

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**JUCEMAR FRANSCICO SCHREINER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DE  
PRÓPOLIS ORIUNDA DE ABELHAS SEM FERRÃO (MELIPONÍNEOS) DE PATO  
BRANCO-PR**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO – PR**

**2022**

**JUCEMAR FRANSCICO SCHREINER**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DE  
PRÓPOLIS ORIUNDA DE ABELHAS SEM FERRÃO (MELIPONÍNEOS) DE PATO  
BRANCO-PR**

**EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY  
OBTAINED PROPOLIS FROM STINGLESS BEES (STINGLESS BEES) FROM  
PATO BRANCO-PR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Pato Branco (UTFPR).  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Solange Teresinha Carpes  
Coorientador: Bruno Henrique Fontoura.

**PATO BRANCO – PR**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.





---

## TERMO DE APROVAÇÃO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DE PRÓPOLIS ORIUNDA DE ABELHAS SEM FERRÃO (MELIPONÍNEOS) DE PATO BRANCO-PR

por

**JUCEMAR FRANSCICO SCHREINER**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 07 de dezembro de 2022 às 10 horas e 20 minutos como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **Aprovado**.

---

Solange Teresinha Carpes  
Prof<sup>a</sup>. Orientadora

---

Marina Leite Mitterer Daltoé  
Membro titular

---

Camila Diedrich  
Membro titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.058807/2022-14 documento 3140329

Dedico à minha família e amigos.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus, por ter dado forças e iluminado meu caminho durante todos estes anos de vida.

Aos meus pais Evaldo e Justina, pelo carinho, amor e compreensão dedicados a mim. Aos meus irmãos, pelo companheirismo e pela amizade. Aos demais parentes e amigos que estiveram presentes durante esta importante etapa de minha formação.

A Profa. Dra. Solange Terezinha Carpes, minha orientadora, pela amizade, confiança e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Bruno Henrique Fontoura, meu coorientador, pela amizade, confiança, paciência e incentivo.

A Celso Ferraz Bett e Priscila Rudiak Lustosa pela generosa doação das amostras para que este trabalho fosse possível.

A UTFPR, principalmente aos professores e colaboradores que contribuíram com a minha aprendizagem na graduação.

E a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para minha formação profissional e pessoal nestes anos de minha vida. MUITO OBRIGADO!!!

## Resumo

SCHREINER, Jucemar Francisco. Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de própolis oriunda de abelhas sem ferrão (meliponíneos) de Pato Branco-PR. 2022. 60 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2022.

A própolis é um produto da apicultura e é uma mistura complexa de muitos compostos químicos, principalmente compostos fenólicos. Muitos destes compostos são reconhecidos pela sua atividade antioxidante e antimicrobiana. A própolis oriunda de abelhas sem ferrão, da Família Apidae e Subfamília Meliponíneas, vem despertando interesse de pesquisadores no mundo todo, abrindo um leque de oportunidades para sua aplicação, especialmente em países onde há uma rica biodiversidade de espécies vegetais. Uma vez que, a composição química da própolis é influenciada pela origem geográfica, clima, local e época da coleta (sazonalidade). As condições de extração e os métodos de quantificação dos compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos, também influenciam nas atividades bioativas da própolis. O objetivo deste estudo foi determinar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e avaliar as propriedades antioxidantes e antibacterianas da própolis de 3 espécies de abelhas da Subfamília Meliponíneas - abelhas sem ferrão. Desta forma, as própolis das espécies *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* da região de Pato Branco, PR, foram avaliadas nesse estudo. Dois extratos etanólicos de própolis (EEP) de cada espécie foram preparados: um extrato com etanol 20% (v/v) e outro com etanol 80% (v/v) em banho ultrassônico a 25 °C por 40 minutos. O teor de CFT foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu e o resultado expresso em equivalente ao ácido gálico (EAG). A Atividade antioxidante (AA) foi determinada pelo método do sequestro do radical DPPH e pelo radical ABTS. Ambos os resultados foram expressos em mM de TE g<sup>-1</sup> de própolis (TE: Trolox equivalente). A AA pelo Poder Antioxidante Redutor do Ferro (FRAP) também foi determinada e seu resultado expresso em mmol Fe<sup>+2</sup>g<sup>-1</sup> de própolis. A atividade antibacteriana foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em placas de 96 poços frente as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*. O teor de CFT ficou entre 2,25 mg g<sup>-1</sup> e 61,02 mg g<sup>-1</sup>. A própolis de *Melipona quadrifasciata* apresentou os maiores teores de CFT em ambas as concentrações de etanol. A AA pelo sequestro do radical DPPH foi

de 0,62 a 26,537 mM TE g<sup>-1</sup>, sendo que a própolis da *Melipona quadrifasciata* obteve os melhores resultados, tanto com solvente 80% de etanol, como também em 20%. Para a análise de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> e FRAP, os resultados obtidos variaram respectivamente de 162,37 a 695,11 mM TE g<sup>-1</sup> e entre 29,18 e 367,80 mmol Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup>. A maior atividade antibacteriana foi encontrada nas própolis extraídas com etanol 80% e foi dependente da concentração de etanol. Nessa condição, todas as própolis apresentaram atividade bacteriostática (CIM = 5,44 µg mL<sup>-1</sup>) frente a *Escherichia coli*. As bactérias *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* foram mais sensíveis aos EEP etanol 80% de *Plebeia droryana* com CIM igual a 10,9, 5,44 e 10,9 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém esse extrato não apresentou ação bactericida frente a *Salmonella typhimurium*. As própolis de *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* apresentaram ação bactericida frente a *Escherichia coli* (CBM = 10,9 µg mL<sup>-1</sup>), enquanto a própolis de *Plebeia droryana* o CBM foi de 87,3 µg mL<sup>-1</sup>. O EEP de *Melipona quadrifasciata* apresentou o maior número de compostos, seguida de *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana*. Pela análise cromatográfica, foi possível identificar nas 3 espécies de própolis os flavonoides catequina, epicatequina, crisina e galangina. Também os ácidos fenólicos *p*-cumárico, ferrúlico e cinâmico. O principal constituinte dos EEP da *Melipona quadrifasciata* foi o ácido ferúlico (372,82 µg g<sup>-1</sup>) seguido do ácido *p*-cumárico (111,56 µg g<sup>-1</sup>) e do ácido cinâmico (67,57 µg g<sup>-1</sup>). O ácido cinâmico foi identificado em todas as própolis analisadas, enquanto a crisina e a galangina foram quantificadas apenas na *Tetragonisca angustula*. As atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos de própolis sem ferrão podem ser atribuídas aos altos teores de fenólicos totais e pela presença de compostos como ácido ferúlico, *p*-cumárico, ácido cinâmico e catequina. Este estudo sugere que as própolis têm potencial aplicação na indústria farmacêutica, bem como em alimentos e suplementos nutricionais como agente antioxidante e antibacteriano natural.

**Palavras-chaves:** Abelhas sem ferrão; Bioatividade; Compostos Fenólicos; Flavonoides; Própolis.



## ABSTRACT

SCHREINER, Jucemar Francisco. Evaluation of the antioxidant and antibacterial activity obtained propolis from stingless bees (stingless bees) from Pato Branco-PR. 2022. 60 f. Completion of course work (Bachelor in Chemistry) Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2022.

Propolis is a product of beekeeping and is a complex mixture of many chemical compounds, mainly phenolic compounds. Many of these compounds are recognized for their antioxidant and antimicrobial activity. Propolis from stingless bees, from the Apidae Family and Meliponine Subfamily, has been attracting the interest of researchers all over the world, opening a range of opportunities for its application, especially in countries where there is a rich biodiversity of plant species. Since the chemical composition of propolis is influenced by geographic origin, climate, collection site and collection time (seasonality). The extraction conditions and quantification methods of bioactive compounds, especially phenolic compounds, also influence the results. The objective of this study was to determine the content of total phenolic compounds (TFC) and evaluate the antioxidant and antibacterial properties of propolis from 3 species of bees from the Subfamily Meliponíneas - stingless bees. Thus, the propolis of the species *Melipona quadrafasciata*, *Tetragonisca angustula* and *Plebeia droryana* from the region of Pato Branco, PR, were evaluated in this study. Two ethanol extracts of propolis (EEP) for each species were prepared: one extract with 20% ethanol (v/v) and another with 80% ethanol (v/v) in an ultrasonic bath at 25 °C for 40 minutes. The CFT content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the result expressed in gallic acid equivalent (EAG). Antioxidant activity (AA) was determined by the DPPH radical scavenging method and the ABTS radical. Both results were expressed in mM of TE g<sup>-1</sup> of propolis (TE: Trolox equivalent). The AA by the Antioxidant Reducing Power of Iron (FRAP) was also determined and its result expressed in mmol Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup> of propolis. The CFT content was between 2.25 mg g<sup>-1</sup> and 61.02 mg g<sup>-1</sup>. *Melipona quadrafasciata* propolis showed the highest CFT contents in both ethanol concentrations. The AA by DPPH radical scavenging ranged from 0.62 to 26.537 mM TE g<sup>-1</sup>, with propolis from *Melipona quadrafasciata* obtaining the best results, both with 80% ethanol solvent and also with 20%. For the ABTS<sup>•+</sup> and FRAP radical scavenging analysis, the results obtained varied from 162.37 to 695.11 mM TE

$\text{g}^{-1}$  and between 29.18 and 367.80  $\text{mmol Fe}^{+2}\text{g}^{-1}$ , respectively. The antibacterial activity was determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in 96-well plates against the bacteria *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. The highest antibacterial activity was found in propolis extracted with 80% ethanol and was dependent on the ethanol concentration. In this condition, all propolis showed bacteriostatic activity (MIC = 5.44  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) against *Escherichia coli*. The bacteria *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis* were more sensitive to EEP ethanol 80% from *Plebeia droryana* with MIC equal to 10.9, 5.44 and 10.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectively. However, this extract did not show bactericidal action against *Salmonella typhimurium*. Propolis from *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* both showed bactericidal action against *Escherichia coli* (MBC = 10.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), while propolis from *Plebeia droryana* the MBC was 87.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . *Melipona quadrifasciata* EEP showed the highest number of compounds, followed by *Tetragonisca angustula* and *Plebeia droryana*. By chromatographic analysis it was possible to identify in the 3 species of propolis the flavonoids catechin, epicatechin, chrysin and galangin. Also, *p*-coumaric, ferulic, cinnamic, phenolic acids. The main constituent of *Melipona quadrifasciata* EEP was ferulic acid (372.82  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) followed by *p*-coumaric acid (111.56  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and cinnamic acid (67.57  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Cinnamic acid was present in all propolis analyzed while chrysin and galangin were present only in *Tetragonisca angustula*. However, the antioxidant and antibacterial activities of stingless propolis extracts can be attributed to the high levels of total phenolics and the presence of compounds such as ferulic acid, *p*-coumaric acid, cinnamic acid and catechin. This study suggests that propolis has potential application in the pharmaceutical industry, as well as in food and nutritional supplements as a natural antioxidant and antibacterial agent.

**Keywords:** Stingless bees; Bioactivity; Phenolic compounds; Flavonoids; Propolis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos.....	22
Figura 2 - Estrutura básica de um flavonoide .....	23
Figura 3 - Estrutura química de alguns flavonoides .....	23
Figura 4 - Mecanismo de reação do método ABTS .....	26
Figura 5 - Mecanismo de reação da análise DPPH .....	26
Figura 6 - Mecanismo de reação do ensaio FRAP .....	27
<i>Figura 7 - Cromatograma do EEP da Melipona quadrifasciata com 80% etanol (1Catequina; 2Epicatequina; 3Ácido p-cumárico; 4Ácido ferúlico;5Ácido cinâmico .....</i>	<i>45</i>
Figura 8 - Cromatograma do EEP da Melipona quadrifasciata com 20% etanol (1Catequina, 2Epicatequina, 3Ácido p-cumárico, 4Ácido ferúlico, 5Ácido cinâmico).....	46
Figura 9 - Cromatograma do EEP da Tetragonisca angustula com 80% etanol (1Epicatequina, 2Ácido p-cumárico, 3Ácido cinâmico e 4Crisina).....	46
Figura 10 - Cromatograma do EEP da Tetragonisca angustula com 20% etanol (1Epicatequina, 2Ácido cinâmico e 3Crisina e 4Galangina).....	47
Figura 11 - Cromatograma do EEP da Plebeia droryana com 80% etanol (1 Ácido p-cumárico e 2Ácido cinâmico) .....	47
Figura 12 - Cromatograma do EEP da Plebeia droryana com 20% etanol (1Ácido p-cumárico e 2Ácido cinâmico) .....	48

## LISTADE TABELAS

Tabela 1 - Resultado das concentrações de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. ....	34
Tabela 2 - Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	39
Tabela 3 - Perfil fenólico dos Extratos Etanólicos de Propolis por HPLC/DAD .....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
3.1 ABELHAS SEM FERRÃO	16
3.2 HISTÓRICO DA PRÓPOLIS	17
3.3 PRÓPOLIS	19
3.3.1 Composição Química da Própolis	20
3.4.1 Métodos de análises de antioxidantes	25
3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
4.3 PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	29
4.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais	30
4.4.2 Atividade de sequestro do radical DPPH•	30
4.4.3 Atividade antioxidante de sequestro do radical ABTS <sup>•+</sup>	30
4.4.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP	31
4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	31
4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
4.5.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	32
4.6 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC/DAD	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	34
5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE	34
5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	38
5.3 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC/DAD	42
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	49
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	50



## 1. INTRODUÇÃO

Com interesse crescente por produtos naturais que possam contribuir para uma vida mais saudável, a própolis, resina obtida por abelhas, se torna candidata a receber atenção por suas propriedades antioxidantes e antibacterianas. Diversas pesquisas têm demonstrado resultados promissores, que muito tem relação com sua composição complexa, com substâncias únicas e com potencialidades reconhecidas (FERREIRA et al., 2018; MENEZES, 2022; SILVA 2012).

