

Antibacterial action of geopropolis of *Melipona quadrifasciata* in cultivation of secretion of otitis in dogs

Acción antibacteriana de geopropolis de *Melipona quadrifasciata* en cultivo de secreción de otitis en perros

Raísa Dias C¹ MV, Denise Bóbany M^{2*} M.Sc, Marcus Vinicius Taveira M³ Biol,
Valeria Alves S² M.Sc.

¹Veterinary Medical autonomous. ²University Center Serra dos Orgãos – UNIFESO. Center of Science for Health, Course of Veterinary Medicine, Estrada da Prata s/n, Teresópolis RJ, Brasil, CEP: 25.976-340. ³University Center Serra dos Orgãos – UNIFESO, Biologist - Technician of the Laboratory of Microbiology of the Course of Veterinary Medicine. Brasil. *Correspondence: debobany@gmail.com

Received: July 2016; Accepted: December 2016.

ABSTRACT

Objective. The objective of the present paper was to test the in vitro antibacterial activity of the Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) bee's geopropolis. **Materials and methods.** The experiment was carried out with secretion samples collected from animals with ear diseases evaluated at Unifeso's Clinic School of Veterinary Medicine, where in vitro tests took place, antibiograms with alcoholic extract of geopropolis were made 10 test tubes (two tubes for each concentration of 50%, 60%, 70%, 80%, 90%). **Results.** Were not identified microorganisms at concentrations of 70, 80 and 90%. **Conclusions.** The geopropolis of *Melipona quadrifasciata* showed antibacterial activity in vitro against microorganisms from ear secretion of dogs with otitis externa.

Keywords: Stingless bees, apitherapy, *Canis familiaris*. (Sources: DeSC, BVS).

RESUMEN

Objetivo. El objetivo del presente trabajo fue probar la actividad antibacteriana in vitro de la geopropólea de la abeja Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*). **Materiales y métodos.** Se realizó el experimento con muestras de secreciones obtenidas de animales con enfermedades del oído evaluados en la Clínica Escuela de Medicina Veterinaria de Unifeso, donde tuvieron lugar las pruebas in vitro, antibiogramas con extracto alcohólico de geopropolis fueron realizados 10 tubos de ensayo (dos tubos para cada concentración del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%). **Resultados.** No se identificaron los microorganismos a concentraciones de 70, 80% y 90%. **Conclusiones.** La geopropolis de *Melipona quadrifasciata* mostró actividad antibacteriana, in vitro, frente a microorganismos de la secreción del oído de los perros con otitis externa.

Palabras clave: Abejas sin aguijón, apiterapia, *Canis familiaris* (Fuentes: DeSC, BVS).

INTRODUCTION

The ear, responsible for hearing, as the other organs, is subject to pathological changes, such as otitis (1). Such diseases, seen often in clinical veterinary routine, causing great discomfort to dogs, and is common in breeds that have ears drooping, ears with congenitally stenosis of the pinna, dogs with atopic dermatitis and in dogs that live in hot, humid climates (2).

According to Oliveira et al (3), and Gregorio (4), the ear of the healthy dog has a microbiology composed by coccus, bacilli and yeasts that can be found in dogs otopatas, where, in this case, the microbiota will be changed. The diagnosis of otitis externa is based on anamnesis and confirmed by clinical examination, along with exams cytologic, microbiological, diagnostic imaging and video otoscopy (3).

According to Gregorio (4) the antibiogram is indicated in any case that there is suppurative otitis media, chronic relapse and in cases which shall be identified to the cytological examination the presence of bacilli. The treatment commonly performed consists in the elimination of primary causes, cleaning and drying the ears and, especially, the interruption of the infection (2).

The tolerance to antimicrobial agents increase the demand for natural therapies to treat this problem (5,6). Products such as phytotherapy and the use of honey from bees of the genus *Apis* are widely used as an alternative to conventional therapies (7,8).

