stylesheet in ChemDraw) are as follows:

as drawing settings select...	
chain angle	120°
bond spacing	18% of width
fixed length	14.4 points (0.508 cm, 0.2 in.)
bold width	2.0 points (0.071 cm, 0.0278 in.)
line width	0.6 point (0.021 cm, 0.0084 in.)
margin width	1.6 points (0.056 cm, 0.0222 in.)
hash spacing	2.5 points (0.088 cm, 0.0347 in.)
as text settings select...	
Font	Arial or Helvetica
Size	10 points
under preferences choose...	
Units	points
tolerances	3 pixels
under page setup choose...	
Paper	US Letter
Scale	100%

Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two-column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. Also note that a standard sheet of paper is only 21.6 cm wide, so all graphics submitted in two-column format must be prepared and printed in landscape mode.

Use boldface type for compound numbers but not for atom labels or captions.

Authors using other drawing packages should, as far as possible, modify their program's parameters to reflect the above guidelines.

For more information, please visit <http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/index.html>.

TABLE OF CONTENTS GRAPHICS

Authors of research articles, perspectives, and reviews are required to include a suitable graphic for publication in the **table of contents (TOC)** in the Web edition of the *Journal*. Submission of this graphic is mandatory. This graphic should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript's title, give the reader a quick visual impression of the type of chemistry described. Structures should be constructed as specified under Structural Formulas above. The TOC graphic may be up to 3.25 in. (8.5 cm) wide and 1.75 in. (4.75 cm) tall. (See detailed instructions at the Paragon Plus Web site.) Text should be limited to labels for compounds, reaction arrows, and figures. The use of color to enhance the scientific value is encouraged. The TOC graphic should be inserted on a separate page at the end of the manuscript file. A guide to TOC graphics is available here:

(http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/toc_abstract_graphics_guidelines.pdf).

SUPPORTING INFORMATION

Extensive tables, graphs, spectra, calculations, and other material beyond a modest content in the published paper may be included in the Web edition of the *Journal*. These will **not** be part of the published article but can be accessed separately on the Web by readers.

Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript and uploaded separately to the ACS Paragon Plus environment. A [list of acceptable file types](#) is available on the Web. All Supporting Information files of the same type should be prepared as a single file (rather than submitting a series of files containing individual images or structures). For example, all Supporting Information available as PDF files should be contained in one PDF file.

The material should be described in a paragraph inserted between the Acknowledgment and the References sections, using the following format:

Supporting Information. Brief statement in nonsentence format listing the contents of the material supplied as Supporting Information.

Components of the Supporting Information should be clearly labeled with all necessary figure captions and table titles and footnotes.

DO NOT UPLOAD FIGURES AND TABLES THAT ARE TO BE PUBLISHED IN THE ARTICLE INTO THE SUPPORTING INFORMATION FILE. Figures and tables that will appear in the published article are to be inserted in the manuscript directly after the References section.

CONFLICT OF INTEREST

A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see the [Ethical Guidelines](#)). The statement will be published in the final article. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the article: "The authors declare no competing financial interest."