

Leonardo Regnier de Lima Pereira

Caracterização e atividades biológicas de própolis de
abelhas nativas

Characterization and biological activities of propolis from
native bees

São Paulo

2021

Leonardo Regnier de Lima Pereira

EXEMPLAR CORRIGIDO

Versão original disponível na Biblioteca do Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo

Caracterização e atividades biológicas de própolis de abelhas nativas

Characterization and biological activities of propolis from native bees

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Biologia, na Área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria L. F. Salatino

São Paulo

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo autor através do formulário eletrônico disponível em: <https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>

Regnier, Leonardo de Lima Pereira
Caracterização e atividades biológicas de própolis de abelhas nativas / Leonardo de Lima Pereira Regnier; Orientadora: Maria Luiza Faria Salatino – São Paulo, 2021. 174 p. + anexo

Dissertação (Mestrado) — Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Meliponini. 2. *Scaptotrigona*. 3. *Melipona*. 4. Geoprópolis. 5. Abelhas-sem-ferrão. I. Salatino, Maria Luiza Faria, orient.

Bibliotecária responsável pela catalogação:

Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão Julgadora:

Prof Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Profa. Dra. Vera Lucia Imperatriz Fonseca



Prof. Dra. Maria Luiza Faria Salatino

Orientadora

Agradecimentos

A colaboração dos meliponicultores foi essencial para a obtenção de amostras que possibilitaram a realização deste trabalho. Portanto, gostaria de agradecer ao Sr. Wilson Melo, Glaucio Campanatti, Marcelo, Ricardo Bordin e toda a equipe do Meliponário Nativas do Norte pelo empenho e receptibilidade na realização deste estudo.

Gostaria também de agradecer à Aline Bertinatto Cruz, e Mourisa Maria Ferreira de Souza por sua paciência e gentileza em tirar minhas dúvidas quanto aos procedimentos. Além da professora Regina Baldini, e Caio Gomes Tavares Rosa pelo grande apoio técnico para a realização dos ensaios microbiológicos, e Lydia Fumiko Yamaguchi e Massuo Jorge Kato pelo acolhimento do projeto e receptividade para execução das análises de cromatografia líquida. Assim como Jade e Cláudia Terra pela assistência nas coletas mineralógicas.

Índice

Agradecimentos.....	4
Índice.....	5
1 Introdução.....	8
2 Materiais e métodos.....	13
2.1 Amostras.....	13
2.2 Pulverização das amostras.....	15
2.3 Massa seca.....	15
2.4 Teor de cinzas.....	15
2.5 Descrição mineralógica das cinzas.....	15
2.6 Teor de ceras.....	16
2.7 Solubilidade em etanol.....	16
2.8 Preparação dos extratos brutos etanólicos.....	16
2.9 Doseamento de Fenóis totais.....	17
2.10 Doseamento de Flavonoides.....	17
2.11 Doseamento de Flavanonas e dihidroflavonóis.....	18
2.12 Extração fracionada.....	19
2.13 Derivatização.....	19
2.14 Composição dos extratos fracionados apolares por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).....	19
2.15 Obtenção da fração de hidrocarbonetos das ceras.....	20
2.16 Composição da fração de hidrocarbonetos por cromatografia a gás acoplada a detector por ionização de chama (CG/FID).....	20
2.17 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM).....	21
2.18 Extração de compostos voláteis.....	21

2.19	Composição de óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).....	21
2.20	Análise de Atividade Antioxidante.....	22
2.20.1	Atividade sequestradora de radical DPPH*.....	22
2.20.2	Atividade sequestradora do radical ABTS ⁺	22
2.20.3	Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC).....	23
2.21	Atividade biológica.....	23
2.21.1	Atividade antibacteriana.....	23
2.21.2	Ensaio de dispersão de biofilme.....	24
2.21.3	Atividade antifúngica.....	25
2.22	Análise dos dados.....	26
3	Resultados e discussão.....	28
3.1	Massa seca.....	28
3.2	Teor de cinzas.....	30
3.3	Composição mineralógica das cinzas.....	32
3.4	Teor de ceras.....	40
3.5	Análise de macrocomponentes.....	44
3.6	Solubilidade em etanol.....	53
3.7	Doseamento de Fenóis totais.....	56
3.8	Doseamento de Flavonoides.....	60
3.9	Doseamento de Flavanonas e dihidroflavonóis.....	63
3.10	Análise geral dos compostos fenólicos.....	65
3.11	Composição das ceras por cromatografia a gás, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).....	67
3.12	Composição da fração de hidrocarbonetos por cromatografia a gás com detector por ionização de chama (CG/FID).....	71
3.13	Cromatografia a gás dos compostos voláteis.....	74

3.14	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) dos extratos fracionados de hexano e diclorometano.....	79
3.14.1	Extrato fracionado de Diclorometano.....	79
3.14.2	Extrato fracionado de Hexano.....	82
3.15	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM).....	85
3.16	Análise de atividade Antioxidante.....	95
3.16.1	Atividade sequestradora de radical DPPH*	95
3.16.2	Atividade sequestradora do radical ABTS+	100
3.16.3	Capacidade de Absorção de Radicais Oxigenados (ORAC).....	106
3.17	Atividade antibacteriana.....	109
3.17.1	Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14.....	110
3.17.2	Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	122
3.17.3	Crescimento de <i>Escherichia coli</i>	128
3.18	Ensaio de dispersão de biofilme.....	131
3.19	Atividade leveduricida em culturas de <i>Saccharomyces bayanus</i>	133
3.19.1	Análise do crescimento.....	133
3.19.2	Ensaio de incorporação de vermelho neutro.....	139
3.20	Caracterização microbiológica.....	142
4	Conclusão.....	148
	Resumo.....	150
	Abstract.....	151
5	Apêndices.....	152
5.1	Apêndice A.....	152
5.2	Apêndice B.....	152
5.3	Apêndice C.....	157
6	Referências.....	157

1 Introdução

A própolis é um dos mais antigos produtos naturais com aplicação medicinal na humanidade (BONAMIGO et al., 2017a). Os primeiros registros remetendo à coleta de produtos apícolas são encontrados em pinturas rupestres (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013). A própolis, mais especificamente, já era utilizada pelos antigos egípcios, persas e romanos (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SALATINO et al., 2005; KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013; FERREIRA et al., 2017a; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017; ANJUM et al., 2018). Desde então esse produto vem sendo empregado pela humanidade de diversas maneiras. Atualmente, os principais usos atribuídos à própolis na sociedade moderna estão associados com a indústria farmacêutica, alimentícia e de bebidas, além de cosméticos e produtos de higiene como shampoos, cremes dentais e sabonetes (SALATINO et al., 2005; FUNARI; FERRO, 2006; KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013), além de sua recente utilização como produto antisséptico e na conservação de carnes (ANJUM et al., 2018).

A palavra “própolis” vem do grego antigo, sendo que seus primeiros registros escritos estão associados ao verbo προ-μαλάσσω (Promalasso), por sua propriedade de amolecer-se facilmente (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013). Atualmente, própolis é o nome genérico de uma substância resinosa produzida pelas abelhas melíferas, especialmente as da espécie *Apis mellifera* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). É uma substância complexa com aparência altamente variável, dependendo de vários fatores (SALATINO et al., 2005; FUNARI; FERRO, 2006). Entretanto, na Europa a própolis é fabricada principalmente com resinas provenientes de plantas do gênero *Populus*, popularmente denominados como álamo ou choupo (SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2012).

A própolis verde, produzida por *Apis mellifera*, é a mais exportada das própolis brasileiras, e tem sua resina extraída dos ápices caulinares de uma espécie de Asteraceae, *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como “Alecrim-do-campo” ou “vassourinha” (SALATINO et al., 2005). Mais recentemente, alguns estudos têm focado na identificação das principais fontes vegetais utilizadas pelas abe-

lhas sem ferrão para a produção da própolis no Brasil. Até o momento, *Schinus terebinthifolius* também conhecida como “Aroeira mansa”, se mostra como a fonte principal para a produção de própolis pela espécie *Tetragonisca angustula*, independente da região de origem (SAWAYA et al., 2009). Porém, ainda são necessários mais estudos sobre diversos aspectos da própolis de espécies de abelhas nativas brasileiras (FUNARI; FERRO, 2006; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017).

As abelhas campeiras produzem a própolis a partir da coleta de exsudados e secreções de ferimentos de plantas, com adição da cera produzida em suas glândulas abdominais (BANKOVA, 2005; SALATINO et al., 2011). As principais aplicações desse produto pelas abelhas relaciona-se ao fechamento de rachaduras e frestas, como reforço das paredes da colmeia, no embalsamamento de predadores, na prevenção da contaminação, disseminação de doenças e parasitas para a colmeia (BANKOVA, 2005; SALATINO et al., 2011; KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013). Alguns autores ainda pontuam que a própolis apresenta também um papel importante na manutenção da temperatura interna da colmeia (SILVA, 2008; PASUPULETI et al., 2017), e a proteção contra o vento e umidade (ESCRICHE; JUAN-BORRÁS, 2018).

Além da cera, resina proveniente de exsudatos das plantas e de compostos voláteis, outros componentes como pólen, açúcares e aminoácidos também podem estar presentes (DE CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002; SALATINO et al., 2005; FERREIRA et al., 2017a). A própolis apresenta composição química complexa, incluindo ácidos graxos, ésteres, fenilpropanoides e flavonoides, tais como, flavonas, flavanonas, flavonóis, dihidroflavonóis e chalconas. Outros compostos como mono, sesqui, di e triterpenos, esteroides, álcoois e aldeídos aromáticos, derivados de naftaleno e estilbenos também são documentados (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Alguns estudos ainda apontam a presença, em própolis, de pequenas quantidades de vitaminas A, B1, B2, B5, B6, C, e E assim como ácido nicotínico (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013; PASUPULETI et al., 2017; ANJUM et al., 2018; BACHEVSKI et al., 2020). Até o momento, no caso da própolis de espécies nativas brasileiras, somente algumas espécies do gênero *Melipona* presentes no nordeste do Brasil foram mais exploradas. Compostos como carboidratos, triterpenos, ácido anacárdico, alquilresorcinóis e polialcoóis, assim como a ausência de chalconas, caracterizam a própolis nordestina (RIGHI et al., 2011). Entretanto, muito pouco tem sido realizado com ou-

tras espécies de abelhas sem ferrão (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013).

A tribo Meliponini, pertencente à subfamília Apinae, corresponde ao conjunto de abelhas tropicais (MICHENER, 2013). Essa subfamília pode ser encontrada em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo, e são os principais visitantes e polinizadores das angiospermas nativas dessa porção do planeta (SAWAYA et al., 2009), apresentando um importante aspecto na conservação dessas plantas devido à polinização fornecida por esse grupo de abelhas (SILVA; ARAÚJO; SCHER, 2012; BONAMIGO et al., 2017a). A tribo Meliponini, apresenta representantes com um ferrão vestigial (FERREIRA et al., 2017b). Por esse motivo, esse grupo é conhecido como “abelhas sem ferrão” (BARBIERI JUNIOR, 2018), correspondendo ao maior e mais diverso grupo de insetos sociais do planeta (DIVYA et al., 2020). Recentemente tem-se destacado como alternativa para polinização de culturas em casas de vegetação, principalmente pela eficiência, com aumento substancial de produção e pouca manutenção, além de baixo risco oferecido a seres humanos (BORGES; BLOCHTEIN, 2005; DA SILVA et al., 2011).

Geoprópolis é o termo utilizado para os produtos elaborados pelas abelhas sem ferrão (FERREIRA et al., 2017b), porque várias delas fazem seus ninhos no solo, e incluem terra na constituição de suas própolis. É uma substância similar à própolis que é elaborada pelas abelhas melíferas, visto que ambas são compostas de resinas provenientes de plantas e cera da glândula cerífera abdominal (OLIVEIRA et al., 2013), além de apresentarem a mesma finalidade (ZHAO et al., 2017). Entretanto, como já mencionado, algumas abelhas sem ferrão acrescentam terra na constituição das suas própolis, diferindo assim das própolis das abelhas melíferas (FERREIRA et al., 2017b). A quantidade ou proporções de solo adicionado pelas várias espécies na composição da própolis ainda é pouco conhecida, principalmente porque os estudos envolvendo a caracterização da própolis e geoprópolis dessa tribo são escassos (FREITAS; VIT; BARTH, 2014).

Estima-se que cada colmeia das abelhas melíferas sejam capazes de produzir 5 kg de própolis por ano (ROSA, 2013). Já para as espécies de abelhas sem ferrão, a baixa exploração desse produto, ainda traz inconsistências sobre seu potencial de produção. Enquanto alguns autores pontuam que a produção de própolis pelas espécies de Meliponini parece ser menor (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013),

outros apontam um potencial de produção ainda maior do que o das abelhas melíferas (MOHD-YAZID et al., 2018). Em parte, esse problema se deve ao desconhecimento da composição e formas de exploração desse produto, além do baixo reconhecimento de seus usos potenciais no mercado (MAGALHÃES; VENTURIERI, 2010).

Entre os países tropicais, o Brasil apresenta a maior diversidade química de própolis (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013), muito provavelmente devido à sua grande multiplicidade de composição vegetal e à complexa variabilidade genética das abelhas (SALATINO et al., 2005). Portanto, um dos grandes fatores que afetam a composição da própolis é a localização geográfica das colmeias, devido à influência de formações vegetais diferentes (KUJUMGIEV et al., 1999; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017). Os poucos estudos realizados até então, indicam que a própolis das abelhas sem ferrão apresentam, assim como a própolis das abelhas melíferas, grandes variações em sua composição, principalmente associadas com a espécie de abelha, a colmeia fornecedora da amostra, a época do ano, as condições ambientais e a fonte vegetal utilizada em sua produção (SAWAYA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013; PASUPULETI et al., 2017; MOHD-YAZID et al., 2018). É mencionado ainda que fatores como a variabilidade genética da rainha exerce influência na composição da própolis (PEIXOTO et al., 2021). Desse modo, estudos visando a coleta de própolis de diferentes regiões e de diferentes espécies de abelhas são altamente relevantes visto que esses são fatores que afetam a composição química e a atividade biológica da própolis (ISIDOROV et al., 2016; BONAMIGO et al., 2017a).