The products of the stingless bees have medicinal properties such as antibacterial, antifungal effect, antitumor and healing but are still little known, and may be a lower cost alternative for the treatment of external otitis and. According to Vit (9), honey of these bees have been shown to be an alternative in the treatment of otitis media by assisting the healing of diseases dermatology. In accordance with Bobány et al (10), honey of the stingless bee *Tetragonisca angustula* showed clear antimicrobial action against mixed cropping of bacilli, coccus and yeasts from auditory meatus of dogs otopatas. The bees of the genus *Melipona* has been the subject of studies that have shown their effectiveness against various pathogenic bacteria (6).

The geopropolis is a product of the stingless bees composed by a mixture of wax, resin, vegetable fibers and earth or clay, with a function for external structures (tubes and inputs) and internal (honeycombs creates, cover casing and pots of food) (11,12). Cunha (13), working with ethanolic extract of geopropolis (EEGP) in hexane fractions (FH), chloroform (FC) and ethyl-acetate (FAC), by

INTRODUCCIÓN

El oído, responsable de la audición, al igual que los demás órganos, está sujeto a cambios patológicos tales como la otitis (1). Dichas enfermedades, que se ven con frecuencia en la rutina clínica veterinaria, causan gran molestia a los perros y son comunes en perros de razas con orejas caídas, orejas con estenosis congénita del pabellón, dermatitis atópica y en perros que viven en climas cálidos y húmedos (2).

Según Oliveira et al (3) y Gregorio (4), la oreja de un perro sano presenta una microbiología compuesta por coccus, bacilos y levaduras que se pueden encontrar en perros con otopatía, que en este caso cambiará la microbiota. El diagnóstico de otitis externa se basa en la anamnesis y se confirma mediante examen clínico, acompañado de exámenes citológicos, microbiológicos, de diagnóstico por imagen y video-otoscopia (3).

Según Gregorio (4) el antibiograma se indica en todos los casos de otitis media supurativa, de recidiva crónica y en casos identificados en exámenes citológicos de presencia de bacilos. El tratamiento comúnmente aplicado consiste en eliminar las causas primarias, limpiar y el secar las orejas y, especialmente, interrumpir la infección (2).

La tolerancia a los agentes antimicrobianos hace que aumente la demanda de terapias naturales para el tratamiento de este mal (5,6). Los productos como la fitoterapia y el uso de miel de abejas del género *Apis* son alternativas terapéuticas a las terapias convencionales y son ampliamente utilizadas (7,8).

Los productos de las abejas desprovistas de aguijón poseen propiedades medicinales tales como efectos antibacterianos, antifúngicos, antitumorales y cicatrizantes, pero permanecen siendo poco conocidos, pudiendo ser una alternativa de menor costo para el tratamiento de la otitis externa. Según Vit (9), se ha demostrado que la miel de estas abejas es una alternativa para el tratamiento de la otitis media, ya que ayuda a sanar enfermedades dermatológicas. De acuerdo con Bobány et al (10), la miel de la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula* mostró una clara acción antimicrobiana contra el cultivo mixto de bacilos, cocos y levaduras del conducto auditivo de los perros otopatas. Las abejas del género *Melipona* han sido objeto de estudios que demuestran su eficacia ante diversas bacterias patógenas (6).

El geopropóleo es un producto de abejas sin aguijón compuesto por una mezcla de cera, resina, fibras vegetales y tierra o arcilla, con una función para estructuras externas (tubos e insumos) e internas

scanning electron microscopy (SEM) found results that suggest that geopropolis of *Melipona scutellaris* is a promising source of active compounds against some bacteria, with greater cytotoxicity for tumor cells to normal and also capable of acting on biofilms of *Streptococcus mutans*, and may be useful in controlling diseases dependent biofilm, related to this microorganism.

Campos et al (14) working with *Melipona orbignyi*, found in Mato Grosso do Sul, Brazil, indicate that the geopropolis of this species has antimicrobial activity and potential to help combat oxidative stress and the proliferation of tumor cells.