As abelhas sem ferrão (ASF), são abelhas sociais conhecidas pela ausência do ferrão, que se apresenta atrofiado, não funcionando como mecanismo de defesa. Seu manejo é conhecido por meliponicultura, e têm grande importância para o meio ambiente como agente polinizador. Além disso, o mel produzido pelas ASF possui grande valor nutricional e econômico, assim como a própolis produzida por essas espécies (BARBIERI; FRANCOY; KOSER, 2020).

A própolis é utilizada desde a antiguidade para diversos benefícios, desde usos para melhorar a saúde até a mumificação no antigo Egito (ZABAIYOU et al., 2017). É uma substância resinosa, composta por diversas substâncias que podem variar de acordo com a época do ano e o tipo de material coletado pelas abelhas. Sabe-se que entre as diversas substâncias que compõe a própolis podemos destacar os compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, que são substâncias bioativas que podem trazer diversos benefícios à saúde (LUSTOSA et al., 2008; RAO et al., 2016).

A bioatividade desses compostos se destaca também pelo potencial antioxidante, que são compostos que podem inibir ou até interromper a ação dos radicais livres, que são responsáveis pelo estresse oxidativo, envelhecimento precoce e doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson (BADBAN et al., 2015; BONAMIGO et al., 2017).

Os compostos com potencial antioxidante também podem ser utilizados para aumentar o tempo de vida útil de diversos alimentos, inibindo ou retardando a oxidação lipídica. Dessa forma, os conservantes sintéticos podem ser reduzidos ou até substituídos por antioxidantes naturais, uma vez que muitos dos antioxidantes sintéticos, quando usados em longo prazo, podem trazer malefícios a saúde (CUTRIM, 2017; SILVA, 2018).

Assim como capacidade de inibir a oxidação, muitos estudos têm demonstrado ação antibacteriana da própolis (BERRETTA et al., 2018; WOJTYCZKA et al., 2013).

Os compostos bioativos apresentam capacidade de inibir o crescimento microbiano (bacteriostático), ou até mesmo eliminando o microrganismo (bacteriocida) (TORRES et al., 2018). Desde os tempos antigos, microrganismos são os causadores de diversas enfermidades e causadores da degradação em alimentos. Dessa forma, se faz necessário a busca por meios de eliminar a atividade de microrganismos e aumentar a vida útil dos alimentos.

A atividade biológica da própolis está relacionada a sua composição química, que por sua vez está relacionada a origem da planta, onde a resina foi coletada e a espécie da abelha coletora. A própolis pode ser utilizada como agente natural no combate contra infecções bacterianas, como alternativa para o combate de cepas resistentes, onde se tem verificado maior efeito contra Gram-positivas do que Gram-negativas (TORRES et al., 2018).

Neste estudo, foi avaliado a capacidade antioxidante e antibacteriana de extratos etanólicos de própolis oriundas de 3 espécies de abelhas sem ferrão, Jataí (*Tetragonisca angustula*), Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e Mirim (*Plebeia droryana*), do município de Pato Branco.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e antibacteriano de própolis oriundas de três espécies de abelhas da família Apidae e subfamília Meliponinae coletadas no município de Pato Branco, conhecidas como: Jataí (*Tetragonisca angustula*), Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) e Mirim (*Plebeia droryana*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor dos compostos fenólicos totais;
- Avaliar a atividade antioxidante da própolis a partir do sequestro dos radicais DPPH e ABTS e pelo método FRAP;
- Avaliar a atividade antibacteriana da própolis a partir Concentração Inibitória Mínima (CIM), frente aos microrganismos *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM).
- Determinar a presença de compostos fenólicos por HPLC-DAD

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

Desde a antiguidade, a humanidade vem buscando alternativas diversas para promover benefícios, desde alimentação até mesmo reduzir os riscos de se desenvolver certas doenças, entre elas, se tem usado produtos oriundos de abelhas, como mel, pólen, cera e, própolis, em função das suas propriedades biológicas (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013). Com o desenvolvimento científico, é crescente o interesse de se buscar substâncias bioativas de fontes naturais, para conseguir atingir os objetivos que são, entre tantos outros almejados, ter uma vida saudável em contato mais próximo com a natureza (MARTINELLO, 2021).

Com o enorme interesse dos cientistas em encontrar novos produtos a partir de fontes naturais, a própolis vem passando por estudos com a intenção de avaliar suas potencialidades, principalmente como uma fonte natural de antioxidantes e antibacteriano. A partir de suas substâncias constituintes, a própolis vem apresentando resultados esperados diante do que se tem relatado, primeiramente por conhecimento popular, depois por métodos científicos, como uma rica fonte de substâncias bioativas (MENEZES, 2022; SILVA-CARVALHO et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que a composição da própolis varia de acordo com a região, época e tipos de fontes vegetais que as abelhas têm à disposição para coleta. Por consequência, suas atividades químicas e biológicas são diferenciadas (FERREIRA et al 2018; SAWAYA et al., 2009), dessa forma se torna importante a pesquisa em determinar a atividade antioxidante e antibacteriana dos diversos tipos de própolis.

#### 3.1 ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas sem ferrão (ASF) estão localizadas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde se conhecem mais de 500 espécies (FERREIRA et al., 2018; RASMUSSEN, 2010), sendo que há muitas espécies com potencialidades a serem descobertas.

No Brasil, devido as vastas áreas tropicais e subtropicais, são descritas mais de 200 espécies de ASF (CAMPOS et al., 2015). Ao todo, foram identificadas 89 espécies endêmicas no Brasil, o que corresponde a aproximadamente 20% do total de abelhas neotropicais sem ferrão. Entre os gêneros com maior número de espécies

conhecidas estão: *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona*, *Scaptotrigona* e *Trigonisca* (PEDRO et al., 2014) distribuídas principalmente na região norte e nordeste do país (FERREIRA et al., 2018).

As ASF pertencem à família Apidae, subfamília Meliponinae, e diferem-se das abelhas com ferrão, como as *Apis melliferas*, em muitas características, desde o produto final até seu comportamento. Apesar de sua ampla dispersão pelas mais variadas regiões, o conhecimento sobre a biologia das ASF ainda é escasso em comparação com as abelhas *Apis mellifera* (HRNCIR et al., 2016).

As melíponas, como são popularmente chamadas, são abelhas sociais que possuem o ferrão atrofiado, impossibilitando o seu uso defensivo, por isso são popularmente chamadas de abelhas sem ferrão (TENÓRIO, 2011). Estes pequenos animais desempenham papel importante na natureza como polinizadores (GRAB et al., 2019) e de interesse econômico, com a produção de cera, própolis, mel e pólen (AJIBOLA, 2012).

As ASF são insetos muito dóceis e de fácil manejo, dispensando equipamentos de proteção, tais como macacão, luvas, máscaras e fumigadores, reduzindo assim os custos de sua criação e permitindo que essas abelhas sejam mantidas próximas de residências e de criações de animais domésticos. Pelo fato de não precisar de muito esforço no manejo, as criações destas espécies de abelhas sem ferrão podem ser executadas por pessoas de qualquer faixa etária (TENÓRIO, 2011).

Quando a colmeia é atacada por invasores, as abelhas cobrem estes invasores com própolis e cera, que são deixados nas paredes ou no fundo da colmeia (TORETI, 2013), que também são usados pelas abelhas como forma de se evitar a decomposição da carcaça do intruso nas colmeias, construir diferentes estruturas na colônia, como caminhos internos, tubos de entrada e batumes, para vedação e proteção de seus ninhos (KUMAR, 2008; FERREIRA et al., 2018).

### 3.2 HISTÓRICO DA PRÓPOLIS

Etimologicamente, a palavra própolis tem origem no grego “pro”, que significa na frente, e “polis”, que se refere à cidade (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013). O significado, em frente à cidade, se adapta bem ao papel protetor da própolis para a colônia de abelhas, que é de fundamental importância para garantir sua sobrevivência (TORETI, 2013).

A própolis vem sendo usada pelo homem como um medicamento tradicional desde 300 a.C. (VEIGA et al., 2017). Os Romanos e Gregos já conheciam suas propriedades medicinais, sendo utilizada como antisséptico, cicatrizante em feridas e desinfetantes bucais (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013). Ao longo de muito tempo se espalhou sua utilização por muitas civilizações do velho mundo, tendo sido relatado seu uso pelos Incas como agente antitérmico (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Os antigos judeus consideravam *tzori* (a palavra hebraica para própolis) como um medicamento (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013). A própolis foi utilizada pelos gregos como ingrediente principal para a fabricação de um perfume que combinava própolis, olíbano, estirax e ervas aromáticas (MARTINOTTI, 2015). Os egípcios usavam a própolis para preservar seus cadáveres da decomposição (ZABAIUO et al., 2017), já que estavam cientes a partir de suas experiências, das propriedades antiputrefativas da própolis (SFORCIN, 2016).

Na Europa, entre os séculos XVII e XX, a própolis foi reconhecida por sua atividade antibacteriana (WAGH, 2013), sendo considerada o melhor remédio para o tratamento de feridas e usada como pomada curativa na Inglaterra (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013).

A partir do início do século XIX, com o desenvolvimento da química, foi possível elucidar as substâncias da própolis, fazendo a correlação entre sua composição e sua efetiva atividade. Exemplos incluem estudos da química dos flavonoides, que são muito comuns na própolis (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013). No início do século XX, mais precisamente em 1908, surgiu uns dos primeiros trabalhos científicos sobre as propriedades químicas da própolis e sua composição. Em 1968, foi publicado no Chemical Abstracts o resumo da primeira patente utilizando a própolis (PEREIRA et al., 2002).

A primeira análise sistemática da atividade antibacteriana da própolis foi realizada na década de 1940, nesse período se verificou atividade bacteriostática contra o *Staphylococcus aureus* e o bacilo tifoide (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013).

Somente a partir de 1980 é que se começou o interesse pela própolis no Brasil, por suas propriedades terapêuticas e sua utilização como antibiótico natural (LUSTOSA et al., 2008).

Apesar de ser documentado o uso ancestral da própolis, somente nas últimas décadas foram intensificados os estudos para se apropriar de suas potencialidades, sendo que o número de publicações sobre o assunto teve um crescimento quase exponencial, porém a quantidade de publicações científicas sobre o assunto ainda é baixo no Brasil, se comparado com outros países (HUBINGER; MELLO; PETRUS, 2010).

Nas últimas décadas, a própolis é conhecida como um complemento popular em várias fórmulas farmacêuticas, como pastilhas, cremes e enxaguantes bucais. A mesma vem sendo utilizada na indústria cosmética como um constituinte natural único, sendo recomendada por muitos especialistas para controlar e superar enfermidades como infecções, dermatites e úlceras (NEMATOLLAHI, 2017).

### 3.3 PRÓPOLIS

A própolis é um produto viscoso produzido pelas abelhas através da coleta de resina de origem botânica, juntamente com secreções salivares destes insetos (AHANGARI, 2018). É caracterizada como uma mistura complexa de substâncias, coletada de várias fontes vegetais e de diferentes partes secretadas pelas plantas, tais como exsudatos de feridas, materiais lipofílicos, germes, látex e resinas (LUSTOSA et al., 2008)

As abelhas utilizam a própolis para preencher as cavidades e frestas, reparar danos, reduzir o tamanho da entrada, desinfecção da colmeia, dos alvéolos onde é feita a postura dos ovos, bem como cobrir qualquer animal ou inseto morto que seja grande demais para ser carregado para fora, evitando assim a contaminação da colmeia e como regulador térmico (HUBINGER; MELLO; PETRUS, 2010).

Em temperatura elevada, a própolis é mais flexível, macia e muito mais pegajosa, mas quando resfriado se torna dura e quebradiça. Torna-se líquida entre 60 e 70 °C, mas para algumas variedades pode chegar a 100 °C (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013).

A cor apresentada pela própolis é diretamente influenciada pela estação do ano, fontes naturais onde as abelhas coletam materiais e varia conforme a região da coleta, podendo variar do marrom escuro, passando ao verde até o marrom avermelhado (HUBINGER; MELLO; PETRUS, 2010).

São descritos treze tipos de própolis no Brasil, de acordo com suas características físico-químicas e biológicas, incluindo própolis verde, própolis vermelha, própolis marrom, própolis preta, própolis amarela e a geoprópolis, as quais são diferenciadas pela cor, odor e consistência. O décimo terceiro tipo de própolis foi adicionado em 2007, como sendo proveniente da porção mais litorânea do Nordeste (FERREIRA et al., 2018).

Devido as dimensões territoriais, o Brasil possui flora diversa, que faz o país ter a maior diversidade química da própolis, sendo a verde a que tem a maior abundância de produção e consumo, tanto interna quanto externamente (RIGHI et al., 2013).