Embora o efeito sobre a composição da geoprópolis ser pouco conhecido, variações sazonais, associadas ao seu período de coleta, parecem afetar mais especificamente os aspectos quantitativos de seus constituintes (OLIVEIRA et al., 2013; BUENO-SILVA et al., 2017; FERREIRA et al., 2017a; DO NASCIMENTO et al., 2019). Estudos mais recentes, também mostram que as diferentes espécies de abelhas sem ferrão exploram diferentes plantas como fonte de produção de sua própolis. Sob o aspecto de exploração dos vegetais para coleta de pólen, há variações pela época do ano entre amostras de diferentes espécies de *Melipona* provenientes de uma mesma região (BARTH; FREITAS; VANDERBORGHT, 2020).

Em face do progresso da apicultura ocorrido até os dias atuais, o Brasil figura no mercado internacional como grande exportador de mel e própolis (RIGHI, 2008) apresentando entre 10 a 15% de toda a produção mundial, superado somente pela China e a Rússia (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020). O estudo da própolis brasileira tem recebido maior atenção devido à sua excelente aceitação no mercado internacional. Cerca de 75% da produção de própolis brasileira é exportada, em especial para o mercado japonês (DE CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002; SALATINO et al., 2005; CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020), configurando-se como o segundo maior exportador de própolis do mundo (ALENCAR, 2017). Contudo, o excelente potencial do país ainda é pouco explorado (DE CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002).

O interesse mundial por esse produto natural tem encorajado pesquisas sobre a composição química da própolis (SALATINO et al., 2011). Mais recentemente o interesse no potencial farmacológico de algumas substâncias surgiu, devido à realização de testes de atividade biológica (SALATINO et al., 2011). Os resultados de alguns desses estudos têm revelado aspectos positivos na utilização farmacológica da própolis de abelhas melíferas com quase nenhum efeito colateral (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013; POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019).

Geralmente, os constituintes de origem vegetal, coletados pelas abelhas melíferas são os responsáveis pela atividade biológica (SALATINO et al., 2011). No caso da própolis de abelhas sem ferrão, até o momento, avaliações da atividade antioxidante e atividades biológicas têm se mostrado promissoras contra fungos e bactérias (SALATINO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; BUENO-SILVA et al., 2017); também foi verificada atividade anti-inflamatória, além de efeitos sobre células cancerosas (OLIVEIRA et al., 2013; BONAMIGO et al., 2017a), e antiviral (COELHO et al., 2014, 2015). Novas pesquisas são necessárias para melhor compreensão da composição e possíveis aplicações da própolis (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013; BUENO-SILVA et al., 2017), em especial de própolis provenientes de espécies não pertencentes ao gênero *Apis* (COELHO et al., 2015).

Entretanto, para as espécies de abelhas sem ferrão, a compreensão da composição e de quais fontes vegetais elas se utilizam para a elaboração da própolis têm sido pouco exploradas (SAWAYA et al., 2009), tornando necessários estudos voltados para análises da composição química por meios cromatográficos e testes de

atividade biológica, que são pouco investigados. Ainda sim, com o conteúdo produzido até agora, alguns esforços têm se voltado para seu aprofundamento e revisão (LAVINAS et al., 2018; POPOVA et al., 2021). Devido aos vários fatores que podem afetar a composição de produtos das abelhas, é quase impossível prever a atividade biológica de um material sem a realização de ensaios adequados, tornando-os essenciais para essa verificação (MOLAN, 1992).

Desse modo, este trabalho visou determinar, utilizando técnicas cromatográficas, a composição das própolis de espécies de abelhas sem ferrão, assim como avaliar as atividades antioxidante e biológica.

2 Materiais e métodos

2.1 Amostras

O material para esse estudo foi gentilmente cedido por meliponicultores de três, das cinco grandes regiões brasileiras (Fig. 1). Compreendendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Maranhão e Pará, com formações vegetais e espaços geográficos distintos.

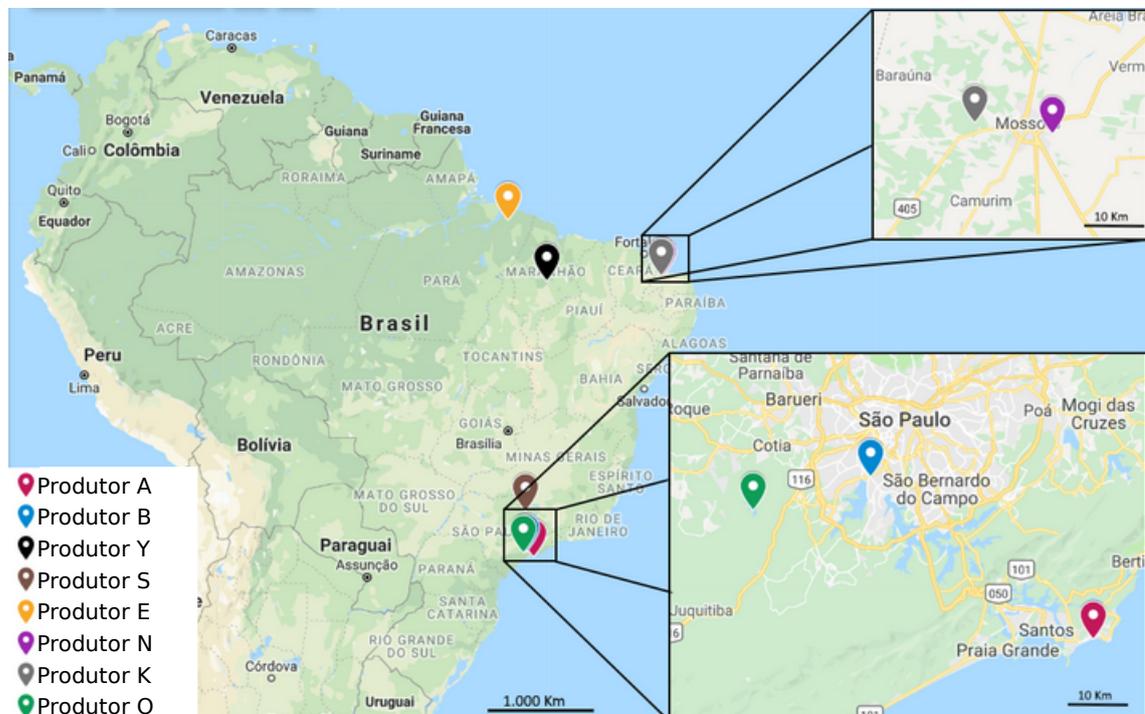


Figura 1: Mapa com os pontos de coleta das amostras utilizadas no trabalho.

Foram analisadas dezesseis amostras de própolis de nove espécies de abelhas nativas, provenientes de 8 produtores (Tabela 1). As amostras foram coletadas

Tabela 1: Espécies de abelhas sem ferrão, das quais foram obtidas as própolis, seus produtores e regiões de coleta.

Produtor	Espécie	Região de procedência	Legenda
A	<i>Melipona marginata</i> Lepeletier, 1836 (AM)	Guarujá - SP	
	<i>Scaptotrigona tubiba</i> Smith, 1863 (AT)		
	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i> Moure, 1950 (AX)		
	<i>Scaptotrigopna bipunctata</i> Lepeletier, 1836 (AB)		
B	<i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836 (BQ4 e BQ5)	São Paulo — SP	
Y	<i>Scaptotrigopna postica</i> Latreille, 1804 (YP)	Barra do corda — MA	
S	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i> Moure, 1950 (SX)	Jacuí — MG	
	<i>Scaptotrigopna bipunctata</i> Lepeletier, 1836 (SB)		
E	<i>Melipona flavolineata</i> Friese, 1900 (EF)	Castanhal — PA	
O	<i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836 (OQ2 e OQ3)	Cotia — SP	
	<i>Melipona mondury</i> Smith, 1863 (OR)		
N	<i>Melipona subnitida</i> Ducke, 1910 (NS)	Mossoró — RN (urbana)	
K	<i>Melipona subnitida</i> (KS)	Mossoró — RN (Região rural)	

entre fevereiro e junho de 2019. Cada um dos produtores recebeu uma identificação com a primeira letra correspondente ao meliponário de origem, e a segunda letra preferencialmente remetendo ao epíteto específico. Para a coleta dos produtores O e B ainda foi possível a obtenção de amostras da mesma espécie vindas de diferentes partes da mesma propriedade, visando compreender as variações que podem ocorrer entre distâncias curtas. As amostras provenientes de conjuntos de colmeias diferentes receberam uma indicação numérica depois da nomenclatura.

2.2 Pulverização das amostras

Utilizando-se de nitrogênio líquido, as própolis brutas foram pulverizadas em almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. O material pulverizado foi submetido a sucessivos processamentos como descritos a seguir.

2.3 Massa seca

Foram separadas 3 g de cada uma das amostras pulverizadas. Esse material foi transferido para cadinhos de massa conhecida. Em sequência, os cadinhos foram deixados em estufa a 110 °C até que a massa constante fosse atingida.

2.4 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado com 3 g do material seco e processado como descrito no item 2.3, sendo em sequência, submetida, posteriormente, à prévia carbonização em cadinho de massa conhecida, em bico de Bunsen até cessar o desprendimento de fumaça. O material então foi colocado em forno mufla durante 5 horas a 700 °C, visando sua calcinação. Após o resfriamento em dessecador, a massa foi aferida.

2.5 Descrição mineralógica das cinzas

A partir dos materiais resultantes do procedimento do teor de cinzas (item 2.4), a coloração do conjunto mineral foi determinada com o material ainda seco, com auxílio da escala de Munsell® (MUNSELL, 1975). A estimativa do tamanho dos

cristais constituintes das amostras foi realizada pela análise de imagem do material em estereomicroscópio, com auxílio do programa Paint.NET (BREWSTER, 2020) e Inkscape (INKSCAPE et al., 2021) com escala apropriada.

2.6 Teor de ceras

Foram adicionados 250 mL de diclorometano a 3 g de cada material previamente pulverizado como descrito no item 2.2. A mistura foi mantida no aparato de Soxhlet durante 6 horas. O extrato foi seco sob pressão reduzida. O resíduo seco retido no balão foi lavado com 100 mL de etanol quente, e transferido para um frasco de massa conhecida. Este foi então resfriado a 0 °C, e o conteúdo filtrado através de papel de filtro, também de massa conhecida, sob gelo, obtendo-se assim apenas a porção cerosa. Após secagem em capela, o papel de filtro, com resíduo de cera, e o frasco foram transferidos para o dessecador sob pressão reduzida, até atingirem massa constante.

2.7 Solubilidade em etanol

O procedimento adotado foi baseado na metodologia descrita por Matsuda (MATSUDA, 2006) com algumas modificações. Cerca de 5 g de própolis bruta foi submetida à extração durante 5 horas em extrator de Soxhlet com 125 mL de etanol. O material final foi então filtrado, e posteriormente mantido em congelador com temperatura -20 °C durante 16 horas. Em seguida o conteúdo foi novamente filtrado e parcialmente seco sob pressão reduzida. O resíduo foi transferido para frascos com massa conhecida e deixados em banho-maria a 60 °C até massa constante.

2.8 Preparação dos extratos brutos etanólicos

Partindo-se de 5 g do material pulverizado, como descrito no item 2.2 foi realizada a extração por 5 horas no extrator de Soxhlet com 150 mL de etanol absoluto. O extrato foi então filtrado e mantido durante 12 horas à -20 °C. O extrato ainda frio foi novamente filtrado visando a remoção da cera. O conteúdo então foi seco em pressão reduzida, compondo o extrato bruto etanólico sem cera (abreviado

como Bet). Esse extrato foi utilizado para a realização dos testes de fenóis totais (2.9), flavonoides (2.10), e doseamento de flavanonas e dihidroflavonois (2.11).

2.9 Doseamento de Fenóis totais

A determinação dos fenóis totais foi realizada como descrito por Woisky & Salatino (WOISKY; SALATINO, 1998), com adaptações, consistindo na transferência de 2 μL de cada extrato etanólico bruto das amostras a 15 mg/mL para os poços de microplaca, contendo 150 μL de água destilada. Posteriormente, são adicionados 24 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 36 μL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo o volume final completado com água destilada para 250 μL . Em seguida, foram realizados os mesmos passos para a construção da curva de calibração utilizando-se como solução padrão o ácido *p*-cumárico a 1 mg/mL (SILVA, 2008). Cada volume da solução padrão (visando as concentrações finais de 0, 1,5, 5, 10, 15,[...] 50 $\mu\text{g/mL}$) foi transferido para poço de microplaca, contendo 150 μL de água destilada, seguida da adição de 24 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 36 μL de solução saturada de carbonato de sódio, com o volume final completado com água destilada para 250 μL . A placa foi submetida à agitação em leitora de microplaca durante 15 minutos no escuro e deixada 25 minutos em repouso, e posteriormente realizada a leitura a 760 nm.

2.10 Doseamento de Flavonoides

O procedimento adotado seguiu duas metodologias complementares, recomendadas por Pełkal e Pyrzyńska (PEŁKAL; PYRZYŃSKA, 2014). Na primeira, uma alíquota de 125 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3) em concentração 2 % m/v é adicionada a 250 μL de extrato etanólicos de própolis a 1 mg/mL (ou padrão) e acrescidos de 250 μL de água destilada. A mistura foi vigorosamente agitada, submetida à incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, e analisada em 425 nm. Uma solução de AlCl_3 , acrescida da mesma quantidade de água, foi utilizada como branco. A curva padrão foi elaborada com quercetina em concentrações de 50 a 500 μM .

A segunda metodologia apresenta a adição de 150 μL de NaNO_2 (5 %, m/v) a 0,5 mL dos extratos etanólicos ou padrão. Como padrão foi utilizada a catequina

numa solução de 100 μM . Para o branco, o volume de solução teste foi substituído por água. Após 5 minutos, são adicionados 250 μL de uma solução de AlCl_3 (2 %, m/v). A solução é deixada em agitação por 6 minutos e neutralizada com 250 μL de NaOH 1 M. O conteúdo total foi então deixada em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, e 300 μL foram submetidos à leitura em $\lambda = 510 \text{ nm}$.

2.11 Doseamento de Flavanonas e dihidroflavonóis

A metodologia adotada se baseia no procedimento descrito por Bankova et al. (BANKOVA et al., 2019), com algumas modificações. A curva de calibração consistiu em uma solução etanólica de pinocembrina em concentração de 1 mg/mL. Também foi preparada de uma solução com 0,1 g de dinitrofenil-hidrazina (DNP) seca previamente a 60 °C por 3 horas, e em seguida dissolvido em 200 μL de ácido sulfúrico 96 % completando-se o volume para 10 mL com etanol.