Araújo et al (15), working with *Melipona fasciculata*, found an antimicrobial effect promising geopropolis in combination with chloramphenicol due to bacterial resistance to antibiotics.

The objective of this study was to test the antibacterial property of geopropolis bee Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) in order to prove the efficacy of this product forward to micro-organisms identified in the external auditory meatus of dogs otopatas, clinically diagnosed with otitis externa in the Clinic School of Veterinary Medicine of Unifeso.

MATERIALS AND METHODS

Study location. The experiment was conducted on *campus* Quinta do Paraíso of Centro Universitário Serra dos Órgãos (Unifeso) in two places: Clinic School of Veterinary Medicine and Microbiology lab. The *campus* of Unifeso is located in the state of Rio de Janeiro in the Southeast Region of Brazil, at the geographic position: Latitud 22° 24' 44" S, Longitud 42° 57' 56" W and an altitude of 871m.

Preparation of samples of the ears. Secretions from ear of four dogs, randomly selected, clinically diagnosed with otitis externa were obtained by means of sterile swabs. The four dogs were never treated otitis.

Of this material was prepared as blades for staining by Gram stain and identification of agents, observing, during the procedure, the practice of sterilization.

After that, the swabs were immersed in test tubes containing Agar Brain Heart Infusion (BHI - 1.85 g in 50ml) and incubated at 37°C for 24 hours were made slides in order to confirm the growth of bacteria by the method of Gram staining.

Obtainment of the geopropolis. Approximately 40 grams of propolis collected from hives of bees of the species *Melipona quadrifasciata* were obtained

(cremas de nido de abeja, envoltura de cubierta y recipientes de comida) (11, 12). Cunha (13), en su trabajo con extracto etanólico de geoprópolis (EEGP) en fracciones de hexano (FH), clorofórmico (FC) y acetato de etilo (FAC), por microscopía electrónica de barrido (SEM), encontró resultados que sugieren que el geoprópolis de *Melipona scutellaris* es una fuente prometedora de compuestos activos contra algunas bacterias, con una mayor citotoxicidad para la células de tumorales a normales, que a su vez es capaz de actuar sobre las biopelículas de *Streptococcus mutans* y puede ser útil además en el control de enfermedades dependientes de la biopelícula, la cual está relacionada con este microorganismo.

Campos et al (14), en su trabajo con *Melipona orbignyi*, encontrada en Mato Grosso do Sul, Brasil, indican que el geoprópolis de esta especie presenta una actividad antimicrobiana y muestra potencial para ayudar a combatir el estrés oxidativo y la proliferación de células tumorales.

Araújo et al (15), trabajando con *Melipona fasciculata*, encontraron un efecto antimicrobiano prometedor en el geoprópolis combinado con cloranfenicol debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos.

El objetivo del presente estudio fue examinar las propiedades antibacterianas que posee la geoprópolis de la abeja Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) para así demostrar la eficacia del producto frente a microorganismos identificados en el conducto auditivo externo de los perros otópatas con un diagnóstico clínico de otitis externa por la Escuela de Medicina Veterinaria de Unifeso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El experimento se realizó en el *campus* Quinta do Paraíso del Centro Universitario Serra dos Órgãos (Unifeso) en dos lugares: Clínica Escuela de Medicina Veterinaria laboratorio de Microbiología. El *campus* de Unifeso está ubicado en el estado de Río de Janeiro en la Región sudeste de Brasil, en la posición geográfica: Latitud 22° 24' 44" «S, Longitud 42° 57' 56" W y a una elevación de 871m.

Preparación de muestras de orejas. Se tomaron secreciones de oído de cuatro perros con un diagnóstico clínico de otitis externa, seleccionados de manera aleatoria, usando hisópos estériles. Los cuatro perros nunca recibieron tratamiento para la otitis.