### 3.3.1 Composição Química da Própolis

Aproximadamente 300 substâncias diferentes já foram identificadas em amostras de própolis de diferentes origens, incluindo ácidos graxos, compostos fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis), terpenos,  $\beta$ -esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, (HUANG et al., 2014). A porcentagem dessas substâncias se distribui em: 50% resinas e bálsamos vegetais, 30% cera de abelha, 5% pólen, 10% óleos essenciais e aromáticos e algumas outras substâncias que também incluem compostos orgânicos, entre outros (SFORCIN, 2016).

O interesse crescente de estudos se deve ao fato de existirem diferenças significativas na composição da própolis nas diferentes regiões do Brasil, onde se verificou maior diversidade de componentes em regiões tropicais do que em regiões temperadas, com grandes quantidades de flavonoides, maiores que a própolis da Europa, América do Norte e Ásia (LUSTOSA et al., 2008). Mesmo em regiões próximas, as vezes podem ser encontradas própolis com notáveis variações das substâncias que as compõe. Embora pareça certo que uma espécie específica de fonte vegetal tenha o papel de principal fornecedora de resina, as abelhas costumam usar várias fontes vegetais para a produção de própolis, o que justifica a diferença na composição mesmo em locais próximos (RIGHI et al., 2013).

Ao se realizar análises em resina de fonte única e múltipla contra parasitas e patógenos de abelhas sem ferrão, mostrou-se que, embora algumas fontes de resina única possam ser mais eficazes contra um único parasita ou patógeno, as fontes

mistas demonstraram ser em geral mais eficazes devido ao aumento da variedade de compostos químicos presentes em sua composição (DRESCHER et al., 2014).

Muitas propriedades terapêuticas e nutricionais têm sido demonstradas para a própolis (TOUZANI et al., 2019), que se verifica como uma mistura complexa de substâncias, com muitas destas já conhecidas, com suas atividades reconhecidas como antioxidantes (ZHENG et al., 2017) e antibacterianas (BITTENCOURT et al., 2015).

### 3.3.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários naturais das plantas ao lado de terpenos e compostos nitrogenados, com o objetivo principal de defesa contra o estresse biótico e abiótico (AMORIM, 2020).

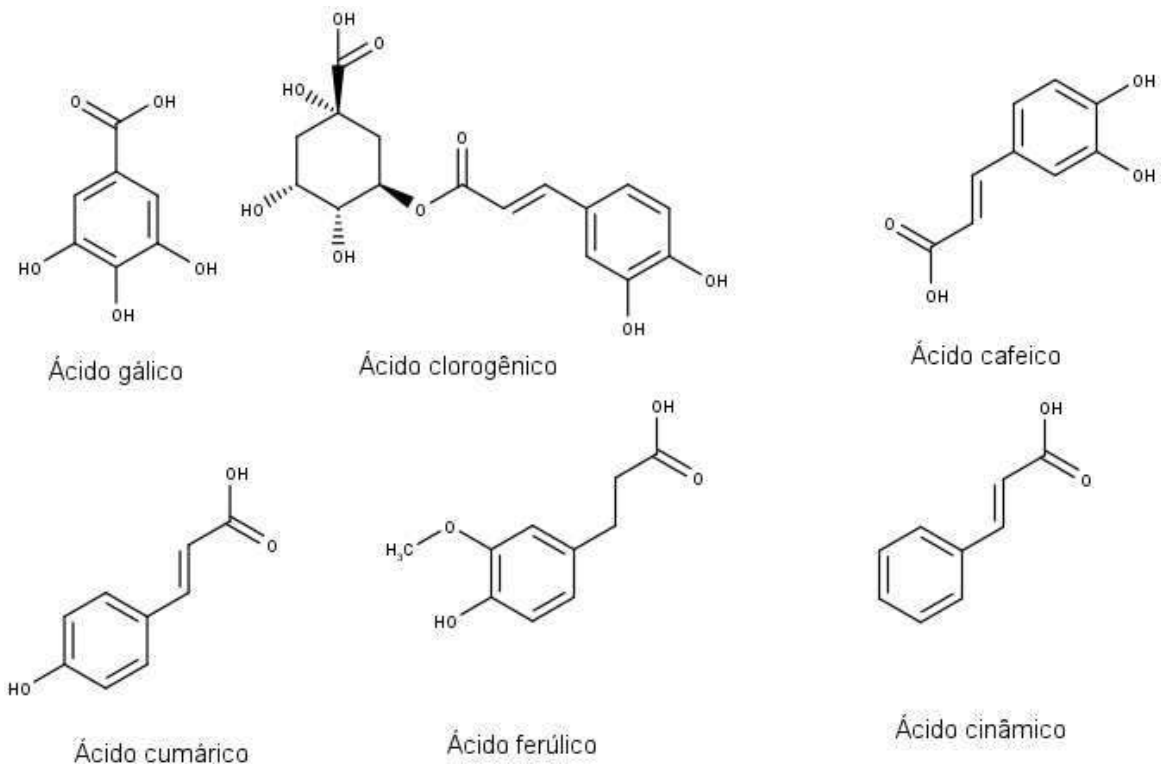
Os compostos fenólicos são reconhecidos por atuarem como antioxidantes, pois tem potencialidades de sequestrar ou inibir espécies reativas, sendo captadores de radicais livres, que podem deteriorar células e produtos causando prejuízos consideráveis (SOUSA et al., 2018).

Estes compostos contêm pelo menos uma hidroxila ligada a um anel aromático, alguns solúveis em água outros somente em solventes orgânicos, alguns inclusive insolúveis, com aproximadamente 10 mil compostos (DE LA ROSA et al., 2019).

Existem alguns compostos fenólicos mais complexos como a lignina, antocianinas, flavonoides, isoflavonoides e taninos. Fatores ambientais podem interferir na biossíntese destes compostos, aumentando consideravelmente se as plantas estiverem estressadas (AMORIM, 2020).

Constituem também o grupo dos compostos fenólicos os ácidos fenólicos, que se caracterizam por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila, conferindo propriedades antioxidantes, sendo indicados no tratamento e prevenção de muitas doenças (SOARES, 2002). A Figura 1 apresenta alguns compostos fenólicos. Por sua importância na composição química da própolis se tem investigado suas atividades.

Figura 1 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos



Fonte: Autoria própria, 2022.

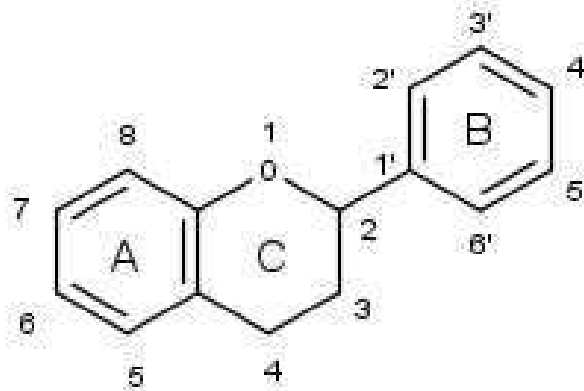
### 3.3.3 Flavonoides

Dentro do grupo de compostos fenólicos se encontra o subgrupo dos flavonoides, que compreende um grande número de substâncias coloridas, como as antocianinas, atrativo para polinizadores (AMORIM, 2020). Os flavonoides estão presentes em diversas plantas, compondo a estrutura natural dos vegetais, podendo apresentar diferentes concentrações em diferentes partes das plantas, sendo influenciadas pelas diferenças temporais e locais (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013). Eles desempenham papel importante no metabolismo humano, neutralizando compostos prejudiciais e trazendo benefícios a saúde (DA SILVA; BIESKI, 2018).

Os flavonoides possuem uma estrutura básica que consiste em 15 átomos de carbono e núcleo formado por C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), os benzenos, interligados a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), conforme pode ser visto na figura 2, variações no anel heterocíclico originam as diversas classes de flavonoides (DA SILVA; BIESKI, 2018).



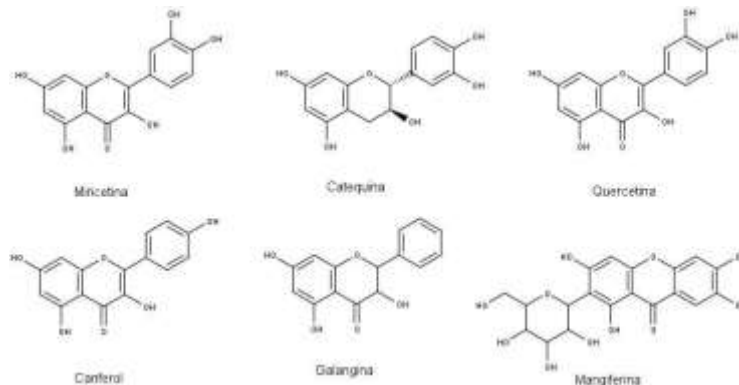
Figura 2 - Estrutura básica de um flavonoide



Fonte: Autoria própria, 2022

Neste grupo, encontram-se os flavonóis, flavonas, isoflavonas, auronas, calconas, flavanonas e antocianidinas (RODRIGUES DA SILVA et al., 2015). A Figura 3 apresenta a estrutura de alguns flavonoides.

Figura 3 - Estrutura química de alguns flavonoides



Fonte: Autoria própria, 2022

Metabólitos secundários como os flavonoides apresentam valores nutricionais e farmacológicos importantes devido a suas diferentes propriedades, como antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, citotóxico, antioxidante, anti-hipertensivo, hipolipidêmico e anti-inflamatório (DA SILVA; BIESKI, 2018).

As atividades antioxidantes dos flavonoides podem ser explicadas por sua prevenção a peroxidação lipídica através do aprisionamento de radicais de iniciação lipídica, tais como, superóxido, hidroxil e hidroperóxil. Alguns dos grupos hidroxila podem ser metilados, acetilados ou sulfatados (LIMA, 2012).

### 3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são compostos que diminuem ou impedem a oxidação do substrato, aumentando a vida útil do produto, reduzindo o desperdício de matéria-prima, diminuindo perdas nutricionais e estabilizando o número de lipídios que podem estar presentes em produtos específicos, estando presentes de forma natural no alimento, surgem durante o processamento ou podem ser adicionados aos produtos (CUTRIM, 2017).

A oxidação, uma vez iniciada na presença de um substrato, consiste em um processo contínuo em cadeia até que ocorra um mecanismo de defesa ou bloqueio, levando a diminuição da vida útil da substância oxidada (ANTOLOVICH, 2002). O processo mais comum que leva a degradação de alimentos e sistemas biológicos e produtos alimentícios, são as reações desencadeadas pelo oxigênio atmosférico e seus derivados, deteriorando as substâncias mais suscetíveis que os compõe (SHAHIDI, 2015).

Em organismos vivos, os antioxidantes são responsáveis por inibir ou diminuir as lesões causadas pelos radicais livres formados ou absorvidos pelo metabolismo celular, sendo estes endógenos ou exógenos (BENTO, 2015). Os radicais livres endógenos são originados pelo próprio organismo durante as reações metabólicas e os exógenos são obtidos através da má alimentação, tabagismo, poluição, exposição solar inadequada, entre outras (PEREIRA, 2012). Os radicais livres endógenos são importantes para as defesas do organismo, nosso corpo além de produzir os radicais livres através dos processos respiratórios também produz antioxidantes endógenos, fazendo com que haja um balanceamento do fator radical livre – antioxidante (CAMPOS; LEME, 2017). Quando radicais livres estão em excesso ocorre o estresse oxidativo, desencadeando problemas funcionais ao organismo afetado, como envelhecimento celular e o desenvolvimento de várias doenças, como Alzheimer, câncer, artrite, diabetes, entre outros.

A própolis contém compostos antioxidantes importantes que podem limitar e prevenir a propagação de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. (BONAMIGO et al., 2017). Esta ação antioxidante desempenha papel importante na melhoria da saúde, prevenção e controle de muitas enfermidades que atingem os humanos (KOCOT et al., 2018).

Muitos dos mecanismos de ações de antioxidantes naturais que levam a melhoria da qualidade de vida, se devem, em parte, ao fato de muitos alimentos naturais apresentarem de compostos fenólicos (SICHIERI, 2013), como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, taninos hidrolisáveis, cumarinas, ácido ascórbico e tocoferóis (CUTRIM, 2017).

Estudos demonstram que a própolis com maior número de compostos fenólicos tem demonstrado maior capacidade antioxidante frente aqueles com menor número (SUN et al., 2015). Análises tem demonstrado, na própolis, uma correlação direta entre a quantidade de flavonoides identificados e a sua capacidade de atuar efetivamente como antioxidante (LUSTOSA et al., 2008).

Dada a importância dos flavonoides na própolis, eles são marcadores, de forma que a quantidade de flavonoides demonstra a qualidade da própolis. A atividade desses compostos deve-se principalmente às suas características estruturais como composto tricíclico e à presença de radicais ligados aos seus anéis (BATISTA et al., 2012).

Estas substâncias, reconhecidas por terem a capacidade de agir como antioxidantes naturais, provocando um maior interesse para o uso em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, são capazes de substituir antioxidantes sintéticos suspeitos de induzir efeitos danosos ao corpo humano (SILVA, 2018).