Para o preparo da curva de calibração, a um tubo contendo 400 μL de solução preparada com DNP, são adicionados 200 μL da solução de pinocembrina. Essa mistura é mantida a 50 °C em banho-maria, durante 50 min. Em seguida os tubos são deixados em repouso até o retorno à temperatura ambiente. Na sequência foram adicionados 1,4 mL de KOH (100 mg/mL em etanol 70 %), obtendo-se o volume final de 2 mL. Dessa solução, são transferidas alíquotas de 25, 50, 100, 150 [...] 350 μL para novos tubos, completando o volume para 2 mL com etanol. Os tubos são centrifugados a 3000 rpm por 5 min. Para cada poço de microplaca são transferidos 200 μL do sobrenadante, e a absorbância lida a 486 nm.

Para a determinação do teor de flavanonas e dihidroflavonóis das amostras, 200 μL do extrato etanólico bruto na concentração de 10 mg/mL foram adicionados a tubos contendo 400 μL do reagente DNP. Esta mistura foi mantida a 50 °C por 50 min. Após atingir a temperatura ambiente, 1,4 mL de solução de KOH (100 mg/mL) é adicionada. Uma alíquota de 143 μL da solução descrita foi então transferida para um novo tubo, adicionando-se etanol suficiente para completar 2 mL. Esta mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min, e a absorbância do sobrenadante foi lida a 486 nm.

2.12 Extração fracionada

A extração foi realizada com quatro solventes de polaridade crescente, utilizando-se 10 g da própolis pulverizada (descrito no item 2.2), em extrator de Soxhlet. Inicialmente, foram utilizados 200 mL de hexano; em sequência, 200 mL de diclorometano, 200 mL de acetato de etila e 200 mL de etanol. Entre as trocas dos solventes a amostra foi seca em capela. A extração com cada solvente durou 6 horas. Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida e ressuspensos em volume e solvente adequados para as análises.

2.13 Derivatização

A trimetilsililação foi conduzida tanto para os extratos fracionados com solventes apolares (diclorometano e hexano) quanto para o conteúdo de ceras (obtidos no item 2.6), antes da injeção em cromatógrafo a gás, com uma alíquota de 80 μL de solução de extrato ou cera em concentração 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ressuspensos em hexano. A alíquota era transferida para tubos de inserção automática de cromatógrafo a gás e deixados em banho-maria (60 °C) até completa evaporação do solvente. Posteriormente, a cada um dos tubos foram adicionados 45 μL de piridina e 45 μL do reagente BSTFA (ZHANG; ZUO, 2005). Os tubos foram então tampados e mantidos durante uma hora em banho seco a 80 °C.

2.14 Composição dos extratos fracionados apolares por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Alíquotas de 1 μL dos extratos fracionados de hexano e diclorometano (logo após o procedimento de trimetilsililação 2.13) foram injetadas num cromatógrafo a gás (6850 – Agilent Technologies) acoplado a espectrômetro de massas (5975C – Agilent Technologies) utilizando uma coluna HP-5MS (30 m \times 0.250 mm – 0.25 μm – Agilent Technologies). Como gás de arraste foi utilizado Hélio com fluxo 1 mL/min. A rampa de aquecimento com taxa de 8 °C/min, iniciando com temperatura de 100 °C subindo até 300 °C e permanecendo por 10 min a 300 °C. A temperatura do injetor foi ajustada para 300 °C, a do quadrupolo a 150 °C e a da fonte de íons a

230 °C, com energia de ionização de 70 eV em modo scan com faixa entre 50 e 500 *m/z*. Os resultados foram confrontados com a biblioteca NIST. Foram considerados como identificados, compostos com correspondência maior ou igual a 95 % do espectro disponível na biblioteca.

2.15 Obtenção da fração de hidrocarbonetos das ceras

O procedimento foi realizado com os resíduos cerosos retidos nos papéis de filtro do procedimento de determinação do teor de ceras (item 2.6). Os materiais mencionados foram ressuspensos em diclorometano e adicionados a óxido de alumínio ativo – 90 (Merck, atividade 1). As misturas foram deixadas em banho-maria (60 °C) até completa evaporação do solvente. Os materiais secos e adsorvidos no óxido de alumínio foram então colocados no topo de colunas de vidro com 1 cm de diâmetro e cerca de 35 cm de altura, já preenchidas com óxido de alumínio ativo – 90 (Merck, atividade 1), e em seguida eluídos com hexano. Os conteúdos recolhidos foram deixados em banho-maria a 60 °C até a secura.

2.16 Composição da fração de hidrocarbonetos por cromatografia a gás acoplada a detector por ionização de chama (CG/FID)

Alíquotas de 1 µL da fração de hidrocarbonetos obtidas no item 2.15, ressuspensas em hexano foram injetadas num cromatógrafo a gás (6850 – Agilent Technologies), utilizando-se coluna de sílica fundida DB-5HT (30 m × 0,32 mm), com temperatura do injetor de 300 °C. Iniciando a 100 °C por 3 minutos em rampa de aquecimento correspondente a 5 °C/min até 320 °C, mantendo a temperatura máxima por 5 minutos. Como gás de arraste, foi utilizado o Hélio. A identificação dos compostos se deu pela comparação de tempos de retenção das amostras com aqueles obtidos por uma mistura padrões de hidrocarbonetos.

2.17 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM)

Para obtenção e análise do perfil cromatográfico do extrato bruto etanólico, as amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies – HPLC 1260), com detector de arranjos de fotodiodos e uma coluna de fase reversa Zorbax SB-C18 (4,6 × 250 mm 5 µm). A fase móvel foi constituída por ácido acético 0,1 % (solvente A) e metanol (solvente B), com fluxo constante de 0,5 mL/min e a leitura realizada a 228 nm e 352 nm. O gradiente da fase móvel foi iniciado com 10 % do solvente B por 7 min, 10 a 35 % de B de 7 a 12 min, 35 a 38 % de B de 12 a 27 min, 38 % de B de 27 a 35 min, 38 a 50 % de B de 35 a 50 min e 50 a 100 % de B de 50 a 100 min.

Essas mesmas amostras foram submetidas também à análise cromatográfica, sob a responsabilidade do Prof. Dr Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.18 Extração de compostos voláteis

Em aparato de Clevenger foram adicionados 250 mL de água contendo 25 g de material pulverizado (item 2.2). O procedimento de destilação por arraste de vapor foi mantido por 6 horas. Para as amostras com baixo rendimento de substâncias voláteis, o produto resultante da hidrodestilação, foi particionado com éter etílico, e a fase etérea recolhida.

2.19 Composição de óleos voláteis por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Alíquotas de 1 µL dos óleos voláteis obtidos no item 2.18 foram injetadas em cromatógrafo a gás (6850 – Agilent Technologies) acoplado a espectrômetro de massas (5975C – Agilent Technologies) utilizando uma coluna HP-5MS (30 m × 0,250 mm – 0,25 µm – Agilent Technologies). Como gás de arraste, foi utilizado Hélio com fluxo 1 mL/min. A rampa de aquecimento com taxa de 5 °C/min, foi iniciada em 50 °C subindo até 300 °C e permanecendo por 10 min nessa temperatura.

A temperatura do injetor foi ajustada para 200 °C, do quadrupolo a 150 °C e da fonte de íons a 230 °C, utilizando energia de ionização de 70 eV em modo scan com faixa entre 50 e 500 *m/z*. Os resultados foram confrontados com a biblioteca NIST, e espectros com correspondência igual ou superior a 95 % foram admitidos como identificados.

2.20 Análise de Atividade Antioxidante

As análises das atividades antioxidantes foram conduzidas a partir dos extratos de hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e bruto etanólico ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO).

2.20.1 Atividade sequestradora de radical DPPH*

A atividade de sequestro do radical 2,2'-difeníl-1-picril-hidrazila (DPPH) consistiu na preparação de uma solução etanólica do radical livre DPPH em concentração inicial de 20 µg/mL (SILVA, 2008; CLARKE et al., 2013; AKHIR; BAKAR; SANUSI, 2018). Essa solução apresenta absorvância entre 0,7 e 0,8 com leitura a 515 nm.

Para análise das amostras, 100 µL dos extratos, ressuspensos em DMSO, foram individualmente adicionadas aos poços, com 200 µL da solução de DPPH, obtendo-se como concentrações finais: 10, 25, 50, 75, 100 e 300 µg/mL. Para o branco das amostras, uma alíquota de 200 µL de DMSO foi adicionada no lugar da solução de DPPH (CLARKE et al., 2013).

A curva padrão foi estabelecida com uma solução de quercetina em DMSO, com a adição de 200 µL de DPPH em cada poço, visando as concentrações de 10, 25, 50, 75, 300 e 500 µg/mL. Como controle foi utilizada uma solução de DMSO no lugar das amostras. A placa então foi agitada e mantidas no escuro por 20 minutos, com a leitura a 517 nm.

2.20.2 Atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}

Este ensaio foi realizado utilizando o protocolo descrito por Re et al. (RE et al., 1999), com algumas adaptações. A solução do radical ABTS^{•+} consiste na adição de 1 mL de solução aquosa de 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio, também denominado de ABTS^{•+} (7 mM) em 17,6 µL de solução

também aquosa de persulfato de potássio (140 mM), mantida no escuro por 16 h. Após este período, 1 mL da solução do radical ABTS^{•+} é diluída em 40 mL de etanol até obtenção de absorvância próxima de 1. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, com as amostras dissolvidas em DMSO nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100, 300 µg/mL. Em cada poço foi adicionado 20 µL de cada uma das amostras, do DMSO para o branco, ou do controle positivo (Quercetina, 10 – 500 µg/mL) e 280 µL de solução do radical ABTS^{•+}. Após 20 minutos, as placas foram lidas em 734 nm.

2.20.3 Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC)

O protocolo é baseado em Gillespie et al. (GILLESPIE; CHAE; AINSWORTH, 2007). No qual uma solução de fluoresceína sódica de concentração 0,08 µM é preparada em solução tampão fosfato de potássio pH 7, e mantida no escuro. Em cada poço de uma placa de 96 poços, preta, foram adicionados 150 µL da solução de fluoresceína e 25 µL dos extratos dissolvidos em DMSO, com concentrações finais de 5 µg /mL. A solução é submetida a uma leitura inicial, adicionando-se em seguida 25 µL de uma solução de 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) (APPH) 150 mM. Foram realizadas leituras periódicas de 1 minuto, durante duas horas em excitação de 485 nm e emissão de 530 nm. O resultado foi então obtido pelo cálculo da área sob a curva (AUC) de redução da fluorescência.

2.21 Atividade biológica

A atividade biológica foi aferida com duas diferentes técnicas, e com grupos de organismos diferentes em cada uma das técnicas utilizadas.

2.21.1 Atividade antibacteriana

Por esta análise foi avaliado o impacto dos extratos da própolis sobre o crescimento bacteriano de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *Escherichia coli* K-12 MG1655, e cepa clínica de *Staphylococcus aureus*. As bactérias foram inoculadas em meio líquido Mueller Hinton (MH) *overnight*. No início do dia seguinte, o meio foi diluído até a obtenção de densidade óptica em leitura de 600 nm (DO₆₀₀)

com valor 0,1 e novamente incubado em estufa (37 °C) sob agitação até a obtenção de $DO_{600} = 1$ para padronização. Após a padronização, as bactérias foram inoculadas em placas de 96 poços, com extratos em concentração final de 0,05 mg/mL, ressuspendidos em DMSO, e acrescidos de meio MH. A análise do crescimento bacteriano se deu por ao menos 20 horas. Os testes serão realizados em triplicata, e o meio MH com 1 % de DMSO foi utilizado como branco. Este ensaio foi desenvolvido em colaboração com Caio Gomes de Tavares Rosa e Prof.^a Dra. Regina Baldini do “Laboratório de Regulação da expressão gênica em micro-organismos” do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.21.2 Ensaio de dispersão de biofilme

Este ensaio é baseado na capacidade da formação de biofilme sobre Policloreto de vinila (PVC), a partir de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 crescidas em meio Müeller Hinton (MH) (O'TOOLE; KOLTER, 1998), método, extremamente útil na caracterização da formação de biofilmes (O'TOOLE et al., 1999).

Após o mesmo procedimento de padronização da cultura bacteriana (tópico 2.21.1). Uma alíquota da cultura com $DO_{600} = 1$ foi diluída novamente em meio MH fresco na proporção de 1:6. Uma alíquota de 100 μ L da primeira diluição é novamente diluída em 1:100, e 400 μ L dessa diluição foi inoculada em cada poço de uma placa de 48 poços contendo 20 μ L dos extratos brutos etanólicos das amostras ressuspendidos em DMSO a 5 mg/mL. As placas foram incubadas durante 16 horas em estufa a 30 °C.

Decorrido esse período a placa foi lida em 600 nm, e seu conteúdo retirado, e lavado. Posteriormente, cada poço recebeu 25 μ L de solução Violeta cristal 1 % (m/v), substância que cora biofilme, sem interferir na coloração do PVC. As placas foram então deixadas em repouso por cerca de 15 minutos. Transcorrido esse tempo seu conteúdo foi retirado, e lavado. Após esse procedimento foram acrescentados 425 μ L de ácido acético 30 % em cada poço, deixados em repouso por 30 minutos. O conteúdo foi então agitado levemente por 5 segundos e lido em 550 nm. Os resultados foram representados pela proporção de biofilme formado (Bf), e pelos valores de absorbância obtidos entre a leitura a 600 nm ($ABS_{\text{crescimento}}$), e a formação de biofilme (ABS_{biofilme}).

$$Bf = \frac{ABS_{biofilme}}{ABS_{crescimento}}$$

Este ensaio foi desenvolvido em colaboração com o “Laboratório de Regulação da expressão gênica em micro-organismos” do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.21.3 Atividade antifúngica

A análise foi realizada por *Saccharomyces bayanus* em meio *Yeast extract – Peptone–Dextrose* (YPD, também denominado como YEPD). Nesta etapa foram utilizadas duas abordagens. A primeira se deu por meio da verificação do crescimento em DO₆₀₀ das culturas durante as primeiras 20 horas da exposição ao extrato. Na segunda, verificou-se a sobrevivência celular após 20, 45 e 70 horas de exposição aos extratos por meio da retenção de vermelho neutro (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; PROMOKINE; PROMOCCELL, 2019).