De este material se prepararon cuchillas de tinción para tinción de Gram e identificación

in the apiary Serrano / Teresópolis- RJ, and stored in a plastic bag for later alcoholic extraction, following the methodology developed by Park, Ikegaki (16).

Preparation of the alcoholic extract of geopropolis. The geopropolis was crushed in a mortar with the aid of the pestle and after, was weighed 5 aliquots of 0.8g of geopropolis placed in tubes of trials and adding 10 ml of alcoholic's diluent in different concentrations: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, with intention of verifying the possible efficiency of geopropolis of *Melipona quadrifasciata* in lower concentrations than that (80%) recommended by Park, Ikegaki (16) as a dilution more efficiently.

Made the dilution, the test tubes were placed in agitator and was then performed the extraction of the active principle, putting the tubes in a water bath in agitation at 70°C for 30 minutes.

After this step, the tubes removed from the water bath were brought into a centrifuge for 10 minutes and was subsequently initiated the withdrawal of the liquid supernatant from each tube for glass amber corresponding to each dilution and stored in refrigerator.

Antibiogram with alcoholic extract of geopropolis. The samples of the ear secretions incubated in the midst BHI, was collected an aliquot of each tube, with automatic pipette 10µL, placed in a test tube containing the BHI so doing a pool of bacteria. Were made 10 test tubes (two tubes for each concentration of 50% 60% 70% 80% 90%) and, at each concentration, used 0.5ml and 1 ml of extract of geopropolis respectively. The tubes were taken to oven at 37°C for 24 hours.

After reading the results of the antibiogram, for confirmation of the antibacterial action of geopropolis, was prepared blades for staining by Gram stain for identification of possible microbial agents, in accordance with the characteristics morpho-dyeing.

Rebuttal (against proof). Of the samples of the antibiograms that showed microbial inhibition were prepared Petri plates containing culture medium Muller Hilton (MH) where they were sown in each card by spreading, a purview of the borderline.

RESULTS

The tubes containing the swab in the BHI, after 24 hours of incubation at 37°C, was made slides in order to confirm the growth of bacteria by the method of Gram staining, and were identified bacilli (Figure 1), Gram-positive cocci (Figure 2) and negative.

de agentes, observándose la práctica de la esterilización durante el procedimiento.

A continuación se sumergieron los hisopos en tubos de ensayo que contenían Agar Brain Heart Infusion (BHI - 1,85 g en 50 ml) y se incubaron en láminas a 37°C durante 24 horas, para confirmar el crecimiento de bacterias mediante el método de tinción de Gram.

Obtención del geopropóleo. Se recogieron aproximadamente 40 gramos de propóleo tomados de colmenas de abejas de la especie *Melipona quadrifasciata* del apiario Serrano/Teresópolis-RJ y se almacenaron en una bolsa de plástico para su posterior extracción alcohólica, siguiendo la metodología desarrollada por Park Ikegaki (16).

Preparación del extracto alcohólico de geopropóleo. El geopropóleo se trituró en un mortero con ayuda del pistilo y luego se pesaron 5 alícuotas de geopropóleo de 0,8 g contenidas en tubos de ensayo, y se añadieron 10 ml de diluyente alcohólico en diferentes concentraciones: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, con el fin de verificar la posible eficiencia del geopropóleo de *Melipona quadrifasciata* en concentraciones inferiores a las recomendadas por Park, Ikegaki (80%) (16) por medio de una dilución más eficiente.

Una vez realizada la dilución, los tubos de ensayo se colocaron en agitador y se procedió a realizar la extracción del principio activo, colocando los tubos en un baño de agua en agitación a 70° C durante 30 minutos.

Después de esta etapa, los tubos fueron sacados del baño de agua y fueron centrifugados durante 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante del líquido de cada tubo de ensayo y se envasó en recipientes de vidrio ámbar correspondientes a cada dilución, que por último se almacenaron en un refrigerador.