Na indústria de alimentos, ainda é escasso a aplicação de antioxidantes naturais, sendo assim, os mais utilizados são os antioxidantes sintéticos, usados para estabilizar óleos, gorduras e alimentos lipídicos, podendo ser utilizados puros ou em combinação. Os antioxidantes comumente utilizados são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e o galato de propila (GP) (CUTRIM, 2017).

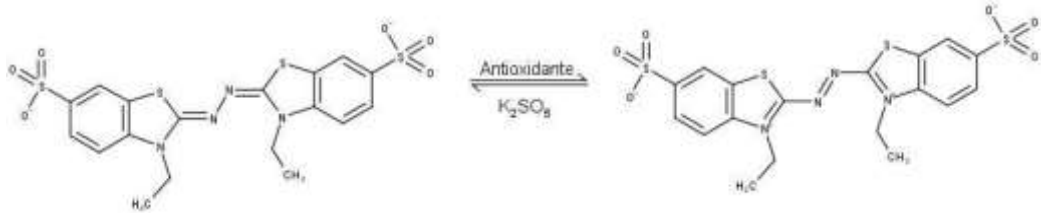
#### 3.4.1 Métodos de análises de antioxidantes

Dentre os métodos para avaliação e quantificação da atividade antioxidante em extratos de própolis, podem-se destacar o método do sequestro do radical ABTS, sequestro do radical DPPH e o método de redução do  $Fe^{3+}$  em  $Fe^{2+}$  (FRAP) (SUN et al., 2015).

O método ABTS mede a capacidade de um antioxidante de capturar o radical ABTS, que se baseia na redução do cátion do radical 2,2-azinobis (3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (Figura 4), neutralizando o radical (ANDRADE et al, 2017), podendo ocorrer pela doação de átomos de hidrogênio, pela transferência de elétrons ou pela combinação dos dois mecanismos (SICHIERI, 2013).

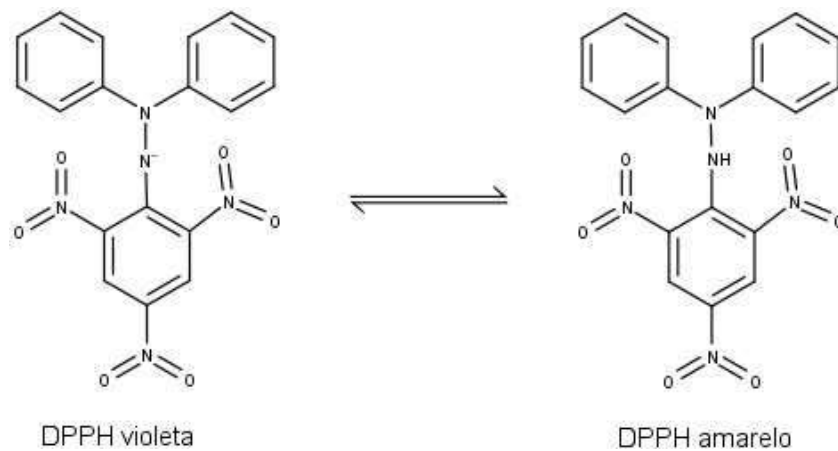
Figura 4 - Mecanismo de reação do método ABTS.



Fonte: Autoria própria, 2022.

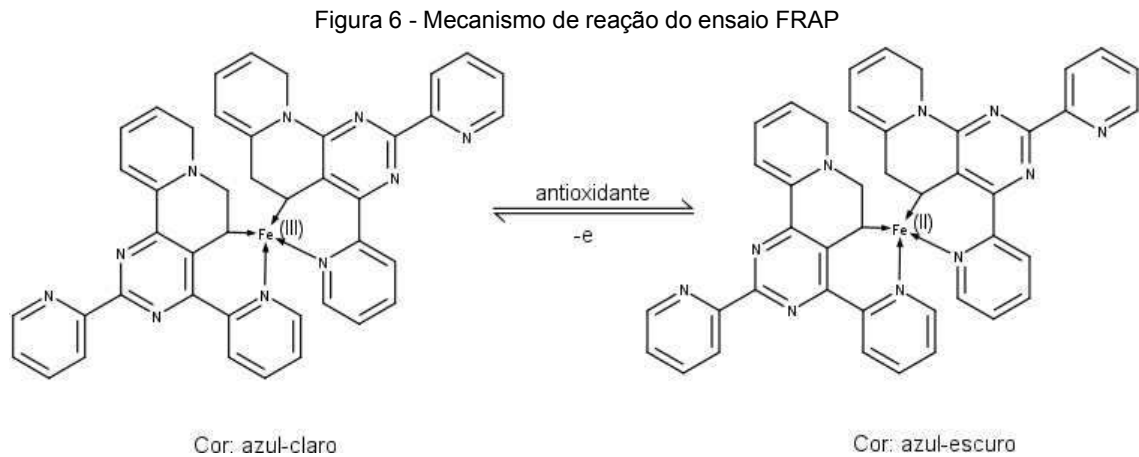
O ensaio utilizando radical estável DPPH mede a capacidade do agente antioxidante em doar hidrogênio radicalar ao radical sintético DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de cor violeta e reduzindo-o a sua forma não radical denominada hidrazina, de coloração amarela (Figura 5) (ALVES et al., 2010).

Figura 5 - Mecanismo de reação da análise DPPH.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Por fim, o método FRAP (poder de redução do ferro) (Figura 6) é um método que avalia o poder de redução dos extratos antioxidantes, sendo que o mecanismo de reação dos antioxidantes de oxido-redução é avaliado pela redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (DUDONNE et al., 2009).



Fonte: Autoria própria, 2022.

### 3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Estudos quanto a capacidade da própolis em atuar como agente antibacteriano tem sido demonstrado (BERRETTA et al., 2018; WOJTYCZKA et al., 2013), verificando-se os mesmos benefícios que as abelhas têm frente a seus invasores bacterianos, podendo ser aproveitado como agente antibacteriano (MOCANU et al., 2019),

Os componentes da própolis são associados ao efeito antibacteriano em várias bactérias, sendo estas Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonie*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococans pyocogenes*, em que o ácido cinâmico foi relatado como um dos principais compostos com atividade antibacteriana (PRZYBYŁEK; KARPINSKI, 2019).

Alguns pesquisadores atribuem o mecanismo de ação contra as bactérias ao fato de atuarem na inibição da síntese proteica e divisão celular. a complexidade do funcionamento dificulta fazer indagações que levem a identificar o mecanismo de ação, para reforçar este entendimento, se verificou a liberação para o meio de incubação das bactérias o seu material intracelular, a partir de extratos etanólicos de própolis, reforçando a causa de rompimento celular (TORRES et al., 2018). A ação contra as bactérias pode ocorrer de duas formas, diretamente sobre o microrganismo, quando a substância age diretamente na bactéria causando rompimento do potencial de membrana, interferindo na produção de trifosfato de adenosina (ATP), bem como

através da diminuição da mobilidade bacteriana, ou de maneira indireta, estimulando as defesas do próprio sistema imunológico através do reforço promovendo o estímulo para as defesas naturais (PRZYBYŁEK; KARPINSKI, 2019).

Alguns compostos encontrados em análises de própolis apontam evidências que sustentam a correlação destes com ação antibacteriana, como ácido isocupressico, totarol, hinokiol, Artepillin C (TORRES et al., 2018), apresentando maior ação bactericida contra gram-positivas do que contra as gram-negativas (CAMPOS et al., 2015). O ácido *p*-cumárico apresentou atividade antibacteriana frente as bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e bactérias Gram-negativas (*Shigella dysenteriae*, *Escheirchia coli* e *Salmonella typhimurium*) (LOU et al., 2012). A permeabilidade da parede celular das bactérias gram-positivas, mesmo sendo maior que as gram-negativas, acaba por facilitar a ação dos compostos da própolis, que tem maior dificuldade de ação sobre as gram-negativas pelo fato destas possuírem uma parede celular quimicamente constituída de lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas (ABUBAKAR et al., 2014).

Substâncias como os compostos fenólicos ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e o diterpeno ácido caurenóico, identificados na composição da própolis, já foram descritos como sendo responsáveis pela atividade antibacteriana da própolis provenientes de muitas espécies de abelhas do Brasil, descritos como os principais agentes que interferem diretamente em processos metabólicos vitais e essenciais para as bactérias (CAMPOS et al., 2015).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Foram coletadas amostras de própolis de 03 espécies de ASF: *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* e *Plebeia droryana*, conhecidas popularmente por Jataí, Mandaçaia e Mirim, respectivamente. As amostras foram coletadas durante o mês de agosto de 2021, em um apiário no município de Pato Branco – PR, cujas coordenadas geográficas foram 26°15'01,6"S 52°39'36,0"W. As amostras de própolis foram liofilizadas em liofilizador (AlfaMare L101 Uberaba, MG, Brasil) e maceradas em almofariz e pistilo, para então serem armazenadas a -12 °C para posterior preparo dos extratos.

### 4.2 REAGENTE E MICRORGANISMOS

Os principais reagentes utilizados para análise de compostos fenólicos e capacidade antioxidante foram o Folin-Ciocateau, DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ABTS•<sup>+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico) e o 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ). Para a atividade antibacteriana foram utilizados ágar BHI (Brain heart infusion), caldo BHI, clorafenicol e resazurina. As bactérias utilizadas nesse experimento foram *Salmonella typhimurium* ATCC 0028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 e *Bacillus subtilis* ATCC 19659.

### 4.3 PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Em tubos Falcon, 1 g de cada amostra de própolis liofilizada foi extraída com 15 mL de solução etanólica a 20% ou 80% (20:80 e 80:20 etanol/água, respectivamente). A extração se deu em banho ultrassônico (Cristofoli, Campo Mourão, PR, Brasil) a 25 °C por 40 minutos. Em intervalos de 10 minutos, os tubos foram homogeneizados com vórtex (SL 222, São Paulo, Brasil). Após esta etapa, o extrato bruto foi filtrado em papel de filtro e o sobrenadante armazenado a -12 °C para posteriores análises. As condições de extração foram realizadas com algumas adaptações segundo estudos anteriores conduzidos por Tiveron et al. (2016).

### 4.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 4.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu segundo Reis et al. (2017). Uma alíquota de 0,5 mL dos respectivos extratos foi transferida para tubos Falcon de 15 mL, e adicionados de 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). Após 5 minutos de repouso, 2,0 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4% foi adicionado e homogeneizado em vórtex. As soluções foram incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e a leitura da absorbância a 740 nm foi realizada após 2 h de reação em espectrofotômetro (Bel Photonics 2000, Piracicaba, Brasil). Como padrão de referência, utilizou-se o ácido gálico para a curva padrão e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por grama da amostra (EAG: equivalentes em ácido gálico).

#### 4.4.2 Atividade de sequestro do radical DPPH•

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pereira et al. (2017). O radical estável DPPH foi preparado em uma solução de etanol 0,3 mM. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparecerá após a redução pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante. A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL dos extratos de própolis, 2,8 mL de etanol absoluto e 0,5 mL da solução do radical DPPH 0,3 mM. A reação foi deixada ao abrigo da luz durante 30 minutos e as leituras realizadas a 517 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol ET  $\text{g}^{-1}$  de própolis com o uso de uma curva padrão de Trolox (ET: Equivalente em Trolox).

#### 4.4.3 Atividade antioxidante de sequestro do radical ABTS•<sup>+</sup>

A atividade antioxidante pelo método ABTS•<sup>+</sup> (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)) foi determinada conforme metodologia descrita por Re et al., (1999). O radical ABTS•<sup>+</sup> foi formado pela reação da solução ABTS•<sup>+</sup> 7 mM com persulfato de potássio 140 mM quando incubados à temperatura de 25 °C ao abrigo da luz, durante 12-16 h. Após esse período, o radical foi diluído em etanol



absoluto até obter o valor de absorvância de 0,7 em comprimento de onda de 734 nm. 30 µL de cada extrato foi transferido separadamente para tubos Falcon de 15 mL e, adicionando 3,0 mL de solução radical ABTS corrigida. A reação ficou em repouso por 6 minutos e as leituras a 734 nm foram realizadas zerando o espectrofotômetro com etanol. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mmol ET g<sup>-1</sup> de própolis com o uso de uma curva padrão de Trolox (ET: Equivalente em Trolox).

#### 4.4.4 Atividade antioxidante pelo método FRAP

O ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) seguiu a metodologia adaptada de Pulido et al., (2000) e baseia-se na capacidade do antioxidante em reduzir o Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup> na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) em condições ácidas, formando-se um complexo de coloração azul intensa com o Fe<sup>+2</sup>. A análise foi realizada em ambiente escuro, adicionando-se uma alíquota de 90 µL de extrato diluído a 2,7 mL de reagente FRAP. Após homogeneização, as amostras foram mantidas em banho-maria à 37 °C por 30 minutos. Após esse período, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 595 nm. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mmol Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup>, determinada a partir de uma curva padrão de Fe<sup>+2</sup> g<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para verificação do potencial antimicrobiano dos extratos, foram determinadas as concentrações inibitórias mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM).