2.21.3.1 Análise do crescimento

A partir de uma cultura congelada foi preparado um pré-inóculo de 3 mL da levedura em estudo com crescimento *overnight* (cerca de 16 horas) a 30 °C sem agitação (ALDRICH, 2020). Decorrido esse tempo, a cultura com cerca de DO₆₀₀ = 1, foi transferida para novo meio de cultura obtendo-se a densidade ótica de 0,1 e mantida em estufa a 30 °C sem agitação. Após novamente ser atingida a DO₆₀₀ = 1, uma alíquota é transferida para meio fresco, visando a obtenção de DO₆₀₀ = 0,015. O meio com a densidade ótica corrigida foi então transferido para tubos contendo os extratos ressuspensos em DMSO, em concentração final ϕ de 0,5 %. As culturas tratadas foram transferidas para placas de 96 poços, 200 μ L por poço, e o crescimento acompanhado pela absorbância a 600 nm durante 24 horas, com leituras a cada 10 minutos e 150 segundos de agitação antes das leituras.

2.21.3.2 Ensaio de incorporação de vermelho neutro

O procedimento inicial de obtenção de uma cultura com DO₆₀₀ = 0.015 foi o mesmo do mencionado no item 2.21.3.1. O procedimento posterior foi baseado nas informações contidas na literatura especializada (ABCAM, 2018; REPETTO; DEL

PESO; ZURITA, 2008), com algumas modificações por se tratar de culturas de leveduras.

Placas de 96 poços, com 200 μL por poço de meio de cultura e os extratos (também em concentração ϕ de 0,5 %), foram mantidas a 30 °C durante os períodos de 20, 45 e 70 horas. Decorrido esse tempo, a placa foi centrifugada a 500 rfc durante 5 minutos. Os sobrenadante eram removidos e 215 μL de meio YPD com vermelho neutro em concentração de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi adicionado aos poços individualmente. As placas foram mantidas a 30 °C durante 2 horas. Transcorrido o período de exposição, a placa foi novamente centrifugada nos parâmetros mencionados acima, e os sobrenadante removidos. O corpo de fundo ressuspenso com 215 μL de tampão fosfato (PBS) para remoção do excesso de vermelho neutro não retido pelas células. A placa foi novamente centrifugada, e o sobrenadante removido. Ao final foi adicionada solução de solubilização composta por etanol:água:ácido acético (50:49:1). A placa foi então agitada durante 15 minutos e lida por fluorescência em excitação de 530 nm e emissão de 645 nm.

2.22 Análise dos dados

Todos os ensaios foram realizados em ao menos triplicatas visando minimizar erros associados à execução do método, e os resultados foram expressos na forma de médias \pm erro padrão. Neste trabalho, as análises foram conduzidas com o teste estatístico ANOVA (ANalysis Of VAriance), seguido do teste de Tukey, adotando no nível de significância de $\alpha < 0,05$. Utilizando o software R (R CORE TEAM, 2020) e o pacote agricolae (DE MENDIBURU, 2021).

Os dendrogramas foram produzidos pela similaridade dos dados a partir da distância euclidiana (UPGMA) e como procedimento de aglomeração foi adotado o algoritmo de Ward. O processamento de dados e construções se deram por meio do software R (R CORE TEAM, 2020) utilizando os pacotes: ape (PARADIS; SCHLIEP, 2018), dendextend (GALILI, 2015), gplots (WARNES et al., 2020), ggplot2 (WICKHAM, 2016), e ggraph (PEDERSEN, 2019).

Para analisar a possível correlação entre os teores de fenóis totais, flavonoides totais e ceras, os resultados foram submetidos ao teste de correlação com o au-

xílio da ferramenta de análise de dados do LibreOffice (LIBREOFFICE, 2007), e do pacote base do software R (R CORE TEAM, 2020)

A representação do gráfico de dispersão da análise de componentes principais (PCA), se deu pela utilização dos pacotes Factoextra (KASSAMBARA, ALBOUKA-DEL MUNDT, 2019) FactoMineR (LE et al., 2008) com pacote de cores viridis (GARNIER, 2018).

A construção dos mapas de calor (Heatmaps) se deu por meio do software R (R CORE TEAM, 2020), com os pacotes gplots (WARNES et al., 2020), viridis (GARNIER, 2018), e pals (WRIGHT, 2019) como padrão de cores.

A análise e representação das curvas de dose-resposta para as análises de antioxidantes se deu por meio do software R (R CORE TEAM, 2020) utilizando-se os pacotes Dose response curves (drc) (RITZ et al., 2015), e ggplot2 (WICKHAM, 2016). As estimativas dos valores se deram por meio da calculadora fornecida pela AAT Bioquest (AAT BIOQUEST, 2019), que utiliza o modelo de regressão logística de quatro parâmetros (1), utilizando o coeficiente de Hill (n), descrito pela equação:

$$S(x) = \min + \frac{\text{Max} - \min}{1 + \frac{x^n}{IC_{50}}} \quad (1)$$

As análises das curvas de crescimento bacteriano se deram por meio do software R (R CORE TEAM, 2020), utilizando-se os pacotes agricolae (DE MENDIBURU, 2021) e Growthcurver (SPROUFFSKE, 2020). Este último se baseando no modelo de equação logística (2) comum de estudos ecológicos e de evolução, o modelo é descrito por:

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0} \right) \cdot e^{-rt}} \quad (2)$$

No qual K é a capacidade de suporte, representando o número máximo de indivíduos suportado pelo ambiente nas condições estudadas. As variáveis: r correspondendo à taxa de crescimento, e N_0 o número inicial de indivíduos na cultura.

As representações gráficas se deram por meio do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016), e ggpubr (KASSAMBARA, 2020). A representação em curvas de dose resposta para análise das diferentes concentrações de extrato em atividade foi rea-

lizada pelo mesmo programa, utilizando o pacote GRmetrics (CLARK et al., 2017). Assim como a construção de algumas tabelas se deu pelo kableExtra (ZHU, 2021). Todas as unidades, representações e conteúdo deste trabalho seguiram as normas e diretrizes do Sistema Internacional de unidades (SI) (INMETRO, 2012).

3 Resultados e discussão

3.1 Massa seca

A análise do teor de umidade revela que para a maioria das amostras estudadas não houve diferença significativa (Fig. 2). Entretanto, um grupo apresentou uma maior porcentagem de água quando comparada com a maioria das outras amostras.

M. flavolineata (EF), *S. bipunctata* (SB), *S. xanthotricha* (SX), e *S. postica* (YP) apresentaram conteúdo de umidade maior do que as outras própolis, apresentando 18,86, 16,53, 13, 83, e 13,82 % respectivamente. Os produtores dessas amostras relataram que as coletas foram realizadas em dias nublados da estação chuvosa, sendo possivelmente um fator de interferência responsável pelo alto teor de umidade observado. Considerando que para a própolis de *Apis* é documentada a influência que o método de manipulação e armazenamento podem ter sobre este parâmetro (CUNHA et al., 2004), é possível inferir que algo similar possa ter ocorrido com as própolis de Meliponini.

Essa hipótese é corroborada pelo fato de todas amostras do Meliponário S, *S. bipunctata* (SB) e *S. xanthotricha* (SX), apresentarem valores médios de umidade similares (16,53 e 13,83 % respectivamente), e ao compararmos com as mencionadas espécies, mas provenientes do produtor A (Fig. 2-AB e AX), verificou-se que o teor de umidade foi de 6,44 e 7,52 %, sendo significativamente diferente. Outros autores também encontraram variações de composição de amostras de própolis obtidas sob condições meteorológicas distintas (BARBOSA et al., 2019; ALDANA-MEJÍA et al., 2021).

No caso da geoprópolis, ainda há a adição de solo em sua composição, o que pode ou não incluir partículas de argila. Essas partículas de arranjo coloidal, apresentam uma grande capacidade de retenção de água, sendo, portanto, facilmente influenciada por mudanças da umidade ambiental (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA;

GNIEWOSZ, 2019). Em contraste, há a inclusão de ceras na própolis, um constituinte que dificulta a dessecação ou ganho de água (BREAZEALE; MCGEORG; BREAZEALE, 1950). Tendo em vista que a própolis possui materiais de diferentes afinidades (DA SILVA et al., 2011), as proporções desses componentes possivelmente afetam sua interação com a umidade do ambiente.

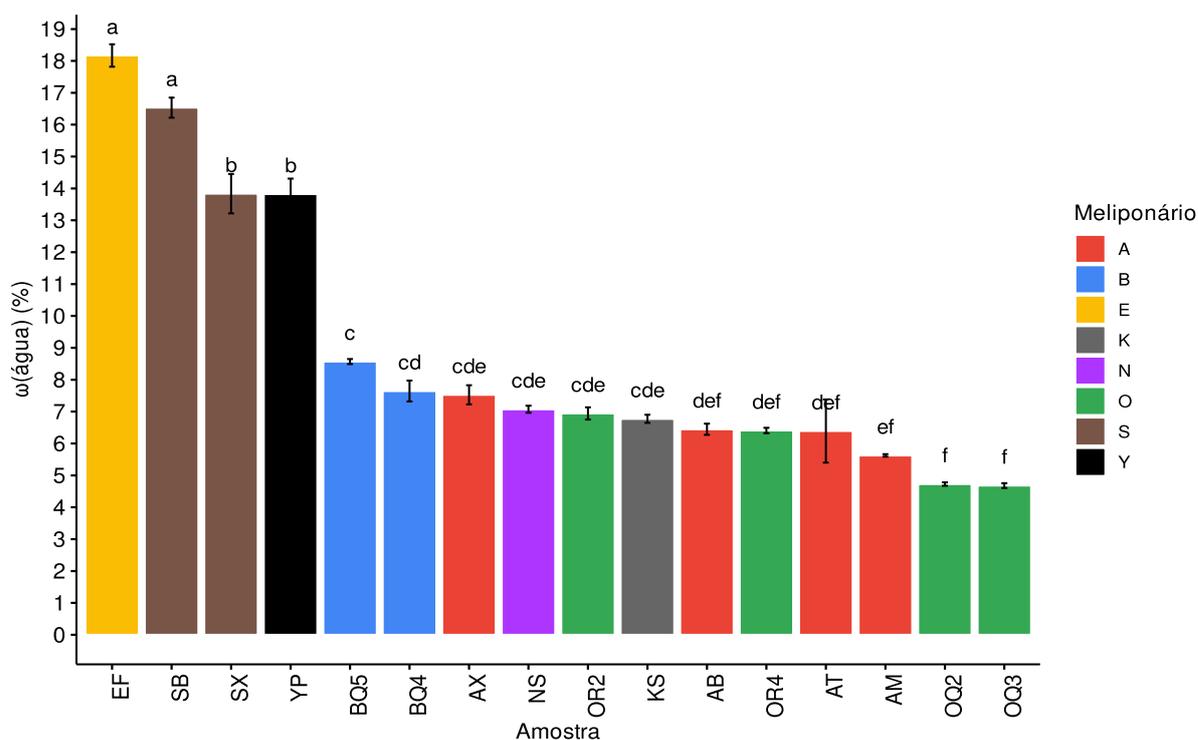


Figura 2: Teor de umidade das amostras de própolis dos gêneros *Melipona* e *Scaptotrigona*. Barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente adotando $\alpha \leq 5\%$. As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies, como indicado pela Tabela 1.

Quando pulverizada, a própolis de *Apis*, apresenta a capacidade de absorção de água, e com passar do tempo forma um composto pastoso e pegajoso, ou mesmo empedrado, fenômeno de endurecimento originalmente denominado “*caking*” (DA SILVA et al., 2011). Entretanto, as formas de integração e do comportamento higroscópico da própolis das abelhas sem ferrão ainda são pouco conhecidas, sendo necessárias investigações para compreender as interações de seus produtos com a água. Neste trabalho, o material pulverizado que não fora acondicionado em recipi-

entes herméticos acabou por se aglomerar novamente formando blocos, algo similar ao observado com a própolis de *Apis*.

O padrão estabelecido pela legislação vigente admite a perda por dessecação de até 8 % da massa (BRASIL, 2000, 2001). Esse critério se baseia na redução do tempo de prateleira que produtos com grande teor de água podem sofrer (ESCRICHE; JUAN-BORRÁS, 2018; SULAEMAN; NUSA; MARLIYATI, 2021) principalmente por afetar a estabilidade química (ESCRICHE; JUAN-BORRÁS, 2018). Assim como o reconhecimento dos valores de massa seca reduz a incerteza dos doseamentos. O valor experimental apresentado aqui por grande parte das amostras, é maior que o padrão estabelecido (Fig. 2). Como já discutido em outros trabalhos (PEREIRA; SALATINO; SALATINO, 2020), os padrões estabelecidos pela legislação foram baseados em amostras de própolis produzidas por *Apis*, visando a compreensão de sua composição para estabelecimento de controle de qualidade. Entretanto, esses padrões não refletiram o observado para algumas das amostras em estudo (Fig. 2-EF a BQ5).

Para o mel de abelhas sem ferrão, alguns autores já reconhecem que o conteúdo de água parece ser significativamente maior do que o padrão estabelecido para o de *Apis* (DE OLIVEIRA et al., 2018). Com os dados apresentados, isso também foi encontrado para as amostras de própolis deste estudo.

3.2 Teor de cinzas

Os valores obtidos para o teor de cinzas indicam uma divisão entre os dois gêneros estudados (Fig. 3), enquanto o gênero *Melipona* apresenta um conteúdo de solo muito maior (entre 81,7 e 42 %), em *Scaptotrigona*, o solo é predominantemente representado somente como uma porção residual, compondo entre 11,98 e 1,86 % da massa (Fig. 3).

Para as espécies de *S. xanthotricha* (AX e SX) e *S. bipunctata* (AB e SB), não foram encontradas diferenças no teor de cinzas entre as amostras de diferentes localidades (Fig. 3). Desse modo, os dados sugerem que a quantidade de minerais presentes nas amostras de *S. xanthotricha* (1,99 e 2,42 % para AX e SX, respectivamente) e *S. bipunctata* (2,60 e 2,46 %, para AB e SB respectivamente) é mais fortemente relacionada a espécie do que com relação à região da qual o material é proveniente.

Essa hipótese é corroborada pelo fato dos valores aqui obtidos serem muito próximos do observado para *S. bipunctata* em outros estudos (BARBOSA et al., 2019; DINIZ et al., 2021).