Antibiograma con extracto alcohólico de geopropóleo. Se recogió una alícuota de cada tubo de muestras de secreciones de oído incubadas en medio de BHI, por medio de una pipeta automática de 10µL, que fueron colocadas en un tubo de ensayo con BHI para crear un grupo de bacterias. Esto se realizó en 10 tubos de ensayo (dos tubos para cada concentración de 50% 60% 70% 80% 90%), y se utilizaron 0,5 ml y 1 ml de extracto de geopropóleo en cada concentración, respectivamente. Los tubos se llevaron al horno a 37°C durante 24 horas.

Para confirmar la acción antibacteriana de la geopropolis después de la lectura de los resultados del antibiograma, se prepararon láminas

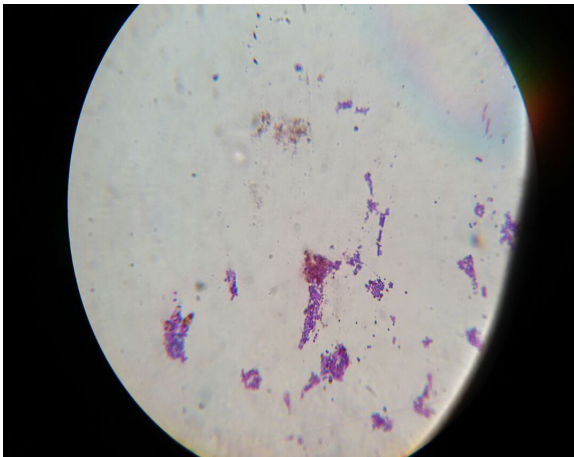


Figure 1. Microscopy of slides stained by Gram stain with presence of bacilli after 24 hours of incubation at 37°C.

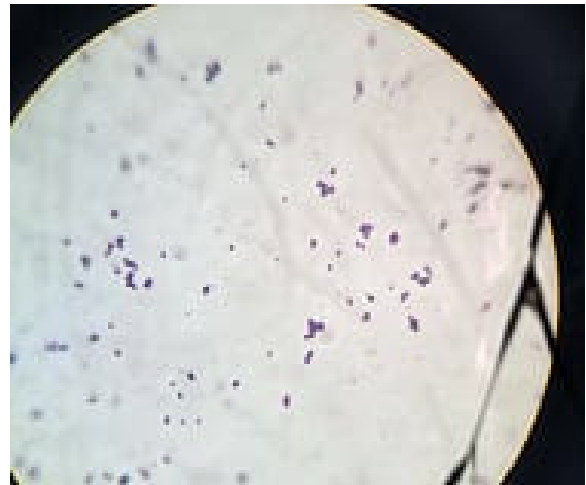


Figure 3. Microscopy of blade of the antibiogram with 60% where there was a slight presence of coccus

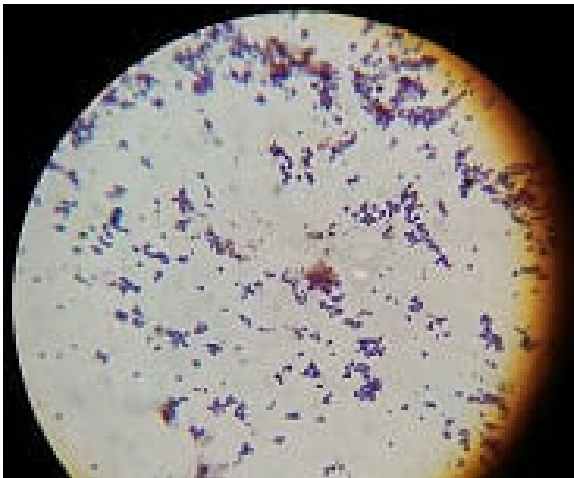


Figure 2. Microscopy of slides stained by Gram stain with presence of coconuts after 24 hours of incubation at 37°C



Figure 4. Microscopy of blade of the antibiogram with 70% without the presence of microorganisms.