#### 4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada frente aos microrganismos *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*. Os inóculos foram preparados a partir de colônias com 24 horas de incubação em meio ágar nutriente, sendo ressuspensos em tubos contendo soro fisiológico estéril e ajustados para o valor de absorvância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o equivalente a 1-2x10<sup>8</sup> UFC/mL. 50 µL das suspensões bacterianas foi inoculado em 50 mL de caldo BHI, de modo a obter concentração bacteriana em torno de 1-2x10<sup>5</sup> UFC/mL,

sendo a mistura homogeneizada. A análise foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de caldo BHI previamente inoculado. 1  $\mu\text{L}$  dos extratos em concentrações que variaram de 66,67 a 1,04 mg/mL (diluição seriada de razão 2). Como controle positivo, foi utilizado clorafenicol 0,12% (m/v) e como controle negativo o etanol 80 e 20% (v/v) e o etanol p.a. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após a incubação, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  do corante Resazurina (0,01%, m/v) para se verificar em quais poços houve crescimento bacteriano. Nos poços em que não houve mudança de cor do corante resazurina, ou seja, permaneceram azuis, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração foi considerada crescimento bacteriano.

#### 4.5.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada utilizando-se placas de Petri contendo ágar BHI. Baseados nos resultados positivos obtidos no teste da CIM, foram utilizados como inóculo as suspensões provenientes dos poços da microplaca que apresentaram resultado positivo. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas de ágar BHI esterilizado a 37 °C por 24 horas. A CBM foi considerada a menor concentração que causou 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar.

#### 4.6 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC-DAD

O perfil fenólico e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de própolis foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, Varian – 900 LC) acoplado com detector de arranjo de fotodiodo (DAD) e coluna de fase reversa C18 (ACE-121-2546 – 250 x 4,6 mm). Foram utilizados os padrões ácidos fenólicos gálico, clorogênico, cafeico, cumárico, ferrúlico e cinâmico e flavonoides: rutina, miricetina, catequina, epicatequina, quercetina, canferol, mangiferina, pinicembrina, crisina e galangina. As condições do equipamento foram: fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , temperatura de 30 °C, fase móvel: (A)  $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  (99,8:0,2 v v<sup>-1</sup>); (B)  $\text{CH}_3\text{OH}$  (100%) com gradiente iniciando em 64% de B (15 min), 75% de B (26 min), 95% de B (28 min), 95% de B (patamar em 32 min), 30% de B (33 min), 30% de B (43 min)

(estabilização da coluna). A quantificação foi realizada nas faixas de concentração de 1 a 50 ppm.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste experimento foi utilizado o desenho experimental do tipo delineamento inteiramente casualizado (DIC). As análises foram realizadas em triplicata ( $n=3$ ) e foram expressas em média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados dos ensaios realizados neste experimento foram CFT e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP e foram avaliados por análise de variância (ANOVA) fatorial, com dois fatores: espécies de abelhas e concentração de etanol. Após desta análise, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ) no Software R.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

De maneira geral, o teor de compostos fenólicos totais variou de 2,26 a 61,02 mg EAG/g de própolis, enquanto a atividade antioxidante pelo método do sequestro do DPPH variou de 0,68 a 26,54 mmol ET/g de própolis (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante para as amostras de própolis produzida por *M. quadrifasciata*, *P. droryana* e *T. angustula*.

ASF (EEP)	Solvente (% etanol)	CFT (mg EAG g <sup>-1</sup> )	DPPH (mmol ET g <sup>-1</sup> )	ABTS (mmol ET g <sup>-1</sup> )	FRAP (mmol Fe <sup>+2</sup> g <sup>-1</sup> )
<i>M. quadrifasciata</i>	80	61,02±1,65 <sup>a</sup>	26,54±1,40 <sup>a</sup>	695,10±11,32 <sup>a</sup>	327,30±9,84 <sup>b</sup>
<i>M. quadrifasciata</i>	20	25,52±1,21 <sup>b</sup>	18,45±1,91 <sup>b</sup>	637,60±18,63 <sup>b</sup>	367,80±5,41 <sup>a</sup>
<i>P. droryana</i>	80	14,15±0,59 <sup>c</sup>	1,88±0,21 <sup>c</sup>	221,70±4,77 <sup>c</sup>	91,51±3,76 <sup>c</sup>
<i>P. droryana</i>	20	4,28±0,25 <sup>d</sup>	2,83±0,40 <sup>c</sup>	169,70±20,46 <sup>d</sup>	33,77±6,29 <sup>d</sup>
<i>T. angustula</i>	80	14,52±0,23 <sup>c</sup>	1,30±0,52 <sup>c</sup>	221,37±16,75 <sup>c</sup>	37,10±2,50 <sup>d</sup>
<i>T. angustula</i>	20	2,26±0,16 <sup>d</sup>	0,68±0,13 <sup>c</sup>	162,37±9,22 <sup>d</sup>	29,18±1,91 <sup>d</sup>

ASF: Abelhas sem ferrão, EEP: Extrato etanólico de própolis; CFT: Compostos fenólicos totais; EAG: Equivalente em ácido gálico; ET: Equivalente em Trolox; <sup>a, b, c, d</sup>Letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença significativa no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,5$ ).

Além da análise estatística descritiva apresentada (Tabela 1) realizou-se a análise de variância (Tabela 2) e subsequentemente o teste de Tukey, relatado nesse estudo.

Tabela 2. Resultados da análise de variância para as respostas: CFT, DPPH, ABTS e FRAP em amostras de própolis de abelhas sem ferrão.

Resposta	Fatores	Graus de liberdade	SQ	QM	F	p
CFT	Intercepto	1	7409,50	7409,50	9517,45	0,0000
	Espécies	2	4753,16	2376,58	3052,70	0,0000
	Etanol	1	1660,42	1660,42	2132,79	0,0000
	Espécies*Etanol	2	601,48	300,74	386,30	0,0000
	Resíduo	12	9,34	0,78		
	Total	17	7024,40			
DPPH	Intercepto	1	1335,02	1335,02	1311,68	0,0000
	Espécies	2	1739,15	869,57	854,37	0,0000
	Etanol	1	30,15	30,15	29,63	0,0001
	Espécies*Etanol	2	70,02	35,01	34,40	0,0000
	Resíduo	12	12,21	1,02		
	Total	17	1851,54			
ABTS	Intercepto	1	2221480,68	2221480,68	10391,54	0,0000
	Espécies	2	893321,10	446660,55	2089,37	0,0000
	Etanol	1	14196,13	14196,13	66,41	0,0000
	Espécies*Etanol	2	40,75	20,38	0,10	0,9098
	Resíduo	12	2565,33	213,78		
	Total	17	910123,31			
FRAP	Intercepto	1	393088,89	393088,89	12437,88	0,0000
	Espécies	2	361791,22	180895,61	5723,79	0,0000
	Etanol	1	316,68	316,68	10,02	0,0081
	Espécies*Etanol	2	7240,30	3620,15	114,55	0,0000
	Resíduo	12	379,25	31,60		
	Total	17	369727,45			

SQ: Soma dos Quadrados; QM: Quadrado médio; F: teste Anova (Fisher); p:  $p_{\text{valor}}$

Foi possível observar que a concentração do solvente influenciou na extração de CFT em própolis de *M. quadrifasciata*, mostrando a eficiência do etanol em extrair esses compostos bioativos, sendo o teor de CFT extraída com etanol 80% superior ao teor da amostra extraída com etanol 20%. Por outro lado, a própolis oriunda da *M. quadrifasciata* apresentou maiores teores de CFT em ambas as condições de extração (Etanol 20 e 80%) em comparação às demais amostras de própolis analisadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A própolis oriunda da *M. quadrifasciata* extraída com etanol 80% também apresentou os melhores resultados de atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, com valores de 26,54 e 695,10 mmol ET g<sup>-1</sup>, respectivamente. A atividade antioxidante dessa própolis apresentou também diferenças estatísticas significativas das demais própolis analisadas ( $p < 0,05$ ) (Tabela

2). Comportamento diferente foi observado na análise de FRAP, onde o maior poder antioxidante ( $367,80 \text{ mmol Fe}^{+2} \text{ g}^{-1}$ ) foi verificado para a própolis de *M. quadrifasciata* extraída com etanol 20% e houve diferenças estatísticas das demais própolis (Tabela 2).

As própolis de *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* extraídos com etanol 80% não apresentaram diferenças estatísticas entre si quanto ao teor de compostos fenólicos totais de 14,52 e 14,15 mg EAG/g, respectivamente. Da mesma forma, a pelo sequestro dos radicais DPPH e ABTS também não diferiram significativamente (Tabela 2), sendo DPPH 1,88 e 1,30 mmol ET/g e ABTS 221,70 e 221,37 mmol ET/g para e *T. angustula* e *P. droryana*, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado com as própolis dessas espécies quando extraídas com etanol 20%, pois também não apresentaram diferenças estatísticas entre si quanto ao teor de CFT e AA avaliado pelo sequestro dos radicais DPPH, ABTS e FRAP.

De maneira geral, nesse estudo os teores de CFT encontrados em própolis oriundas de abelhas *T. angustula* e *M. quadrifasciata* foram superiores aos relatados por Cardozo et al. (2015) em própolis coletadas em Prudentópolis – PR no ano de 2012. Os autores avaliaram 5 amostras de própolis, entre elas *T. angustula* e *M. quadrifasciata* oriundas de 5 apiários diferentes e encontraram valores entre 2,90 e 18,10 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  com média de 8,60 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  para *M. quadrifasciata* e valores entre 1,80 e 20,60 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  e média de 9,48 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  para *T. angustula*.

Turco et al. (2020) também avaliaram CFT em própolis de 06 espécies de ASF oriundas de 05 estados Brasileiros: *Melipona quadrifasciata* (13), *Melipona marginata* (9), *Tetragonisca angustula* (9), *Melipona scutellaris* (4), *Melipona fasciculata* (3) e *Melipona bicolor* (2). Nas amostras de própolis de *M. quadrifasciata* (12 do PR e 01 de SP) e *T. angustula* do Paraná, os autores obtiveram valores entre 1,14 e 17,43 mg EAG  $\text{g}^{-1}$ . As amostras paranaenses de própolis produzida por *M. quadrifasciata* apresentaram média de 4,04 mg EAG  $\text{g}^{-1}$ , enquanto a única amostra de própolis de SP apresentou teor de CFT de 26,30 mg EAG  $\text{g}^{-1}$ . Para as 09 amostras de própolis de *T. angustula produzida no PR*, os resultados ficaram entre 4,62 e 10,30 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  e média de 6,59 mg EAG  $\text{g}^{-1}$ . Esses resultados foram inferiores aos encontrados no presente trabalho. Por outro lado, Piccinini et al. (2022) encontraram CFT de 126,52 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  em própolis da *M. quadrifasciata* coletadas no Rio Grande do Sul, valor superior aos encontrados nesse estudo.

Em estudo anterior feito com a própolis de *M. quadrifasciata* coletado no estado do Rio de Janeiro em 2015, Sousa et al. (2019) obtiveram resultados que variaram de 1,7 a 11,2 mg EAG g<sup>-1</sup>.

A atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH foi entre 0,68 mmol g<sup>-1</sup> e 26,54 mmol Trolox g<sup>-1</sup>, sendo que o EEP de própolis produzida por *M. quadrifasciata* extraída com etanol 80% obteve os melhores resultados seguido do extrato dessa mesma própolis quando extraída com etanol 20%. As amostras de própolis de *T. angustula* obtiveram os menores resultados de AA nas duas concentrações de solvente, sendo que para os extratos feitos com teor de 20% de etanol, o valor obtido foi de 0,68 mmol ET g<sup>-1</sup>, abaixo dos resultados obtidos para amostras de própolis de *M. quadrifasciata*, com resultado de 18,45 mmol g<sup>-1</sup>.

Em estudo dirigido por Torres et al. (2018) em SC a AA pelo método do radical DPPH em própolis das espécies *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *T. angustula* foi avaliada e os autores encontraram valores de EC<sub>50</sub> de 241,8 µg mL<sup>-1</sup> para a própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata*, sendo sua atividade antioxidante dez vezes maior que o EEP da *T. angustula*, com EC<sub>50</sub> de 2433,0 µg mL<sup>-1</sup>. Resultado semelhante em proporção com este estudo, onde a *Melipona quadrifasciata* foi superior comparado a *Tetragonisca angustula*, que obteve resultados inferiores a *Plebeia droryana*.

A *P. droryana* teve como resultado EC<sub>50</sub> = 182,4 µg mL<sup>-1</sup> em estudo produzido no MS, onde se comparou com *Apis mellifera* e com o antioxidante sintético BHT, onde estes dois obtiveram atividade aproximadamente três vezes melhor que a *Plebeia droryana* (BONAMIGO et al., 2017).

Pela análise de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>, os resultados encontrados foram de 162,37 a 695,10 mmol ET g<sup>-1</sup>, sendo que a *Melipona quadrifasciata* extraída com etanol 80% apresentou o melhor resultado para este método (695,10 mmol ET g<sup>-1</sup>) e diferiu estatisticamente dos demais (Tabela 1). Para os extratos obtidos com etanol 20%, os resultados foram significativamente menores, principalmente para as própolis *Plebeia droryana* e *Tetragonisca angustula* com valores respectivos de 169,70 e 162,37 mmol ET g<sup>-1</sup>.

Bonamigo et al. (2017) utilizou a concentração de 13,35 µg/mL do extrato de própolis de *Melipona quadrifasciata* para inibir 50% do radical ABTS. Souza et al. (2019) utilizaram entre 5,04 e 13,38 mmol ET 100 mg<sup>-1</sup> para inibir o radical ABTS.