Para *M. quadrifasciata* (BQ4, BQ5, OQ2, e OQ3) foram obtidas diferenças substanciais, com as cinzas correspondendo a valores entre 75,8 e 45,59 %, indicando um grande impacto da quantidade de solo adicionada de acordo com a região da amostra (Fig. 3). Atualmente, estudos relacionados ao comportamento de coleta de resina, e do solo, ou ainda fatores que modificam esse comportamento, além de outros aspectos associados à produção da própolis, precisam de maior atenção (CHAM et al., 2019).

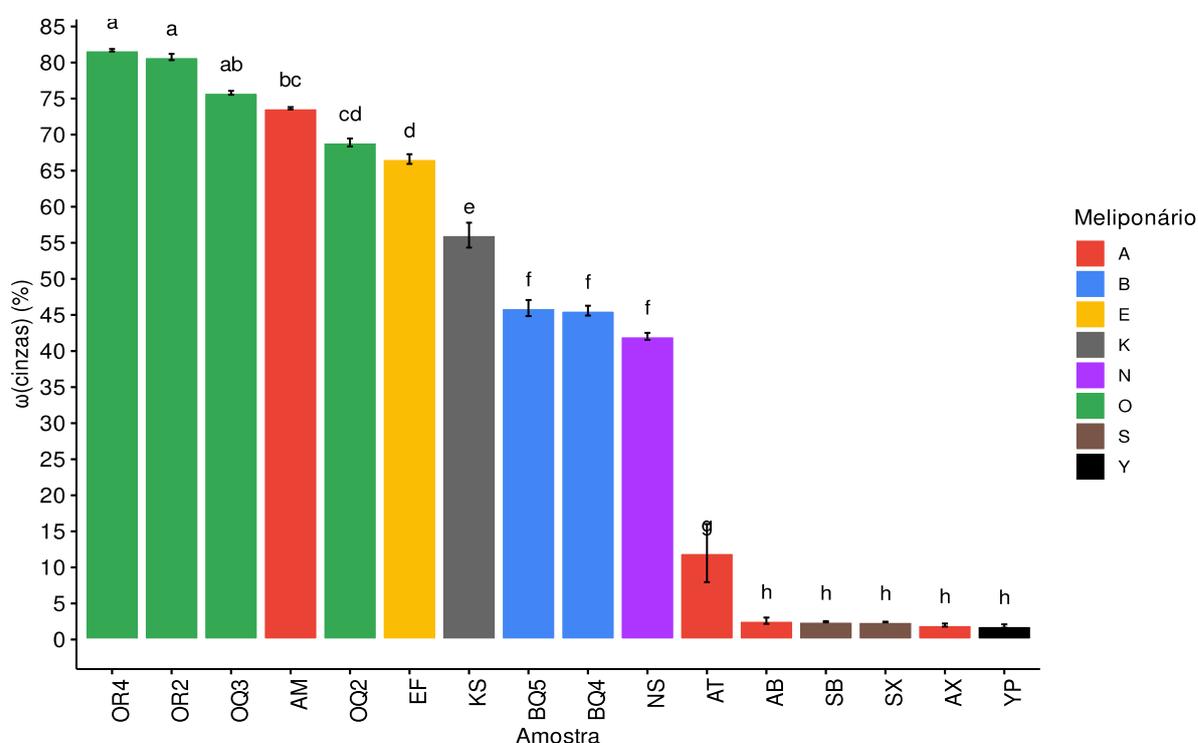


Figura 3: Porcentagem em massa do teor de cinzas das amostras de própolis dos gêneros *Melipona* e *Scaptotrigona*. Barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente adotando $\alpha \leq 5\%$. As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

A regularização do parâmetro de cinzas para própolis proposto pela instrução normativa (BRASIL, 2001), surge devido a uma estratégia de adulteração do conteúdo da própolis, por meio da adição de impurezas (FUNARI; FERRO, 2006), como,

por exemplo, terra. Tendo em vista que a própolis se trata de um produto escuro, o conteúdo de solo adicionado não é facilmente identificado a olho nu (WOISKY; SALATINO, 1998). Assim, a submissão de amostras a esse procedimento possibilita a identificação de quantidades anormais de conteúdo mineral, e conseqüentemente a identificação de fraudes (SPINK, 2019).

Entretanto, mesmo a análise das amostras genuínas de própolis de algumas espécies é possível observar a presença de solo, devido à adição deste pelas abelhas (Fig. 3). Desse modo, para a regularização da comercialização da própolis de abelhas sem ferrão é necessária uma revisão dos parâmetros já propostos, de modo a se adequar ao seu conteúdo regular (PEREIRA; SALATINO; SALATINO, 2020).

O Ministério da agricultura exige para comercialização, um conteúdo de cinzas correspondente ou inferior a 5% de massa da própolis (BRASIL, 2000). Esse parâmetro é muito discrepante dos valores obtidos para a maioria das espécies estudadas (Fig. 3-OR4 a AT), especialmente para as do gênero *Melipona* (Fig. 3-OR4 a NS).

Os resultados obtidos no presente trabalho também indicam que as regras utilizadas para certificar a qualidade da própolis de *Apis* diferem muito dos parâmetros da própolis oriunda das abelhas sem ferrão, o que está em concordância com estudos anteriores (DE LIMA, 2015; PEREIRA; SALATINO; SALATINO, 2020). Tendo em vista a diversidade da composição observada, o uso dos parâmetros adotados para *Apis* são muito restritos. Desse modo, reconhecer as variações de composição da própolis das abelhas nativas, torna possível o entendimento da heterogeneidade desse produto de acordo com a espécie, e evidencia a particularidade de cada uma delas.

3.3 Composição mineralógica das cinzas

A análise de amostras minerais possibilita o reconhecimento de possíveis fontes do material mineral, do contexto mineral da região, do clima antigo e do regime de intemperismo (GROTZINGER et al., 2006). No contexto deste estudo, foi importante para identificar certos padrões na coleta das abelhas. Contudo, essa análise só é possível de ser realizada por meio da identificação das amostras que efetivamente apresentaram conteúdo de origem edáfica, enquanto as amostras que

não apresentaram material mineralógico (Fig. 4-A) não são passíveis dessa abordagem.

Em quase todas as amostras de *Scaptotrigona*, não foram encontradas partículas minerais provenientes de solo (Fig. 4-A), o que se complementa com os dados de uma baixa porcentagem da massa correspondente ao teor de cinzas (Fig. 3). *S. tubiba* (AT), entretanto, se mostrou uma exceção dado que essa amostra possuía conteúdo de origem edáfica (Fig. 4-D).

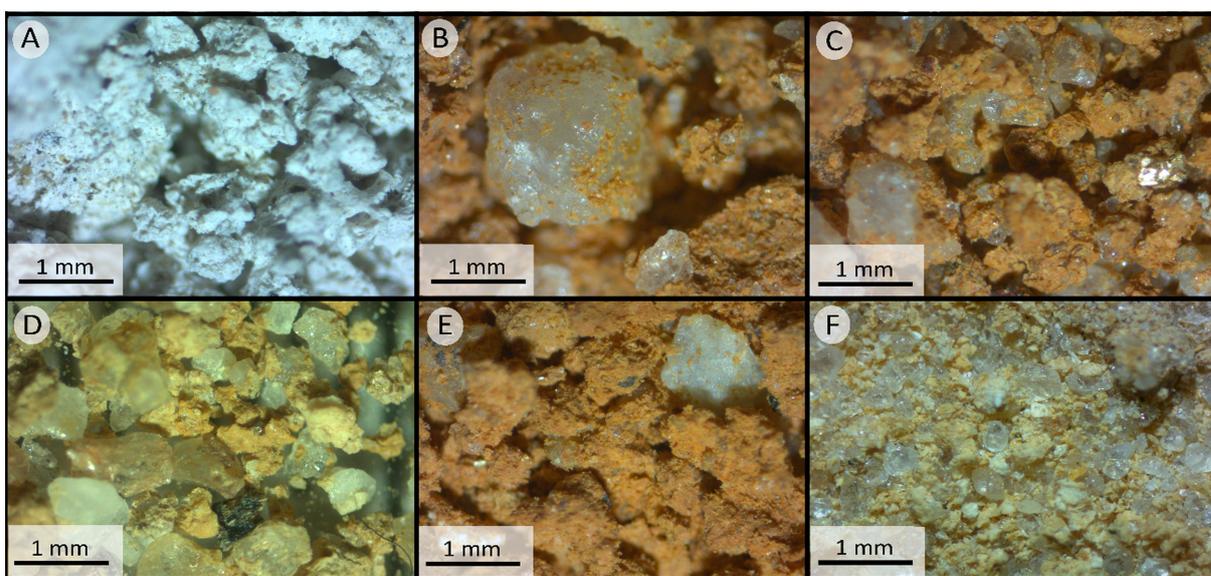


Figura 4: Prancha do registro fotográfico realizado em estereomicroscópio. **A** – Aparência do resíduo de cinzas quando não há a adição de solo na composição da própolis; **B** – Partículas de quartzo, da ordem de cascalho fino, das amostras provenientes do meliponário O; **C** – Partículas irregulares, da ordem de areia média, proveniente do meliponário O; **D** – Detalhe do conjunto de partículas de quartzo angulosas provenientes do meliponário A; **E** – Aspecto geral do conjunto argiloso apresentado pelas amostras, com um elemento de quartzo anguloso; **F** – Partículas de quartzo arredondadas e mais selecionadas, das amostras de própolis de *M. flavolineata* do meliponário E.

Geralmente, a maioria das espécies trabalhadas, quando incluíam solo na produção de suas própolis, apresentaram um determinado padrão do material incorporado. As amostras apresentam-se com predominância de argilominerais, com quantidades variadas de cristais de quartzo (Fig. 4 – B, C, E). Esses dois componentes, em diferentes proporções, representam quase a totalidade dos minerais constituintes do resíduo mineral. Na literatura é encontrado que a inclusão de minerais

arenosos e argilosos podem ser responsáveis pelo aumento da robustez dos potes primitivos, que eram anteriormente produzidos somente com cerume (FREITAS; VIT; BARTH, 2014).

Outros componentes estão presentes, e desses, é notável a presença de cristais de um mineral escuro, de hábito fibroso em duas das quatro amostras provenientes do Meliponário A (Fig. 4 – D). Também é possível observar a presença de minerais micáceos e pirita em algumas delas, indicando que esse material mineral tem origem de rochas metamórficas e com intemperismo avançado (BIGARELLA; BECKER; SANTOS, 2007). Sobre o conjunto de minerais também é possível observar diferentes graus de angulosidade dos cristais. A angulosidade é um parâmetro indicador da movimentação das partículas minerais (DOMOKOS et al., 2014). Partículas que sofreram transporte por longas distâncias apresentam maior arredondamento, portanto, menor angulosidade, enquanto as partículas que sofreram intemperismo, se separando do corpo mineral de origem, e que permaneceram nesse local, ou que foram transportados por curtas distâncias se conservam com desenho recortado, anguloso indicando o fraturamento da rocha mãe (DOMOKOS et al., 2014). Neste estudo, observamos predominantemente partículas de maior angulosidade (Fig. 4-B a E).

Contudo, o conjunto mineral apresentado pela amostra de *M. flavolineata* (EF) se mostra com partículas de quartzo de grande esfericidade (baixa angulosidade), sendo classificados como subarredondados e arredondados (BIGARELLA; BECKER; SANTOS, 2007). Indicando que esse conjunto de partículas sofreu abrasão contínua (GROTZINGER et al., 2006), promovendo uma redução de suas irregularidades (LYON; BUCKMAN, 1943). Isso sugere que os sedimentos foram transportados por uma distância considerável, o que geralmente está associado com o fluxo de água (GROTZINGER et al., 2006; BRADY; WEIL, 2013). Conjunto de características minerais muito comum em ambiente de sedimentação aluvial (GROTZINGER et al., 2006; DOMOKOS et al., 2014).

Além disso, essa amostra também apresentou maior proporção de minerais de quartzo (Fig. 4-F), com baixo conteúdo de argila e silte ao ser comparada as outras. Isso se associa com um ambiente de sedimentação com transporte de partículas, diferindo de ambientes lacustres, por exemplo. O que é corroborado pelo grupo mineral encontrado ser mais semelhante à estrutura de quartzos arenitos (arenitos

com predominância de quartzo) (GROTZINGER et al., 2006). Maiores teores de quartzo e reduzido teor de argila e silte são provenientes de grupos minerais comumente associados a reduzida plasticidade e coesão, além de baixa retenção de água (BRADY; WEIL, 2013; GAMA, 2004).

Desse modo, o conjunto mineral da amostra de *M. flavolineata* (EF) indica que essas abelhas coletam material sedimentar de rios para inclusão em suas própolis, diferindo muito do conteúdo observado para as outras amostras. Entretanto, tendo em vista que a amostra de *M. flavolineata* é de origem da região amazônica (Fig. 1), possivelmente o material mineral apresentado é o mais abundante e disponível para a região em que as colmeias estavam inseridas.

Das amostras obtidas do Guarujá (produtor A), a composição mineral não indica uma origem aluvial. Desse modo, visando confirmar a diferença entre o material mineral presente nas amostras e a composição dos depósitos minerais abundantes da região, foram analisadas amostras sedimentares de um rio e da praia próximos da região de produção. Os componentes dessas amostras são predominantemente de quartzo, subarredondados a arredondados (Fig. 5).