Of the antibiograms, after 24 hours of sowing of 10 samples in culture medium BHI and maintenance in gases the bacteriological 37°C, were made slides by the method of Gram staining in order to research the growth of bacteria and identified a discrete presence of coccus in accordance with the characteristics morpho-dyeing, in tubes containing concentrations of 50 and 60% (Figure 3). However were not identified microorganisms at concentrations of 70, (Figure 4) 80 and 90%.

Of the borderline 60% e 70% were prepared Petri plates containing Agar Müller Hinton for each concentration for against proof and not identified growth of colonies in both concentrations (Table 1, Figure 5).

de tinción por tinción de Gram para identificar posibles agentes microbianos, de acuerdo con las características del morfo-teñido.

Refutación (evidencia contraria). Las muestras de antibiogramas que presentaron inhibición microbiana fueron preparadas en placas de Petri que contenían el medio de cultivo Muller Hilton (MH), donde fueron sembradas en cada tarjeta por propagación, dentro de la esfera de los límites.

RESULTADOS

Se hicieron láminas de los tubos que contenían el hisopo en el BHI, después de 24 horas de incubación a 37°C, para confirmar el crecimiento de bacterias utilizando el método de tinción de



Figure 5. Petri plates with sowing of antibiogram of concentrations of 60% and 70% respectively, without growth of colonie.

This result suggests that there is antimicrobial activity of geopropolis of *Melipona quadrifasciata* at concentrations above 60%.

DISCUSSION

In this experiment were identified bacilli, Gram-positive and Gram-negative cocci, agreeing with Tilley, Smith Jr (1), Patel, Forsythe, Smith (2) e Oliveira et al (3).

After antibiograms, were not identified microorganisms at concentrations of 70, 80 and 90% different outcome than says Park, Ikegaki (16) about the concentration of 80% has the best results. In this experiment, there was inhibition in lower concentrations than that suggested by the authors.

The result obtained in this experiment suggests that the alcoholic extract of geopropolis of *Melipona quadrifasciata* has active components against some microorganisms often found in recurrent external otitis of dogs, similar to that encountered by Cunha (13), Campos et al (14) and Araújo et al (15), working with other species of this genus of stingless bees.

Table 1. Results of Petri plates used as evidence against

Borderline	Results
60% (Containing 1ml of extract of geopropolis)	Without growth
70% (Containing 0.5 ml of extract of geopropolis)	Without growth

Gram, en donde se identificaron bacilos (Figura 1), cocos Gram-positivos 2) y negativos.

Se utilizó el método de tinción Gram para crear láminas de los antibiogramas, 24 horas después de cultivar 10 muestras en medio de cultivo BHI y mantenidas en gases bacteriológicos a 37°C, para investigar el crecimiento de bacterias, en donde se identificó una presencia discreta de cocos de acuerdo a las características de morfo-teñido, en tubos con concentraciones de 50 y 60% (Figura 3). Sin embargo, no se identificaron microorganismos en concentraciones de 70, 80 y 90% (Figura 4).

Se prepararon placas de Petri con Agar Müeller Hinton para cada concentración como evidencia en contra, en donde no se observó un crecimiento de colonias en ninguna de las dos concentraciones (Tabla 1, Figura 5).

Este resultado sugiere que el geopropóleo de *Melipona quadrifasciata* presenta actividad antimicrobiana en concentraciones superiores al 60%.

DISCUSIÓN

En el presente experimento se identificaron bacilos, cocos Gram-positivos y Gram-negativos, lo que concuerda con Tilley, Smith Jr (1), Patel, Forsythe, Smith (2) y Oliveira et al.

Después de los antibiogramas no se identificaron microorganismos en las concentraciones de 70, 80 y 90%, lo cual es un resultado distinto al presentado por Park, Ikegaki (16) que dice que la concentración del 80% muestra los mejores resultados. En el presente estudio hubo inhibición en concentraciones inferiores a las sugeridas por los autores.