Quanto a atividade antioxidante dos compostos redutores de Fe pelo método

FRAP, essa variou de 29,18 a 367,80 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup>. Por esse método, ao contrário dos demais métodos de atividade antioxidante, o EEP da *Melipona quadrifasciata* obteve os melhores resultados quando extraído com etanol 20% (368,55 mM g<sup>-1</sup>) em comparação com o EEP obtido com etanol 80% (327,30 mM g<sup>-1</sup>).

A aplicação da metodologia FRAP para avaliação de atividade antioxidante é relativamente nova para análise de própolis oriunda de ASF. Turco et al. (2020) utilizaram este método para avaliar própolis de 06 espécies de ASF, obtendo valores entre 0,01 µg.g<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 28,61 µg g<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> entre todas as espécies, sendo que para a *Melipona quadrifasciata* entre 0,01 e 5,89 µg g<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e para a *Tetragonisca angustula* resultados abaixo do limite de detecção até 15,38 µg g<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>.

## 5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O uso indiscriminado de medicamentos vem provocando o surgimento de microrganismos resistentes, o que provoca um maior interesse em buscar moléculas alternativas que venham a combater este problema, sem os efeitos adversos que os medicamentos convencionais possuem. Por muito tempo, a própolis foi utilizada como medicamento popular contra infecções (FARNESI, 2007). Atualmente, a própolis tem sido extensivamente estudada por seus inúmeros benefícios medicinais, como atividades antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (PRZYBYŁEK e KARPIŃSKI, 2017; RAO et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Estudos com própolis de ASF demonstraram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (TORRES et al., 2018), *Bacillus subtilis* (AL-ANI et al., 2018), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella thipimurium* (POPOVA et al., 2021).

A atividade antibacteriana de um extrato pode ser avaliada a partir da menor quantidade necessária para inibir o crescimento de um determinado microrganismo patogênico, sendo esta quantidade denominada concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, constatando-se seu efeito bacteriostático. Da mesma forma, a ação bactericida é verificada como sendo a concentração mínima necessária que resulta na morte celular, ou seja, a concentração bactericida mínima (CBM).

A determinação da CIM foi realizada com as bactérias: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* em concentração bacteriana de 1-2x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Neste estudo, as concentrações finais dos extratos etanólicos de própolis no meio reacional variaram de 5,44 a 349 µg mL<sup>-1</sup> e os resultados estão expressos na Tabela 3.



Tabela 3 - Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos EEP produzidos por *M. quadrifasciata*, *P. droryana* e *T. angustula*.

CIM					
EEP	Solvente (%etanol)	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>M. quadrifasciata</i>	80	$\geq 5,44$	$\geq 43,6$	$\geq 21,8$	$\geq 43,6$
<i>M. quadrifasciata</i>	20	>349	>349	>349	>349
<i>P. droryana</i>	80	$\geq 5,44$	$\geq 10,9$	$\geq 5,44$	$\geq 10,9$
<i>P. droryana</i>	20	$\geq 349$	>349	>349	>349
<i>T. angustula</i>	80	$\geq 5,44$	$\geq 21,8$	$\geq 5,44$	$\geq 21,8$
<i>T. angustula</i>	20	>349	>349	>349	>349
CBM					
EEP	Solvente (%etanol)	<i>E.coli.</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>M. quadrifasciata</i>	80	$\geq 10,9$	>349	>349	$\geq 349$
<i>M. quadrifasciata</i>	20	>349	>349	>349	>349
<i>P. droryana</i>	80	$\geq 87,3$	$\geq 349$	$\geq 174$	$\geq 43,6$
<i>P. droryana</i>	20	>349	>349	>349	>349
<i>T. angustula</i>	80	$\geq 10,9$	$\geq 21,8$	$\geq 349$	$\geq 43,6$
<i>T. angustula</i>	20	>349	>349	>349	>349

EEP: Extrato etanólico de própolis.

A CIM dos EEP de *Melipona quadrifasciata*, *Plebeia droryana* e *Tetragonisca angustula* extraídos com etanol 80% foi de 5,44  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contra a *Escherichia coli*. Já com os EEP extraídos com etanol 20% não apresentaram poder de inibição contra a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e *B. subtilis* nas concentrações estudadas, sendo assim a CIM considerada  $> 349 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em extratos etanólicos a 80%, a *L. monocytogenes* também foi inibida pelos EEP da *P. droryana* e *T. angustula* ambas com CIM de 5,44  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No entanto, a *L. monocytogenes* foi mais resistente ao EEP etanólico 80% da *M. quadrifasciata*, apresentando CIM de 21,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nessa condição de extração (etanol 80%), a *S. typhimurium* e o *B. subtilis* apresentaram os mesmos valores de CIM para as própolis oriundas da *M. quadrifasciata* (43,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), *T. angustula* (21,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *P. droryana* (10,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). De maneira geral, a *P. droryana* apresentou melhores resultados de inibição contra todas as bactérias testadas nesse estudo (Tabela 3).

Torres et al. (2018) realizou estudo de CIM a partir de EEP das espécies de ASF *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*, contra as bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à Meticelina) e Gram-negativas (*E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*). Os EEP de própolis *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* apresentaram melhores resultados contra todas as bactérias analisadas, encontrando valores de CIM de 5 e 7  $\text{mg mL}^{-1}$  para as bactérias Gram-negativas e entre 2 e 7  $\text{mg/mL}$  para as bactérias Gram-positivas.

Rzybyłek e Karpinski (2019) obtiveram valores de CIM com EEP para *B. subtilis* entre 21  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *S. aureus* entre 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 3100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *E.coli* entre 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e *Salmonella spp* entre 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 14700  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

<sup>1</sup>. Os valores mínimos não demonstram diferenças significativas entre Gram-positivas e Gram-negativas, mas nos valores máximos e fazendo uma média entre os valores encontrados, foi possível observar uma resistência maior alcançada pelas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella spp*). Segundo trabalho desenvolvido por Farnesi (2007), onde foi determinado CIM de própolis oriunda dos meliponíneos (*Plebeia droryana*, *Tetragonisca angustula* e *Melipona quadrifasciata*) diante das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, a espécie *Melipona quadrifasciata* foi a única ASF a inibir as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, na concentração de 199  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e *Staphylococcus aureus*, com 397  $\mu\text{g}$

mL<sup>-1</sup>, enquanto que a *Escherichia coli* não foi inibida por nenhuma das espécies de ASF, por possuir uma parede celular mais complexa e menos permeável aos compostos (TORRES et al., 2018).

Na determinação da CBM, as amostras provenientes dos poços das microplacas que apresentaram resultado positivo na CIM foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas a 35 °C por 24 h. Foi considerado positivo para CBM a suspensão que não apresentou nenhuma célula viável visível na placa inoculada. Os resultados da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis sobre as bactérias podem ser observados na Tabela 3.

Todos os 3 tipos de própolis extraídos com etanol 20% não apresentaram ação bacteriostática e bactericida frente a todas as bactérias estudadas. Desta forma, como em todas as concentrações houve crescimento bacteriano, a CIM e CBM dessas própolis foi considerada > 349 µg mL<sup>-1</sup>. Entre as própolis extraídas com etanol 80%, as própolis oriundas das espécies *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* foram mais efetivas frente a *Escherichia coli* e apresentaram CBM igual a 10,9 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto a *Plebeia droryana* apresentou CBM igual a 87,3 µg mL<sup>-1</sup>. As três própolis apresentaram ação bacteriostática (CIM) igual a 5,44 µg mL<sup>-1</sup>, porém tiveram ações bactericidas diferentes frente a *Escherichia coli*. A CBM da própolis de *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* foi igual a 10,9 µg mL<sup>-1</sup>, enquanto a própolis de *Plebeia droryana* teve ação bactericida (CBM) igual a 87,3 µg mL<sup>-1</sup> frente a *Escherichia coli*.

As bactérias *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* foram mais resistentes aos EEP extraídos com etanol 80% de *Melipona quadrifasciata*, considerando-se CBM >349 µg mL<sup>-1</sup>. Frente a essas bactérias, a própolis de *Tetragonisca angustula* extraída com etanol 80% apresentou ação bactericida (CBM) igual a 21,8, 349 e 43,6 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A *Tetragonisca angustula* extraída com etanol 80% apresentou uma forte ação bacteriostática (MIC= 5,44 µg mL<sup>-1</sup>), porém nenhuma ação bactericida (CBM >349 µg mL<sup>-1</sup>) foi observada com esse extrato frente a *Listeria monocytogenes*. O EEP de *Plebeia droryana* extraído com etanol 80% apresentou ação bactericida menor em comparação com as demais própolis com CBM igual a 349, 174 e 43,6 µg mL<sup>-1</sup> frente as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* respectivamente.

### 5.3 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR HPLC/DAD

Para determinar o perfil de compostos fenólicos, foram injetados 16 padrões de compostos fenólicos e posteriormente feito suas interpretações, a identificação ocorreu através da semelhança com o tempo de retenção e a absorvância dos compostos encontrados no extratos com os padrões utilizados. Destes, 7 compostos foram identificados nesse estudo: catequina, epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, crisina e galangina. De maneira geral e independentemente da concentração do solvente, o EEP de *Melipona quadrifasciata* apresentou o maior número de compostos (5), seguido da *Tetragonisca angustula* (4) e *Plebeia droryana* (2) (Tabela 4, Figura 7-12).

Em ambos os EEP de *Melipona quadrifasciata* (extraídos com etanol 80 e 20%), foi possível identificar catequina, epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cinâmico. A extração com etanol 80% proporcionou maior concentração de catequina, ácido ferúlico e ácido cinâmico, indicando que a maior concentração de etanol favoreceu a extração desses compostos, chegando a ser duas vezes ao extraído com etanol 20%. Diferentemente dos demais compostos, nessa própolis, maiores teores de água favoreceram a extração da epicatequina e do ácido *p*-cumárico (Tabela 4, Figura 7-8).

No EEP de *Tetragonisca angustula* extraído com etanol 80% foi identificado a epicatequina, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico e crisina. Essa mesma própolis extraída com etanol 20% apresentou os compostos epicatequina, ácido cinâmico, crisina e galangina (Tabela 4, Figura 9 e 10). A própolis de *Plebeia droryana* apresentou apenas 2 compostos (ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico) em ambas as concentrações de etanol (Tabela 4, Figura 11 e 12).

O ácido *p*-cumárico e o ácido cinâmico foram os únicos compostos presentes na própolis das 3 espécies analisadas, enquanto a crisina e galangina estavam presentes apenas no EEP da *Tetragonisca angustula* e a catequina e o ácido ferúlico estando presentes apenas no EEP da *Melipona quadrifasciata*. Essas variações na composição de cada própolis estão diretamente ligadas ao perfil dos compostos fenólicos de cada resina vegetal na qual ela foi coletada pela abelha (KROL; KUROPATNICKI; SZLISZKA, 2013).

Tabela 4 - Perfil fenólico dos Extratos Etanólicos de Propolis por HPLC-DAD

Compostos	Catequina	Epicatequina	Ác. p-cumárico	Ác. Ferúlico	Ác. Cinâmico	Crisina	Galangina	
								$\mu\text{g g}^{-1}$
EEP**	TR*	4,37	6,11	9,33	9,69	16,06	22,89	23,96
Solvente								
(% etanol)								
<i>Melipona quadrifasciata</i> (Mandaçaia)	80%	29,28	11,71	80,93	372,82	67,57	<LD***	<LD
<i>Melipona quadrifasciata</i> (Mandaçaia)	20%	13,96	32,13	111,56	153,00	30,48	<LD	<LD
<i>Tetragonisca angustula</i> (Jataí)	80%	<LD	23,42	33,03	<LD	20,57	19,97	<LD
<i>Tetragonisca angustula</i> (Jataí)	20%	<LD	7,86	<LD	<LD	21,62	7,66	25,98
<i>Plebeia droryana</i> (Mirim)	80%	<LD	<LD	64,56	<LD	25,80	<LD	<LD
<i>Plebeia droryana</i> (Mirim)	20%	<LD	<LD	41,44	<LD	20,57	<LD	<LD

\*TR (tempo de retenção)

\*\*EEP (extrato etanólico de própolis).

\*\*\*LD (limite de detecção)

Fonte: Autoria própria, 2022.

Dentre os compostos fenólicos apresentados pela *Melipona quadrifasciata*, outros estudos relataram a presença de catequina, ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico (FERREIRA et al. 2022; PICCININI et al. 2019). Para a *Plebeia droryana*, foi identificada a presença do ácido cinâmico e o ácido p-cumárico, também relatados por Bonamigo et al., 2017. A galangina foi identificado apenas no EEP de *Tetragonisca angustula* produzido com 20% de etanol, também foi verificado por Ferreira et al., 2018.

Em outros estudos com EEP das três espécies de própolis analisadas, o ácido p-cumárico foi encontrado em maior concentração no EEP de *Melipona quadrifasciata* e este composto fenólico foi estudado isoladamente por Lou et al. (2012), apresentando atividade antibacteriana frente as bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e bactérias Gram-negativas (*Shigella dysenteriae*, *Escheirchia coli* e *Salmonella typhimurium*). A este composto se atribui muitas atividades farmacológicas e biológicas, entre elas a atuação como antioxidante (GODARZI et al., 2020).