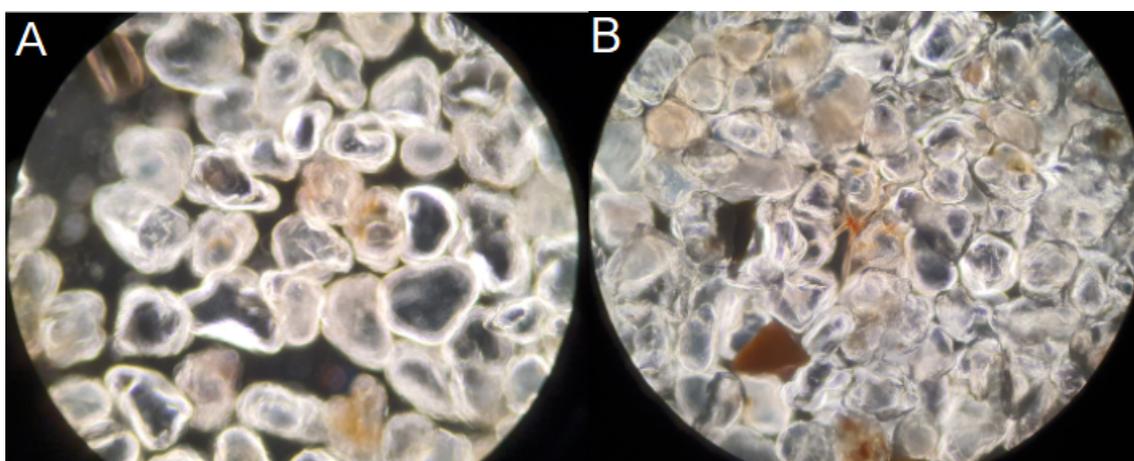


Figura 5: Material sedimentar da região do meliponário A. A – Análise dos sedimentos provenientes do rio da região. B – Sedimentos costeiros das proximidades do Meliponário A. As fotos foram tiradas com aumento de 400 ×.

As duas amostras eram extremamente semelhantes, com grande presença de quartzo correspondente ao grupo de areia fina com partículas apresentando entre 0.72 e 1 mm (Fig. 5). Essa descrição é muito próxima do que é esperado para o tipo

de depósito mineral, e similar ao observado para o material coletado por *M. flavolineata* (Fig. 4-F).

Ao comparar a composição mineral do material recolhido pelas abelhas do Guaruja (Fig. 4-D) com a composição dos sedimentos costeiros, e aluviais da região (Fig. 5), apesar de terem sido notadas a presença de minerais como basalto e feldspato, com alto grau de arredondamento, a composição mineral é muito diferente (Fig. 4-D). Essa variação substancial, indica que as abelhas não utilizam esses locais amostrados como fonte de material mineral para inclusão em sua própolis.

M. quadrifasciata e *M. mondury*, provenientes do Meliponário O, apresentaram predominância de partículas de argila (Fig. 4), com baixo teor de quartzo do tamanho de cascalho fino (Fig. 6). A semelhança das duas amostras pode indicar a exploração de fontes similares de material edáfico, assim como a possível predominância desse material na região.

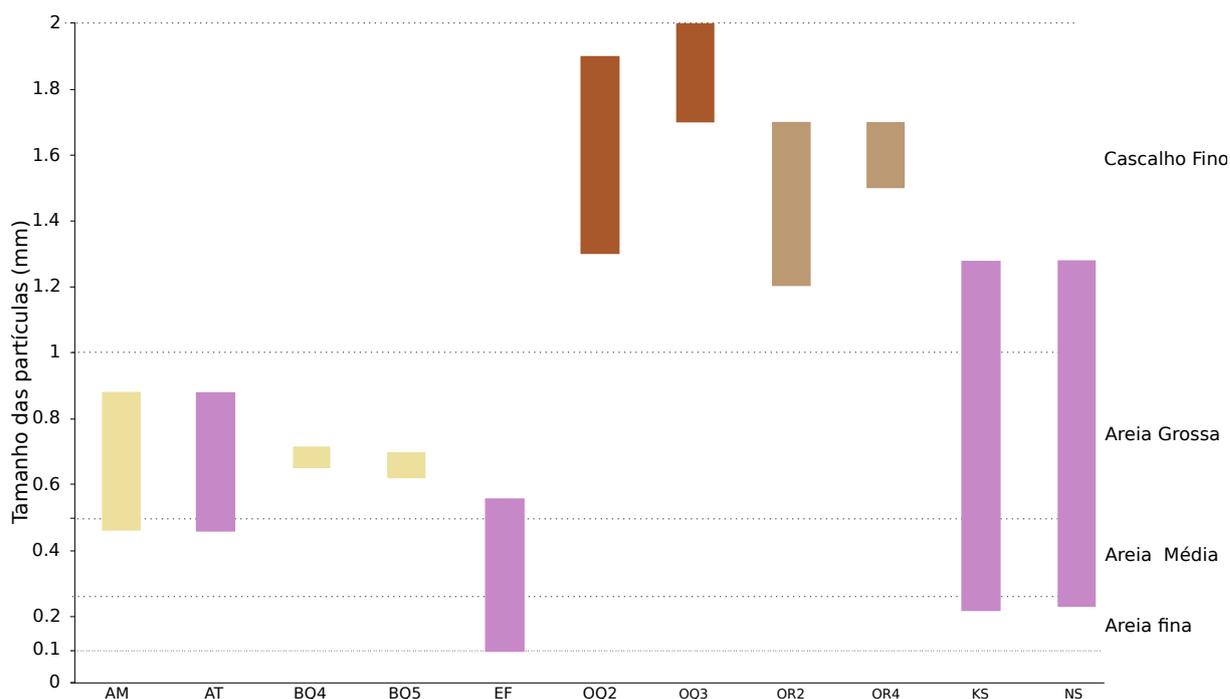


Figura 6: Gráfico da composição mineralógica das cinzas. O tamanho das barras indica o intervalo de tamanho das partículas de quartzo das amostras. As cores das barras representam o nome do grupo de cores obtidas segundo a carta de Munsell®: Amarelo avermelhado 7YR (■), Rosa (■), Vermelho amarelado (■), e Amarelo (■).

Também foi conduzida uma avaliação da seleção de amostras minerais (Fig. 6), indicando variações entre amostras provenientes de produtores diferentes, mesmo quando pertencendo a mesma espécie. Pode-se notar os diferentes minerais inseridos nas própolis de *M. quadrifasciata* proveniente dos meliponários B e O.

A seleção de minerais é classificada de acordo com a abrangência de seus tamanhos em uma amostra. Aquelas provenientes de uma mesma região apresentam intervalo de partículas com tamanhos similares (Fig. 6). Desse modo há uma indicação de que exploram fontes com tamanhos de partícula parecidos.

De maneira geral, um conjunto mineral com pequena variação de tamanhos indica um transporte de sedimentos de maneira seletiva e de baixa intensidade (DOMOKOS et al., 2014). Contrastando com conjuntos que apresentam grandes variações de tamanhos, aos quais se associam uma maior energia de transporte.

M. marginata (AM), *S. tubiba* (AT), e em maior intensidade *M. subnitida* (NS e KS) apresentaram conjuntos minerais menos selecionados ao serem comparados aos outros, ou seja, apresentam minerais com grande diferença de tamanho (Fig. 6). Enquanto *M. marginata* (AM), *S. tubiba* (AT), apresentaram uma variação entre areia grossa e média, as amostras de *M. subnitida* apresentaram ampla gama de tamanhos, atingindo todas as classificações entre areia fina e cascalho fino (Fig. 6). Em todas as outras amostras o padrão de dispersão foi restrito a um único grupo de classificação.

A coleta de materiais para a composição da própolis é influenciada por aspectos comportamentais e propriedades fisiológicas (EROĞLU; ACAR; KEKEÇOĞLU, 2021). É reconhecido que as dimensões corporais das abelhas têm uma forte associação com sua capacidade de voo. Tendo em vista que abelhas maiores alcançam maiores distâncias (ARAÚJO et al., 2004). Dos dois gêneros estudados, *Melipona* não é somente o que apresenta abelhas maiores (KLEINERT; SILVA, 2020), mas compreende as abelhas mais robustas da tribo (GRÜETER, 2020) e conseqüentemente com maior capacidade de voo, atingindo cerca de 2 km de distância da colmeia (ARAÚJO et al., 2004), além de serem mais especialistas e competidoras eficientes (NETO; MORAIS, 2020).

Os dados obtidos da composição mineralógica sugerem que talvez as abelhas sejam pouco criteriosas para o tamanho das partículas exploradas (Fig. 6), pois

ao se comparar *M. marginata* (AM), que apresenta maiores dimensões, e *S. tubiba*, (AT) que pertence a um gênero de abelhas menores e que conseguem voar cerca de 1 km, o conjunto mineral obtido por elas possui pouca variação de tamanho. Entretanto, para melhor avaliação seria necessário um estudo adequado, tendo em vista que as diferenças observadas também podem estar somente relacionadas com o material mineral disponível na região, pois ambas pertencem ao produtor A.

É possível notar também diferenças com relação ao Meliponário de origem para *M. quadrifasciata* (meliponários B e O). Enquanto a composição mineralógica da amostra do produtor B variou nos parâmetros de seleção, apresentando diferenças de abrangência do intervalo de tamanhos (Fig. 6), e a cor (Tabela 2), a amostra proveniente do Meliponário O, que compreende uma região rural, apresentou a predominância de partículas de cascalho fino. Nas amostras de origem urbana, do Meliponário B predominaram partículas de quartzo menores, correspondendo a classificação como areia grossa. Essas diferenças podem ser causadas pelo acesso a materiais geológicos diferentes, que são típicos da região na qual a colmeia se encontra.

A categorização em índices de cores tem sido utilizadas para quantificar variações na morfologia e formação de solos (GOBIN et al., 2000). Os solos tropicais geralmente compreendem valores entre 10YR e 5YR. No contexto brasileiro, existe uma correlação substancial entre o teor de vermelho e a presença de hematita (YANG et al., 2001), mineral composto por óxido de ferro, classificado como acessório comum em rochas ígneas félsicas, e importante em algumas formações ferríferas (NAVARRO et al., 2017). O conteúdo de sais minerais como ferro, cobre, potássio e zinco nas geoprópolis do gênero *Melipona* tem sido notadamente superior ao encontrado na própolis de *Apis*, ainda que seja um aspecto variante com relação à região de origem da geoprópolis (FERREIRA et al., 2019), o que possivelmente indica que o aumento desses minerais tem alguma relação com os materiais obtidos localmente. Aspecto que pode ser indicado pela cor do conjunto mineral.

A maioria das amostras apresentou a predominância de argilominerais (Fig. 4). A formação da argila é mais comumente associada ao intemperismo complexo do granodiorito (rocha ígnea semelhante ao granito), no qual os cristais de quartzo se mantêm inalterados, contudo novos silicatos de alumínio (argilominerais) são formados, assim como óxidos férricos hidratados (limonite) (BIGARELLA; BECKER;

SANTOS, 2007). Essa descrição de enquadra bem para o material observado para as amostras.

Tabela 2: Classificação de cor, segundo a carta de Munsell®, das partículas minerais adicionadas à própolis das abelhas sem ferrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Produtor	Espécies	Grupo de cor	Hue Chroma/valor
	<i>Melipona marginata</i>	Amarelo avermelhado	7YR 6/6
A	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	—	—
	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Rosa	5YR 7/3
	<i>Scaptotrigopna bipunctata</i>	—	—
B	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Amarelo avermelhado	7.5YR 6/8
Y	<i>Scaptotrigona postica</i>	—	—
S	<i>Scaptotrigopna bipunctata</i>	—	—
	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	—	—
E	<i>Melipona flavolineata</i>	Rosa	7.5YR 7/4
O	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Vermelho amarelado	5YR 5/8
	<i>Melipona mondury</i>	Vermelho amarelado	5YR 5/8
	<i>Melipona mondury</i>	Amarelo	5YR 6/8
N	<i>Melipona subnitida</i>	Rosa	7.5YR 7/4
K	<i>Melipona subnitida</i>	Rosa	7.5YR 7/5

* — amostras sem conteúdo mineral de origem edáfica na própolis

Genericamente, os dados obtidos também não possibilitam afirmar contun-
dentemente que uma mesma espécie apresente preferência por uma coloração de
solo (Tabela 2), visto que algumas variações podem se dar somente pelo material
mineral disponível localmente. Enquanto as amostras de *M. quadrifasciata* vindas
de Cotia (O) apresentaram materiais muito semelhantes, as colmeias de *M. mon-*

dury vindas desse mesmo produtor indicam que elas exploraram materiais distintos tendo como base as diferenças sutis de coloração (Fig. 6 e Tabela 2).

Previamente, a análise da composição metálica de amostras de geoprópolis indicaram que os fatores geográficos foram mais determinantes do que a espécie de abelha (FERREIRA et al., 2019). Também é importante ressaltar que não se tratam de amostras puras de solo, visto que as abelhas podem utilizar um conjunto diverso de origens minerais, compondo um mosaico mineral com o que há disponível.

Desse modo, o aspecto principal que chama atenção na análise dos compostos minerais é o fato das espécies estudadas de *Melipona* incorporarem material mineral predominantemente argiloso (Fig. 4—B, C, E), com reduzido teor de quartzo. Esse fato é importante tendo em vista a maior possibilidade de manipulação desse material pelas abelhas, e que esse conjunto mineral é mais facilmente moldável (LYON; BUCKMAN, 1943), e capaz de formar agregados estáveis (WAKINDIKI; BENHUR, 2002). Alguns autores ainda argumentam que as amostras de geoprópolis são mais rígidas e menos maleáveis que amostras de própolis quando secas (FREITAS; VIT; BARTH, 2014). Esse conjunto de características pode proporcionar maior facilidade de incorporação do material edáfico durante a fabricação da própolis, além de promover uma maior aderência e estrutura para a própolis quando empregado como revestimento da colmeia.

3.4 Teor de ceras

O teor de ceras obtido também indica uma divisão clara entre o gênero *Melipona* e *Scaptotrigona* (Fig. 7). Dado que *Scaptotrigona* apresenta as maiores proporções de cera em suas amostras (Fig. 7-SX a AT) quando comparada com *Melipona* (Fig. 7-NS a OR4), o oposto ao que foi observado para a análise de cinzas (Fig. 3). A contraposição da proporção desses dois componentes pode indicar que possivelmente, a cera e o solo desempenham o mesmo papel na produção da própolis.

Os valores de cera em meliponários de origem urbana foi superior ao daqueles de região rural, possivelmente associado com a dificuldade em obter material de origem vegetal (Fig. 7). Muitas espécies de Meliponini tem se mostrado compatível com o ambiente urbano, mesmo com a grande diferença de disponibilidade de recursos vegetais (KLEINERT; SILVA, 2020). Contudo, ainda é necessário compreen-

der de que maneira esse ambiente pode impactar a produção da própolis, mesmo que os dados apresentados indiquem uma redução do conteúdo vegetal para própolis de *Melipona*.