Los resultados de este estudio sugieren que el extracto alcohólico del geopropóleo de *Melipona quadrifasciata* cuenta con componentes activos que actúan contra algunos microorganismos que con frecuencia se encuentran en la recurrente otitis externa de perros, lo cual es similar a lo observado por Cunha (13), Campos et al (14) y Araújo et al (15), quienes trabajaron con especies distintas de este género de abejas sin aguijón.

In conclusion, the geopropolis bee *Melipona quadrifasciata* showed efficacy in vitro against the microorganisms identified in this experiment and may be an alternative for the treatment of these recurrent otitis.

More tests are needed in order to find the best concentrations of geopropolis of *Melipona quadrifasciata* with antimicrobial activity.

En conclusión, la geopropólea de la abeja *Melipona quadrifasciata* demostró su eficacia in vitro contra los microorganismos identificados en este experimento, y puede representar una alternativa en el tratamiento de dichas otitis recurrentes.

Es necesario realizar más pruebas con el fin de encontrar las mejores concentraciones de geopropóleo con actividad antimicrobiana de *Melipona quadrifasciata*.

REFERENCES

1. Tilley LP, Smith Jr, F. W. K. Consulta Veterinária em 5 minutos: Espécies Canina e Felina. 2ª ed. Editora Manole: Brasil; 2008.
2. Patel A, Forsythe P, Smith S. Dermatología de Pequeños Animales: soluciones saunders en la práctica veterinaria. Elsevier Saunders: Barcelona; 2010.
3. Oliveira VB, Ribeiro MG, Almeida ACS, Paes AC, Condas LAZ, Lara GHB, Franco MMJ, Fernandes MC, Listoni FJP. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos. Semin Cienc Agrar 2012; 33(6):2367-2374.
4. Gregorio AFD. Otite externa canina: estudo preliminar sobre otalgia e factores associados. [Dissertação Mestrado]. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias; 2013.
5. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol 2008; 39(4):756-760.
6. Dardón MJ, Enríquez E. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. Interiencia 2008; 33(12):916-922.
7. Trovo MM, Silva MJP, Leão ER. Terapias alternativas / complementares no ensino público e privado: análise do conhecimento dos acadêmicos de enfermagem. Rev Latinoam Enfermagem 2003; 11(4):483-489.
8. Silva RA, Maia GA, Sousa PHM, Costa JMC. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. Alim Nutr 2006; 17(1):113-120.
9. Vit P. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: miel, polen y propóleos. Rev. Inst. Nac. Hig 2004; 35(2):32-39.
10. Bobány MD, Pimentel MAP, Martins RRC, Netto BS, Tolla MS. Atividade antimicrobiana do mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) em cultivo de microorganismos do conduto auditivo de caninos domésticos (*Canis familiaris*). Ci Anim Bras 2010; 11(2):441-446.
11. Araújo MJAM. Geopropolis de *Melipona fasciculata* SMITH. Ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica. [Dissertação]. Botucatu-SP: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2013.
12. Bartolomeu AR. Associação da geopropolis à quimioterápicos: ação citotóxica e antiproliferativa sobre células HEp-2 e mecanismos envolvidos. [Dissertação Mestrado]. Botucatu-SP: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2016.
13. Cunha MG. Geopropolis de *Melipona scutellaris*: atividade antimicrobiana, antiproliferativa e ação sobre biofilme de *Streptococcus mutans* in vitro. [Dissertação Mestrado]. Piracicaba-SP: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2012.
14. Campos JF, Santos UP, Macorini LFB, Melo AMMF, Balestieri JBP, Paredes-Gameroc EJ, Cardoso CAL, Souza KP, Santos EL. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). Food Chem Toxicol 2014; 65:374-380.
15. Araújo MJAM, Búfalo MC, Conti BJ, Fernandes JR A, Trusheva B, Bankova V, Sforcin JM. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. J Mol Pathophysiol 2009; 4:12-20.
16. Park YK, Ikegaki M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. Biosci Biotechnol Biochem 1998; 62:2230-2232.