Touzani et al. (2019) analisaram própolis do Marrocos e encontraram nove compostos fenólicos, sendo pinocembrina, crisina e quercetina os majoritários. Os autores verificaram na própolis marroquina o potencial antibacteriano e antioxidante, além de propriedades anticâncer e imunomoduladoras, atribuídas a presença de vários compostos ativos atuando de forma sinérgica. Em outro trabalho com 5 amostras de própolis do Marrocos e da Palestina, Touzani et al. (2021) relataram a presença de ácido cinâmico nas amostras de própolis da Palestina com atividades antioxidantes e antibacterianas, sem apresentar toxicidade. Neste trabalho o ácido cinâmico estava presente nas própolis das três espécies analisadas. Foi relatado atividade antimicrobiana do ácido cinâmico contra *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus flavus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* sorotipo Typhimurium, *Enterobacter cloacae* e *Yersinia ruckeri*, agindo neutralizando processos metabólicos vitais (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Apesar de ter sido identificado apenas no EEP da *Melipona quadrifasciata*, o ácido ferúlico apresentou concentração expressiva comparado a outros compostos, sendo este um dos compostos fenólicos mais estudados na literatura, com

reconhecida bioatividade em múltiplas funções, onde é relatado como um potente antioxidante (LI et al., 2021).

Os compostos crisina e galangina foram identificados por Peter (2015), em própolis da espécie *Tetragonisca angustula*, coletada no RS. Estes compostos também são encontrados para esta espécie em outras regiões do país. De fato, esses dois compostos foram encontrados na própolis dessa espécie no nosso estudo.

Figura 7 - Cromatograma do EEP da *Melipona quadrifasciata* com 80% etanol (<sup>1</sup>Catequina; <sup>2</sup>Epicatequina; <sup>3</sup>Ácido *p*-cumárico; <sup>4</sup>Ácido ferúlico; <sup>5</sup>Ácido cinâmico).

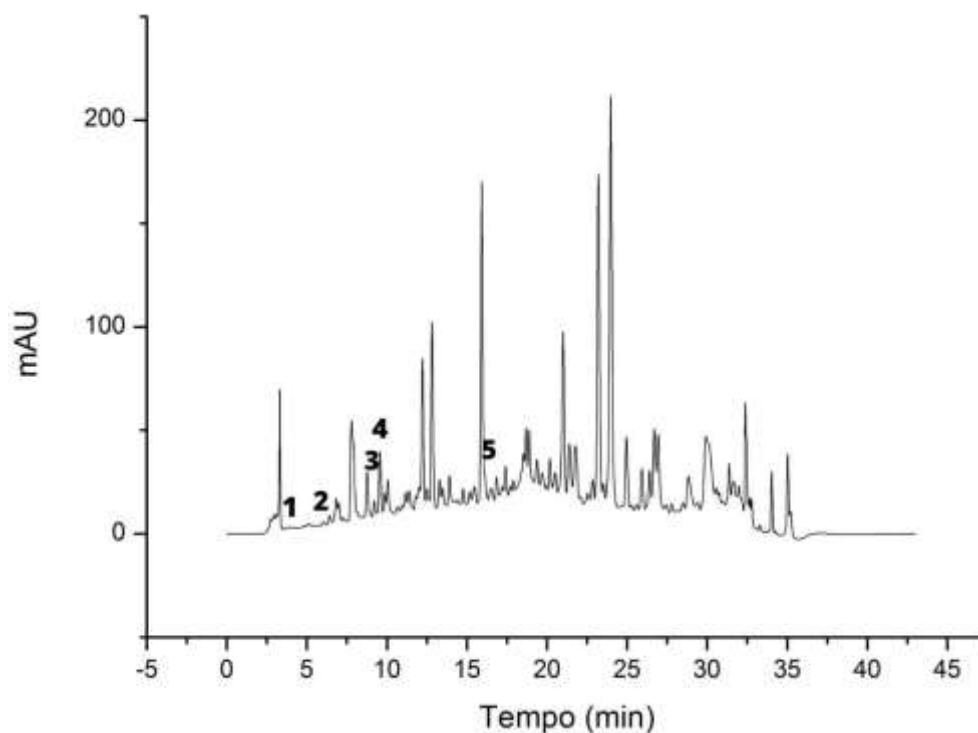


Figura 8 - Cromatograma do EEP da *Melipona quadrifasciata* com 20% etanol (<sup>1</sup>Catequina, <sup>2</sup>Epicatequina, <sup>3</sup>Ácido *p*-cumárico, <sup>4</sup>Ácido ferúlico, <sup>5</sup>Ácido cinâmico).

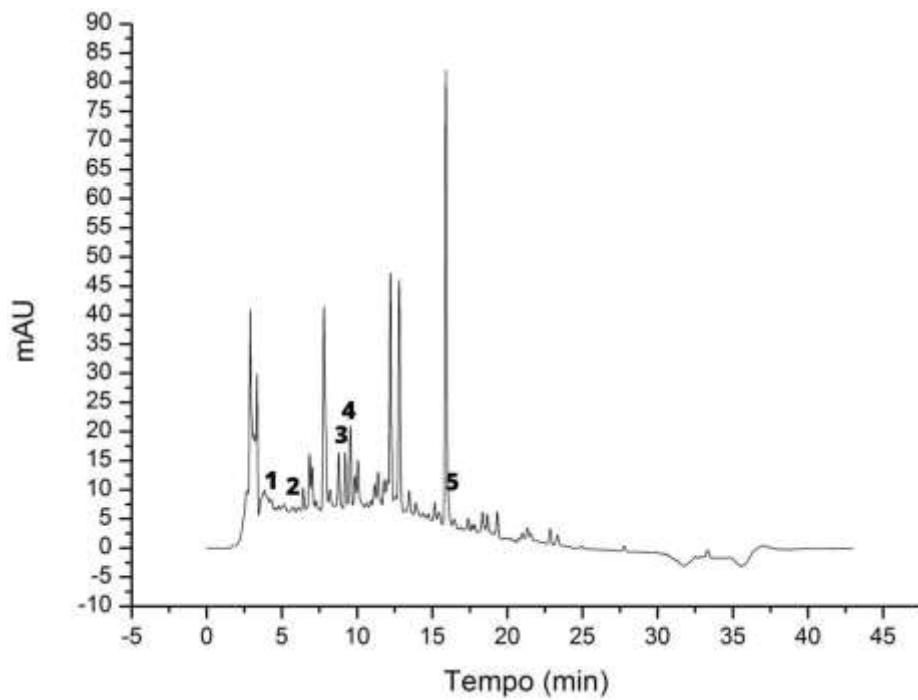


Figura 9 - Cromatograma do EEP da *Tetragonisca angustula* com 80% etanol (<sup>1</sup>Epicatequina, <sup>2</sup>Ácido *p*-cumárico, <sup>3</sup>Ácido cinâmico e <sup>4</sup>Crisina)

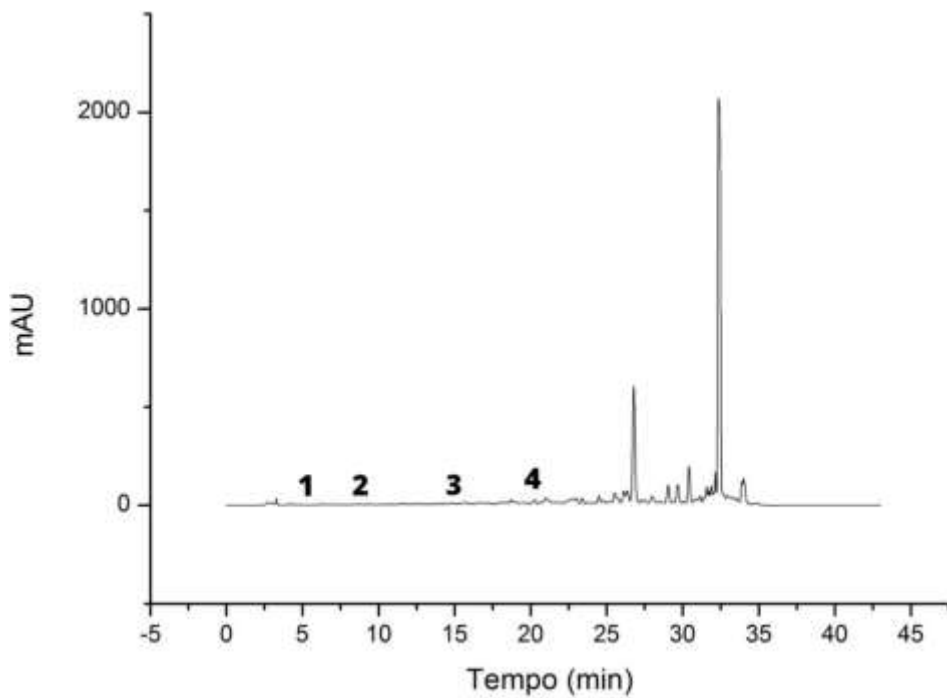




Figura 10 - Cromatograma do EEP da *Tetragonisca angustula* com 20% etanol (<sup>1</sup>Epicatequina, <sup>2</sup>Ácido cinâmico e <sup>3</sup>Crisina e <sup>4</sup>Galangina)

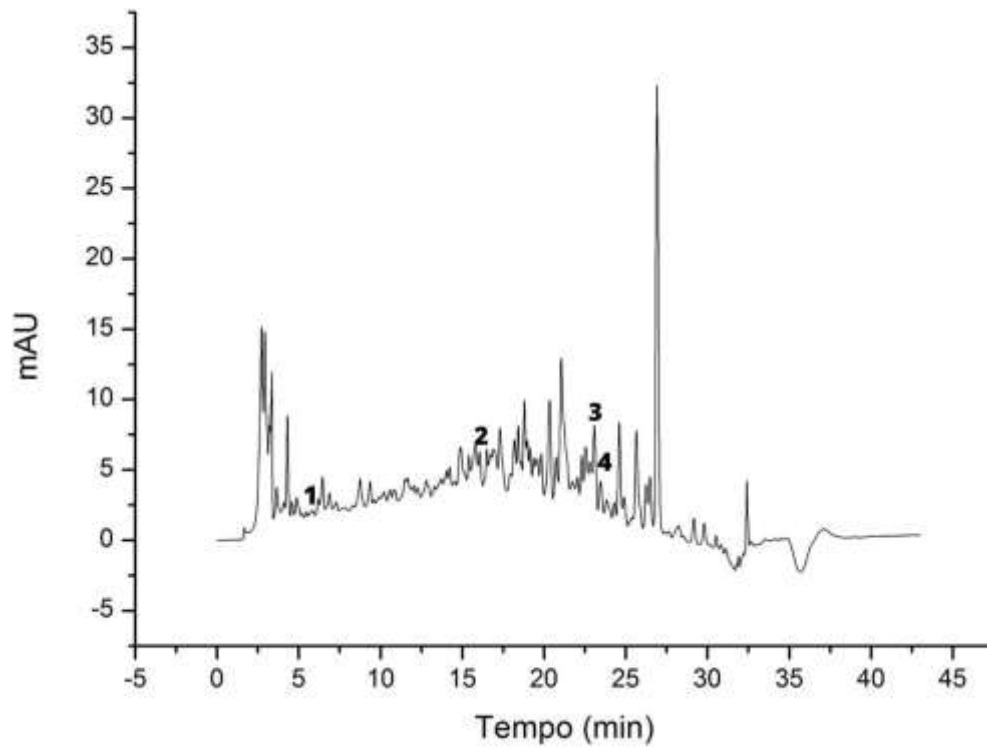


Figura 11 - Cromatograma do EEP da *Plebeia droryana* com 80% etanol (<sup>1</sup>Ácido *p*-cumárico e <sup>2</sup>Ácido cinâmico)