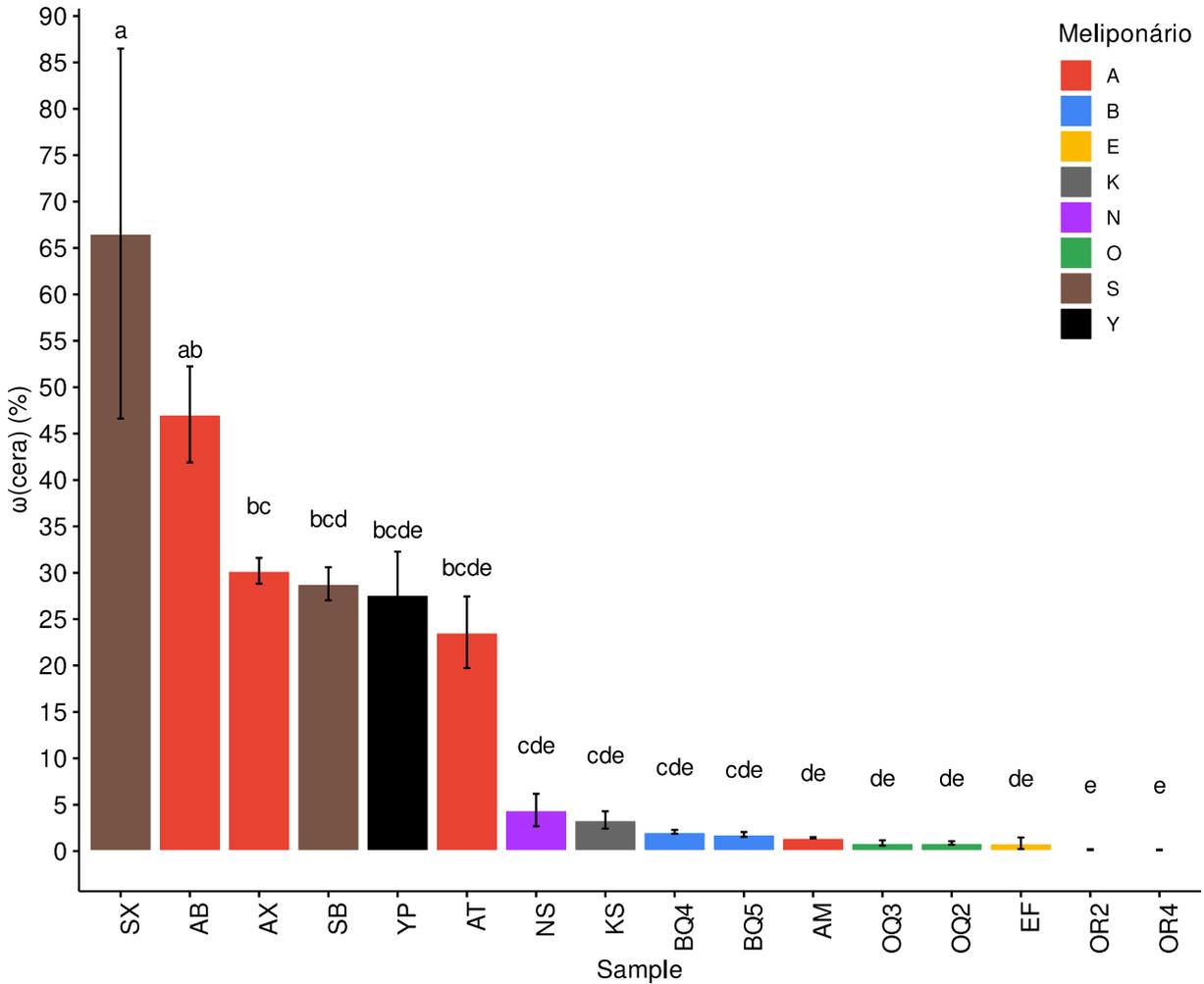


Figura 7: Teor de ceras nas amostras de própolis dos gêneros *Melipona* e *Scaptotrigona*. Barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente adotando $\alpha \leq 5\%$. As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Akatsu e Soares (AKATSU; SOARES, 2009) mencionam que para as espécies de *Scaptotrigona*, a proporção de cera e de resinas não se altera ao longo do ano, possivelmente devido à disponibilidade de resina não ser tão dependente de ciclos anuais como, por exemplo, períodos de florada. Assim, a proporção de cera parece

ser constante, mas a sua predominância ou não é provavelmente dependente da densidade da flora local.

No caso de *Apis*, a proporção de cera e própolis apresentam um papel essencial na estrutura da colmeia (DAMODARAN, 2021). A cera parece se apresentar como constituinte essencial para a aderência da porção de conteúdo vegetal (STREHLE et al., 2003), sendo que amostras de própolis com maiores teores de ceras são utilizados para a fixação desse material como revestimento. Entretanto, no caso de Meliponini as estruturas do ninho não são produzidas somente com a cera pura, e sim da mistura desse material com outros, sendo incorporada principalmente resinas de origem vegetal (GRÜETER, 2020) gerando um material mais firme e com menor contaminação por fungos e bactérias (GRÜETER, 2020).

Em algumas amostras, a presença de cera é muito baixa, com um alto teor de solo. O material mineral recolhido pelas abelhas apresenta propriedades plásticas pelo alto conteúdo de argilominerais (OSÓRIO, 2017). É possível, portanto, que o papel de aderência, que normalmente é exercido pela cera, talvez seja substituído pela estrutura mineral argilosa que é extremamente maleável (GRÜETER, 2020).

Nos estudos envolvendo a própolis de *Apis* do Brasil, o conteúdo de cera geralmente compreende uma proporção de 2 a 14 % da massa (WOISKY; SALATINO, 1998; FUNARI; FERRO, 2006; MATSUDA, 2006). A cera é considerada um fator importante na qualidade do produto, já que a inclusão indevida de favos para o aumento de massa é uma forma de adulteração do produto (MATSUDA, 2006), assim como a atividade biológica é principalmente associada com uma maior proporção de material de origem vegetal (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; BOUZAHOUANE et al., 2021). Desse modo, maiores proporções de cera podem impactar a atividade biológica e o interesse mercadológico da própolis (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019).

Contudo, estudos mais recentes veem encontrando atividades biológicas para as ceras (KACÁNIOVÁ et al., 2012), que devido à sua atividade antibacteriana, tem aplicação na indústria para conservação do papel (LIU et al., 2016). A cera de abelha também é valorizada como produto impermeabilizante de uso geral (LIU et al., 2016) e na produção de cosméticos (BOGDANOV, 2004).

Os registros coloniais já indicavam que a cera de Meliponini tinha vários usos cosméticos e na fabricação de instrumentos para os povos originários do Brasil (SCHWARZ, 1945). Assim como para as civilizações antigas da América Central, a cera de abelhas sem ferrão era essencial na produção de moldes de moedas e objetos de ouro (SCHWARZ, 1945). Atualmente, os produtores comentam que as própolis de *Scaptotrigona* usadas nesse estudo produzem sabonetes e hidratantes de melhor qualidade, possivelmente devido ao alto teor de ceras desse material.

Essa composição diferenciada, aliada ao interesse crescente no desenvolvimento de medicamentos e cosméticos com base em própolis (SANTANA et al., 2012), faz o uso de própolis de *Scaptotrigona* uma matéria-prima de grande potencial.

As própolis de Meliponini mudam muito no seu aspecto geral, variando de um produto amarelo ao amarelado extremo escuro (SCHWARZ, 1945; ALVAREZ et al., 2021). Durante o processamento, grande parte dos extratos apresentavam cor clara, assim como observado por Woisky e Salatino (WOISKY; SALATINO, 1998), para amostras de própolis de *Apis*. De modo que um maior conteúdo de ceras leva a uma maior turbidez do extrato quando resfriado, esse mesmo efeito pôde ser obtido para as amostras de própolis trabalhadas.

Historicamente, durante a colonização, houve uma tentativa de utilizar a cera de abelhas sem ferrão na fabricação de velas (SCHWARZ, 1945). As ceras alvas ou amareladas eram mais apreciadas, principalmente para os usos eclesiásticos (SCHWARZ, 1945). Nesse período também se observou que a quantidade de materiais adicionados à cera também era uma variante entre as colmeias (SCHWARZ, 1945). Esse fato também foi evidenciado pelos dados deste estudo (Fig. 7). As quantidades de ceras obtidas para as própolis variaram entre as regiões de coleta e as espécies, apresentando também diferentes características macroscópicas.

Pela legislação, o conteúdo de ceras não deve superar 25 % da massa (BRASIL, 2000, 2001). Os valores encontrados foram de altas porcentagens de cera para as própolis de *Scaptotrigona* (entre 66,55 e 23,58 %), enquanto para *Melipona* houve uma baixa inclusão de ceras, compondo de 4,42 a 0,12 % de suas própolis (Fig. 7). A proporção estabelecida é muito discrepante dos dados encontrados para *Scaptotrigona*. Já para *Melipona*, pelas informações obtidas, o parâmetro parece adequado. É

importante salientar que esse panorama se opõe ao observado anteriormente para as cinzas (Fig. 3).

Desse modo, talvez sejam necessárias readequações dos parâmetros de acordo com alguns grupos de Meliponini, levando-se em consideração que podem ser obtidas alterações substanciais das proporções de cera obtidas entre gêneros da tribo. Essas variações essas podem estar associadas principalmente com a grande diversidade que o grupo apresenta (FERREIRA et al., 2017b).

A produção de cera envolve também um custo energético (LIRA, 2011). Mesmo que a quantidade necessária ainda seja discutida (LIRA, 2011), a estimativa geralmente é de que para a produção de uma determinada massa de cera, o valor de mel consumido pelas abelhas seja de 3 a 8 vezes maior (BOGDANOV, 2004). Tendo em vista o gasto energético requerido para a produção de cera, torna-se possível a reflexão a cerca de uma possível adequação evolutiva, na qual a inclusão de solo, ao invés da cera, pode ser uma adaptação das abelhas sem ferrão. Para Meliponini ainda não é bem reconhecida a quantidade de energia requerida para a coleta do solo (HRNCIR; JARAU; BARTH, 2016), entretanto possivelmente isso poderia promover alguma vantagem energética. Contudo, é necessária uma investigação apropriada.

3.5 Análise de macrocomponentes

Considerando os parâmetros analisados: teor de umidade (3.1), teor de ceras (3.4), teor de cinzas (3.2) e a porção de massa não identificada pelas três metodologias empregadas, que será denominada como “outros componentes”. Foi então realizada uma análise dos macrocomponentes das amostras em estudo.

A primeira abordagem se deu por meio da análise de agrupamento utilizando-se o método de Ward corrigido. A construção recupera a separação entre os dois gêneros trabalhados (Fig. 8). Nesta análise estão incluídos os valores de composição adotados pela legislação (Figura 8–*Apis*) (BRASIL, 2000). É importante notar que a partir desses parâmetros, foi obtida uma maior similaridade dos aspectos composicionais das própolis provenientes do gênero *Scaptotrigona* com os parâmetros da própolis do gênero *Apis* (Fig. 8).

Já foi documentado que o mel desses gêneros também apresentam características distintas, com análises multivariadas recuperando a separação desses dois

gêneros por aspectos de composição (ÁVILA et al., 2019a). Do mesmo modo, os dados aqui apresentados também indicam que o cenário obtido para o mel ocorre para a própolis (DE OLIVEIRA et al., 2018). Mostrando que *Scaptotrigona* e *Melipona* são extremamente divergentes na composição de seus produtos.

Com reação à origem, são formados maiores agrupamentos de amostras vindas de um mesmo produtor, enfatizando a proximidade que amostras regionais podem apresentar (Fig. 8). As amostras das mesmas espécies de *S. bipunctata* e *S. xanthotricha* ficaram mais agrupadas com relação ao Meliponário de origem do que com relação à espécie. O mesmo se observa para os dois agrupamentos de *M. quadrifasciata*, em que as amostras do produtor B e O apresentaram aspectos da composição geral mais similares em vez de um agrupamento pela espécie.

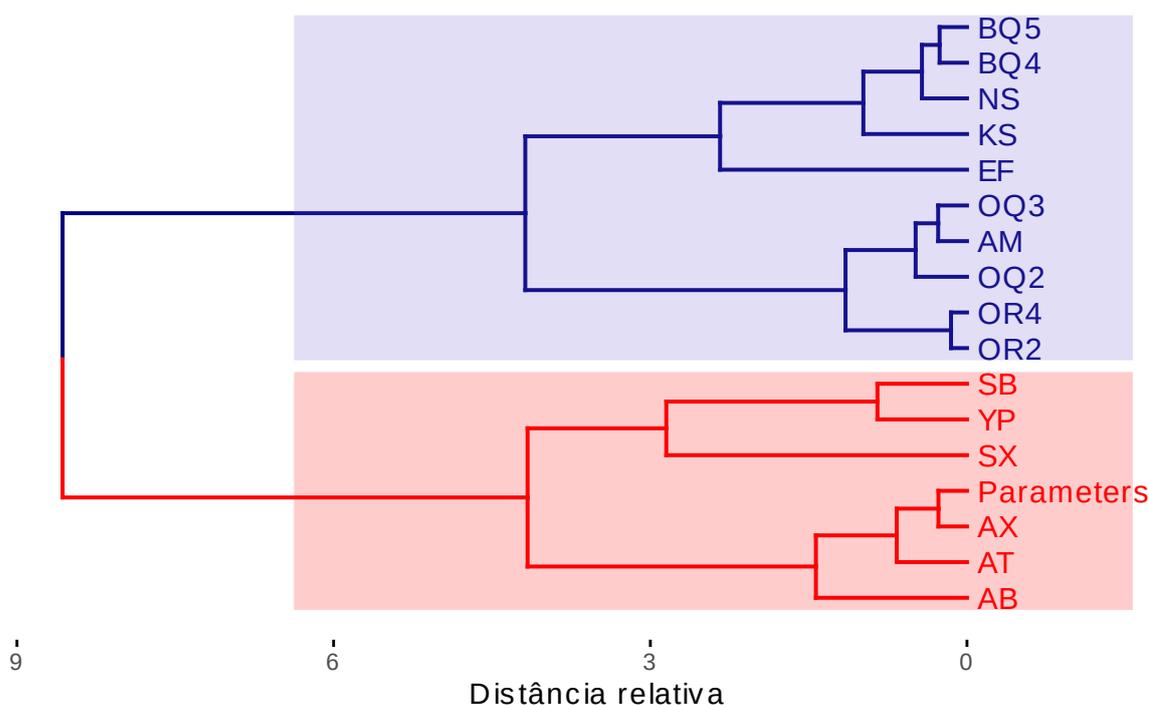


Figura 8: Dendrograma obtido para a análise geral da composição da própolis de abelhas sem ferrão, utilizando a distância euclidiana e o método de Ward. O terminal *parameters* foi incluído a partir dos valores de constituição indicados na instrução normativa do Ministério da agricultura para própolis de 2001 (BRASIL, 2000). As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Assim, os aspectos regionais também demonstraram influenciar a composição geral que as amostras apresentaram. Outros estudos já haviam mencionado que

existem variações substanciais da composição da própolis de acordo com a localidade em que é produzida (SAWAYA et al., 2009; RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013; FREIRES et al., 2016; FERREIRA et al., 2017a; BISUI; LAYEK; KARMAKAR, 2019; OLEGÁRIO et al., 2019). Provavelmente por existir um componente ambiental que influencie o comportamento de coleta pelas abelhas, ou mesmo pela disponibilização de materiais muito similares para a composição de suas própolis.