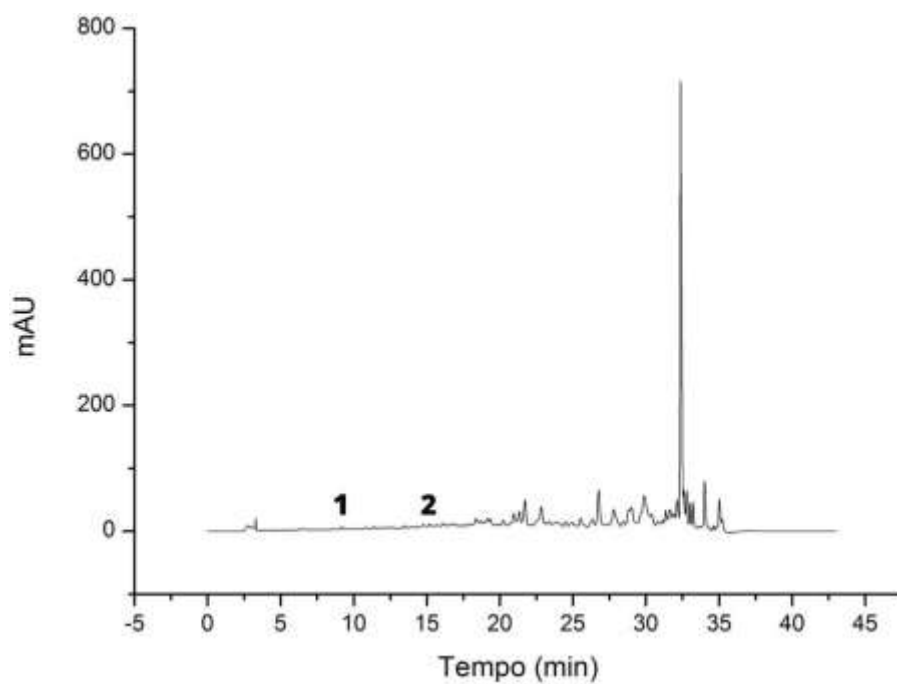
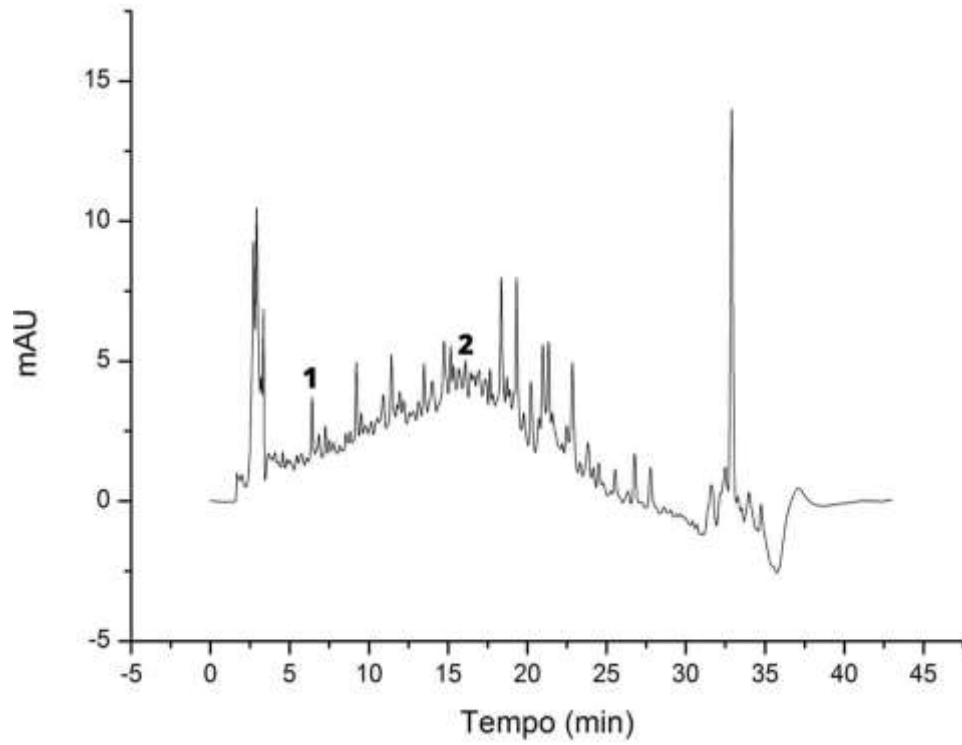


Figura 12 - Cromatograma do EEP da *Plebeia droryana* com 20% etanol (1Ácido p-cumárico e 2Ácido cinâmico)



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As própolis das ASF analisadas neste estudo apresentaram resultados que confirmam suas reconhecidas propriedades, como atividades antioxidantes e antibacterianas, que dependem da concentração do solvente empregado para extrair os compostos bioativos. Neste estudo, foi demonstrado a maior atividade quando a própolis foi extraída com etanol 80% em comparação ao etanol 20%. Entre as três espécies analisadas, *M. quadrifasciata* obteve os melhores resultados para concentração de compostos fenólicos por HPLC e maior potencial de atividade antioxidante. A avaliação antibacteriana obteve bons resultados entre as espécies, demonstrando ser uma alternativa para ser usado em combate as bactérias patogênicas, sendo importante na elaboração de novos produtos. Na identificação de compostos fenólicos por HPLC/DAD foi possível verificar a presença de 7 compostos diferentes, confirmando relatos de que a própolis possui estas substâncias conhecidas por sua relação com a atividade antioxidante e antibacteriana.

Nossas descobertas requerem estudos mais detalhados dos compostos fenólicos com um maior número de própolis coletadas na região de Pato Branco, através dos quais poderíamos julgar quais compostos podem servir como marcadores biológicos de nossas própolis. Poderíamos verificar ainda se o ácido cinâmico pode ser usado como um indicador da qualidade da própolis de abelhas sem ferrão coletadas em Pato Branco, uma vez que estava presente em todas as amostras. Além disso, poderíamos verificar se os compostos como crisina e galangina podem ser considerados marcadores biológicos da própolis oriunda de *T. angustula* (Jataí) em nossa região. Outra possibilidade de estudos seria avaliar se o ácido ferúlico pode ser um marcador biológico da *Melipona quadrifasciata* em nossa região e se esse composto pode ser o responsável pela superioridade na atividade antioxidante dessa própolis.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, M. B.; ABDULLAH, W. Z.; SULAIMAN, S. A.; ANG, B. S. Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-11, 2014.
- AJIBOLA, Abdulwahid; CHAMUNORWA, Joseph P.; ERLWANGER, Kennedy H. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. **Nutrition & metabolism**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2012.
- AHANGARI, Zohreh; NASERI, Mandana; VATANDOOST, Farzaneh. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. **Iranian endodontic journal**, v. 13, n. 3, p. 285, 2018.
- AL-ANI, Issam et al. Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 1, p. 2, 2018.
- ALVEZ, C.Q. DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2010.
- AMINIMOGHADAMFAROUJ, Noushin; NEMATOLLAHI, Alireza. Propolis diterpenes as a remarkable bio-source for drug discovery development: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1290, 2017.
- ANTOLOVICH, Michael et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.
- ANDRADE, Julianna Karla Santana et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.
- BADBAN, Leila et al. Protective effects of water extract of propolis on dopaminergic neurons, brain derived neurotrophic factor and stress oxidative factors in the rat model of Parkinson's disease. **International journal of pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 300-308, 2015.

BATISTA, Lara Livia Valença et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, p. 515-520, 2012.

BENTO, Bruna Silva. **Fotoenvelhecimento cutâneo: processo, produtos**. 2015. Tese de Doutorado.

BERRETTA, Andresa A. et al. Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. In: **Superfood and functional food-an overview of their processing and utilization**. IntechOpen, 2017. p. 55-96.

BITTENCOURT, Mara LF et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449-457, 2015.

BONAMIGO, Thaliny et al. Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

BONAMIGO, Thaliny et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0183983, 2017.

CAMPOS, Jaqueline Ferreira et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

CAMPOS, Marco Túlio Gomes; LEME, Fabíola de Oliveira Paes. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Pubvet**, v. 12, p. 139, 2017.

CARDOZO, Danielle V. et al. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2456-2474, 2015.

COSTA, Aline Silva et al. Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 13, 2013.

CUTRIM, Elaine Sá Menezes. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale*, Roscoe (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* L.(alecrim) frente às bactérias patogênicas. 2017.

CASTALDO, Stefano; CAPASSO, Francesco. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

DE LA ROSA, L. A.; MORENOESCAMILLA, J. O.; RODRIGOGARCÍA, J.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Phenolic Compounds. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, 1 ed. Elsevier, 2019. 510 p

DALEPRANE, Julio Beltrame; ABDALLA, Dulcinéia Saes. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, 2013.

DANTAS SILVA, Rejane Pina et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos one**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

DA SILVA, Sheila Gomes; BIESKI, Isanete Geraldini Costa. A importância medicinal dos flavonóides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. **Revista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES**, v. 1, n. 1, 2018.

DRESCHER, Nora et al. Diversity matters: how bees benefit from different resin sources. **Oecologia**, v. 176, n. 4, p. 943-953, 2014.

FARNESI, Ana Paula. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FERREIRA, Bruno Luís et al. **Caracterização química da geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão no estado de Santa Catarina**. 2018.

FERREIRA, Bruno Luís et al. Southern-Brazilian geopropolis: a potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. **Food Research International**, v. 126, p. 108683, 2019.

FERREIRA, J. M. et al. Chemical composition and biological activity of Brazilian propolis: green and red. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 6-15, 2018.

GODARZI, Shahin Mozaffari et al. Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with renal ischemic reperfusion. **Nefrologia**, v. 40, n. 3, p. 311-319, 2020.

GRAB, Heather et al. Agriculturally dominated landscapes reduce bee phylogenetic diversity and pollination services. **Science**, v. 363, n. 6424, p. 282-284, 2019.

HUANG, S.; ZHANG, C.-P.; WANG, K.; LI, G.; HU, F.-L. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.

HRNCIR, Michael; JARAU, Stefan; BARTH, Friedrich G. Stingless bees (Meliponini): **Senses and behavior**. 2016.

IKEDA, Natália Y. et al. Essential Oils Extracted from Organic Propolis Residues: An Exploratory Analysis of Their Antibacterial and Antioxidant Properties and Volatile Profile. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4694, 2021.

LIBBEY, L. M.; WALRADT, J. P. 3, 5-di-Tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) as an artifact from diethyl ether. **Lipids**, v. 3, n. 6, p. 561-561, 1968.

LOU, Zaixiang et al. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food control**, v. 25, n. 2, p. 550-554, 2012.

LUSTOSA, Sarah R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

KLAJN, Vera Maria et al. Compostos antioxidantes em aveia. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 18, n. 4, p. 292-303, 2012.

KOCOT, Joanna et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

KOSER, Jaqueline Reginato; BARBIÉRI, Celso; FRANCOY, Tiago Maurício. Legislation on meliponiculture in Brazil: social and environmental demand. **Sustainability in Debate**, v. 11, n. 1, p. 164-194, 2020.

KUMAR, Nilesh et al. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 12, p. 361-364, 2008.

KUROPATNICKI, Andrzej K.; SZLISZKA, Ewelina; KROL, Wojciech. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.

MARTINOTTI, Simona; RANZATO, Elia. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns & trauma**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

MARTINELLO, Marianna; MUTINELLI, Franco. Antioxidant activity in bee products: A review. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 71, 2021.

MENEZES, Hermes. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 405-411, 2022.

MELLO, Beatriz Camargo Barros de Silveira; PETRUS, José Carlos Cunha; HUBINGER, Miriam Dupas. Performance of nanofiltration concentration process in propolis extracts. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 166-172, 2010.

MOCANU, Alexandra et al. Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

PETER, Cristina Mendes. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) frente a micro-organismos infecciosos de interesse em Medicina Veterinária e Humana**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

PEDRO, Silvia RM. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PEREIRA, Renata Junqueira; DAS GRAÇAS CARDOSO, Maria. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.



PEREIRA, Daiane et al. Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 17-23, 2017.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis; 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.

PICCININI, Alexandre et al. Composição química e atividade biológica da própolis de *Melipona quadrifasciata*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e193111234175-e193111234175, 2022.

POPOVA, Milena et al. A preliminary study of chemical profiles of honey, cerumen, and propolis of the African stingless bee *Meliponula ferruginea*. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 997, 2021.

PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019.

PULIDO, Raquel; BRAVO, Laura; SAURA-CALIXTO, Fulgencio. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, p. 657–664, 2016

RASMUSSEN, Claus; CAMERON, Sydney A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, n. 1, p. 206-232, 2010.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REIS, Amália Soares et al. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at– 15 C. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 306-313, 2017.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

RODRIGUES DA SILVA, Laís et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SANTOS, H. F. dos et al. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 5, p. 953, 2017.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of Scaptotrigona stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 37-42, 2009.

SFORCIN, José M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SICHERI, Ana Paula Marques Pino. **Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, Verónica et al. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. *In vitro* and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6430-6437, 2011.

SILVA, Leomara Andrade da et al. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, 2018.

SILVA-CARVALHO, Ricardo; BALTAZAR, Fátima; ALMEIDA-AGUIAR, Cristina. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

SILVA, Wagner Pereira; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146-152, 2012.

SOUZA, Angela Vacaro de; VIEIRA, Marcos Ribeiro da Silva; PUTTI, Fernando Ferrari. Correlações entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SOUSA, J. P. L. M. et al. Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019.

SURIYATEM, Rungsiri et al. Biodegradable rice starch/carboxymethyl chitosan films with added propolis extract for potential use as active food packaging. **Polymers**, v. 10, n. 9, p. 954, 2018.

SUN, Chunli et al. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

TENÓRIO, Eleuza Gomes. Desenvolvimento e produção de mel de colônias de abelhas tíuba, *Melipona fasciculata* Smith, 1854 (Apidae: Meliponina), em diferentes modelos de colmeias e localidades do Maranhão. 2011.

TIVERON, Ana Paula et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0165588, 2016.

TORETI, Viviane Cristina et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, 2013.

TORRES, A. R. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, 2018.

TOUZANI, Soumaya et al. *In vitro* evaluation of the potential use of propolis as a multitarget therapeutic product: physicochemical properties, chemical composition, and immunomodulatory, antibacterial, and anticancer properties. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

Touzani, S.; Imtara, H.; Katekhaye, S.; Mechchate, H.; Ouassou, H.; Alqahtani, A.S.; Noman, O.M.; Nasr, F.A.; Fearnley, H.; Fearnley, J.; et al. Determination of Phenolic Compounds in Various Propolis Samples Collected from an African and an Asian Region and Their Impact on Antioxidant and Antibacterial Activities. **Molecules** 2021, 26, 4589.

TURCO, João F. et al. Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra? **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105031, 2020.

ZABAIYOU, Nada et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and physics of lipids**, v. 207, p. 214-222, 2017.

ZHENG, Yan-Zhen et al. Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017

WAGH, Vijay D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, 2013.

WOJTYCZKA, Robert D. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9623-9640, 2013.