Entretanto, ainda não são reconhecidos quais aspectos regionais são mais fortemente influenciadores da composição geral das própolis. Alguns autores mencionam a diferença no conjunto da vegetação local (FERREIRA et al., 2017a; ZABAI-OU et al., 2017), como grande fator de influência para produtos como o mel (ÁVILA et al., 2019b). O comportamento de coleta do solo, dos produtos vegetais, ou o que leva à adição de maiores proporções de cera pelas abelhas ainda está para ser adequadamente esclarecido (CHAM et al., 2019).

Os fatores ambientais que se relacionam com a modificação dos teores de solo e de material de origem vegetal não é conhecido. Entretanto, os dados obtidos neste trabalho indicam que existe uma similaridade entre colmeias da mesma espécie quando provenientes de um mesmo produtor. Contudo, ao se comparar amostras da mesma espécie coletadas em outras regiões, a similaridade não é tão grande (Fig. 8). Isso, corrobora a ideia de que as abelhas coletam os materiais disponíveis das regiões onde habitam.

Quando o conjunto de dados é submetido a uma análise de componentes principais (PCA), novamente ocorre a separação dos gêneros estudados. Permitindo identificar quais fatores são responsáveis pela dispersão encontrada (Fig. 9).

É possível observar que o solo é mais predominante nas amostras provenientes das espécies de *Melipona*, como já ressaltado na análise do teor de cinzas (3.2), enquanto a cera é mais preponderante para representar a diversidade de amostras de *Scaptotrigona*. Na análise também observamos uma associação quase que completamente inversa entre o vetor de ceras e o vetor de cinzas, indicando a oposição desses fatores, de modo que uma maior presença de cera está associada com baixo índice de cinzas, e vice-versa.

O teor de cinzas e a cera são os componentes com respectivos valores próximos nos gêneros *Scaptotrigona* e *Melipona* (Fig. 9). A baixa contribuição significa

que há muitos valores similares entre as amostras (Fig. 9). Pode-se notar que há uma grande concentração das amostras de *Scaptotrigona* provenientes do produtor A (AB, AT, AX), principalmente determinado pelo teor de ceras.

Contudo, o teor de umidade, obtido para as amostras que foram coletadas durante o período chuvoso, como comentado no item 3.1, por isso, apresentaram um maior agrupamento no quadrante superior direito (Fig. 9).

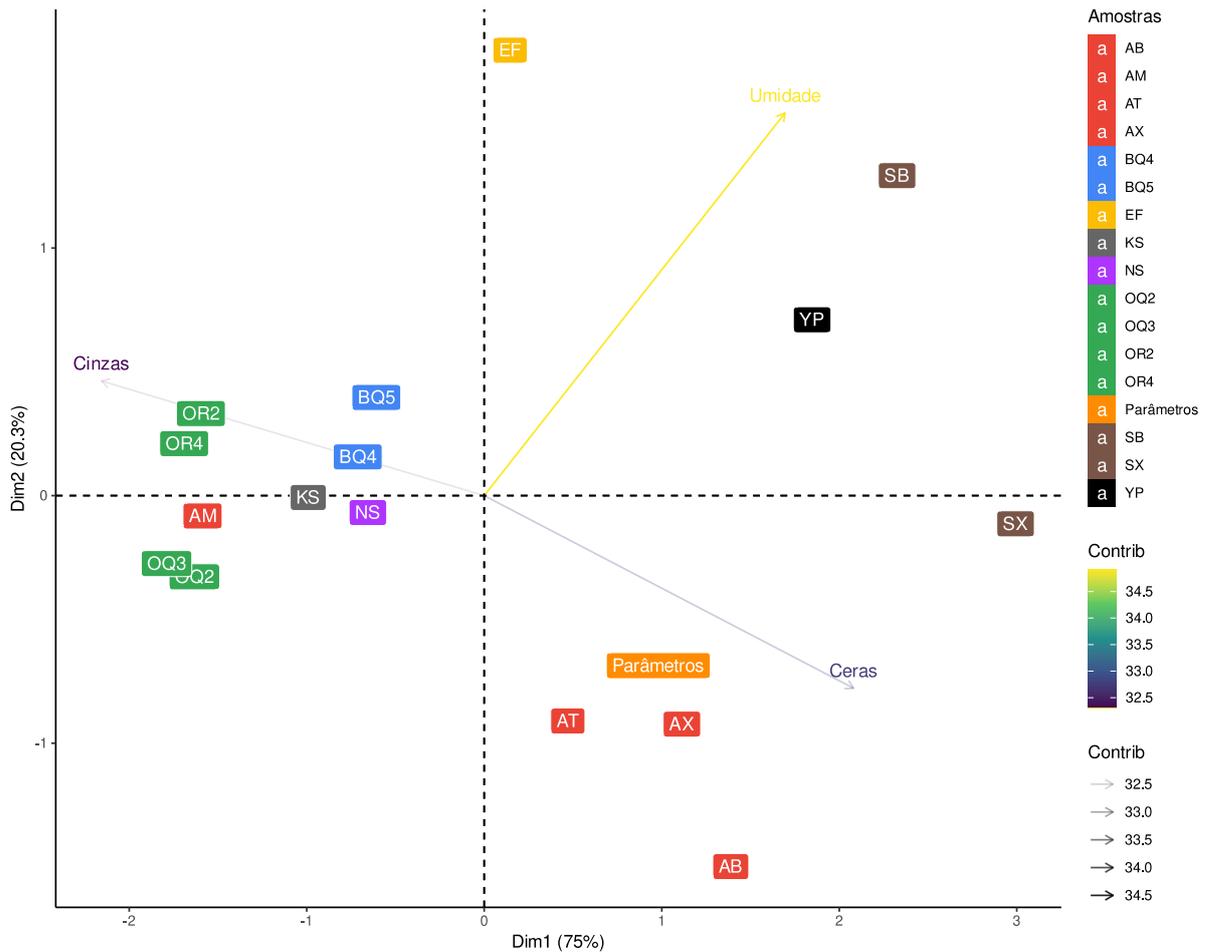


Figura 9: Diagrama de dispersão da análise de componentes principais (PCA) obtida para as amostras de própolis de Meliponini das espécies trabalhadas neste estudo, baseado nos parâmetros estipulados para a comercialização de própolis do gênero *Apis*. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

É importante também notar que ao ser incluído os parâmetros de composição que são esperados para amostras de *Apis*, segundo a regulamentação brasileira (Fig. 9 – Parâmetros), as amostras mais próximas a essa composição são as de *Scap-*

totrigona provenientes do produtor A. Entretanto, mesmo para esse caso, ainda há a incompatibilidade do teor de ceras (Fig. 7) para a sua regulamentação. Ainda assim, quando comparada à composição geral das amostras obtidas para *Melipona* observa-se uma maior discrepância do que é exigido pela regulamentação para sua comercialização.

Nesta representação também é obtida uma aproximação para as amostras provenientes de um mesmo produtor, quando se compara com as amostras de uma mesma espécie. Todavia, para o produtor A, a amostra de *M. marginata* (Fig. 9 – AM) se aproximou mais das outras amostras de *Melipona* (Fig. 9 – OQ2, OQ3, OR2, OR4, BQ4, BQ5, NS, KS) do que das amostras de *Scaptotrigona* (Fig. 9 – 2 a 4) vindas do mesmo Meliponário, indicando que mesmo quando presentes em uma mesma região, o gênero é ainda mais determinante, do que a região de origem.

Tendo em vista as grandes variações obtidas entre as amostras de cada um dos gêneros, foi reelaborada uma análise de componentes principais (PCA), se concentrando nas amostras de um mesmo gênero. Essa abordagem propiciou uma melhor observação dos fatores mais e menos determinantes de sua composição.

Para *Scaptotrigona*, observa-se uma baixa contribuição do conteúdo de cinzas (Fig. 10). Indicando que para essas, a presença de minerais varia pouco entre as espécies estudadas. Revisitando os dados de conteúdo de cinzas (2.4), nota-se que realmente existe um conteúdo muito baixo para a maioria das amostras desse gênero, um resultado similar ao encontrado para *Nannotrigona testaceicornis* e *Frieseomelita varia*, também pertencentes a Meliponini (FREITAS; VIT; BARTH, 2014).

Portanto, neste trabalho, não foram encontradas evidências de que as amostras trabalhadas do gênero *Scaptotrigona* incluíam solo na composição de suas própolis, com exceção de *S. tubiba*, amostra esta que inclusive se apresentou de maneira isolada das outras do estudo, estando presente no quadrante com maior influência do teor de cinzas (Fig. 10).

O que é extremamente valioso nesta abordagem de análise é a possibilidade em inferir formas de relação entre as variáveis estudadas. Para o gênero *Scaptotrigona* observamos uma relação quase oposta do teor de umidade com o conteúdo de cinzas, enquanto a presença de cera se opõe ao teor de material não identificado (Fig. 10-Outros.componentes). As proporções de cera e o teor de cinzas relatados

para o gênero *Trigona* (também pertencente a Meliponini) é compatível com os valores aqui observados para *Scaptotrigona* (MULYATI et al., 2021).

A análise de componentes principais dos valores obtidos para *Scaptotrigona* (Fig. 11) demonstra uma maior contribuição entre a variação dos dados provenientes da proporção de cera, e de componentes não identificados com as metodologias adotadas. Já é documentada uma tendência na composição da própolis de *Apis mellifera*, da associação entre uma maior proporção de cera e uma menor proporção de compostos fenólicos e flavanonas (RIGHI, 2008; SILVA, 2008) O motivo indicado pelos autores é de que uma maior inclusão de cera levaria a uma redução da quantidade de material de origem vegetal, e por esse motivo haveria uma correlação negativa entre o teor daquele componente e o de fenóis totais e flavanonas.

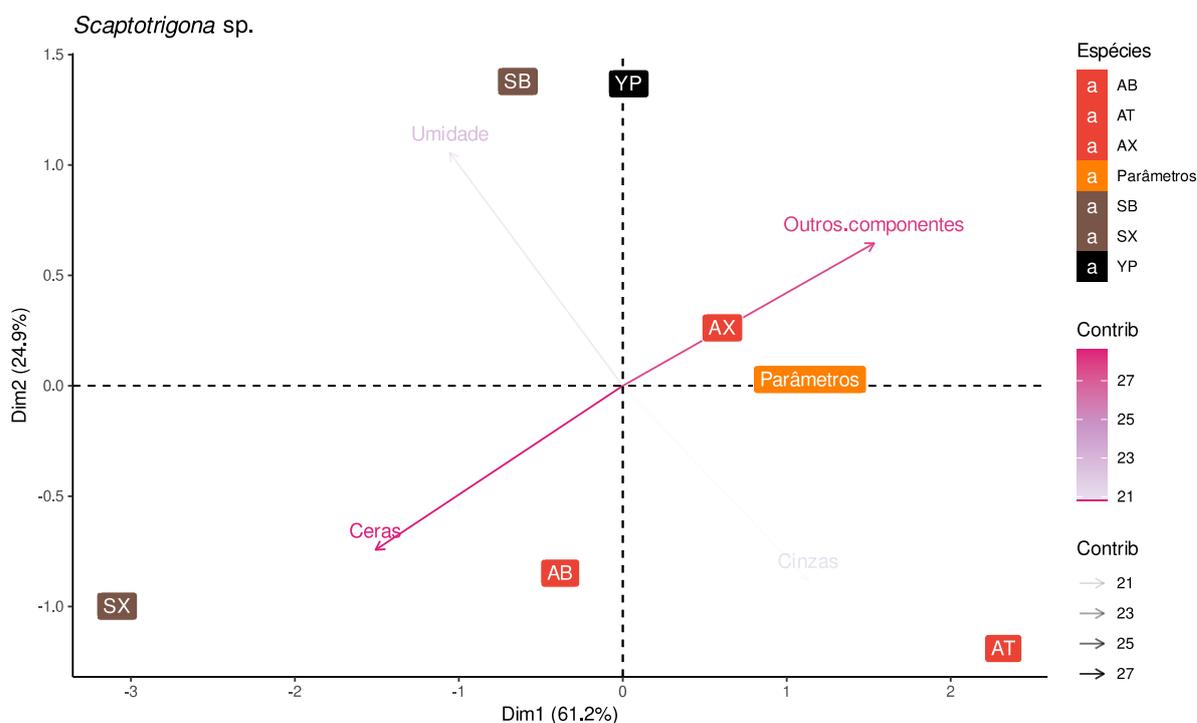


Figura 10: Diagrama de dispersão da análise de componentes principais (PCA) obtida somente com os valores das amostras de própolis do gênero *Scaptotrigona*. O gradiente de coloração dos vetores representa a contribuição para as variações das amostras. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

No presente estudo, foi encontrada uma relação oposta entre a adição de cera, e a presença de outros componentes em *Scaptotrigona*, o que corrobora as informações usualmente apresentadas para a própolis de *Apis*. Desse modo, há

mais uma evidência da grande semelhança entre a composição da própolis provenientes de *Scaptotrigona*, e *Apis*.

A análise de componentes principais obtida somente para *Melipona* (Fig. 11) indica uma maior importância do vetor de cinzas na composição do conjunto. Além de uma grande proximidade de amostras vindas de uma mesma região (Fig. 11), de modo que *M. mondury* (OR2 e OR4) e *M. quadrifasciata* (OQ2 e OQ3) do produtor O ficaram mais próximas nos aspectos gerais de composição.

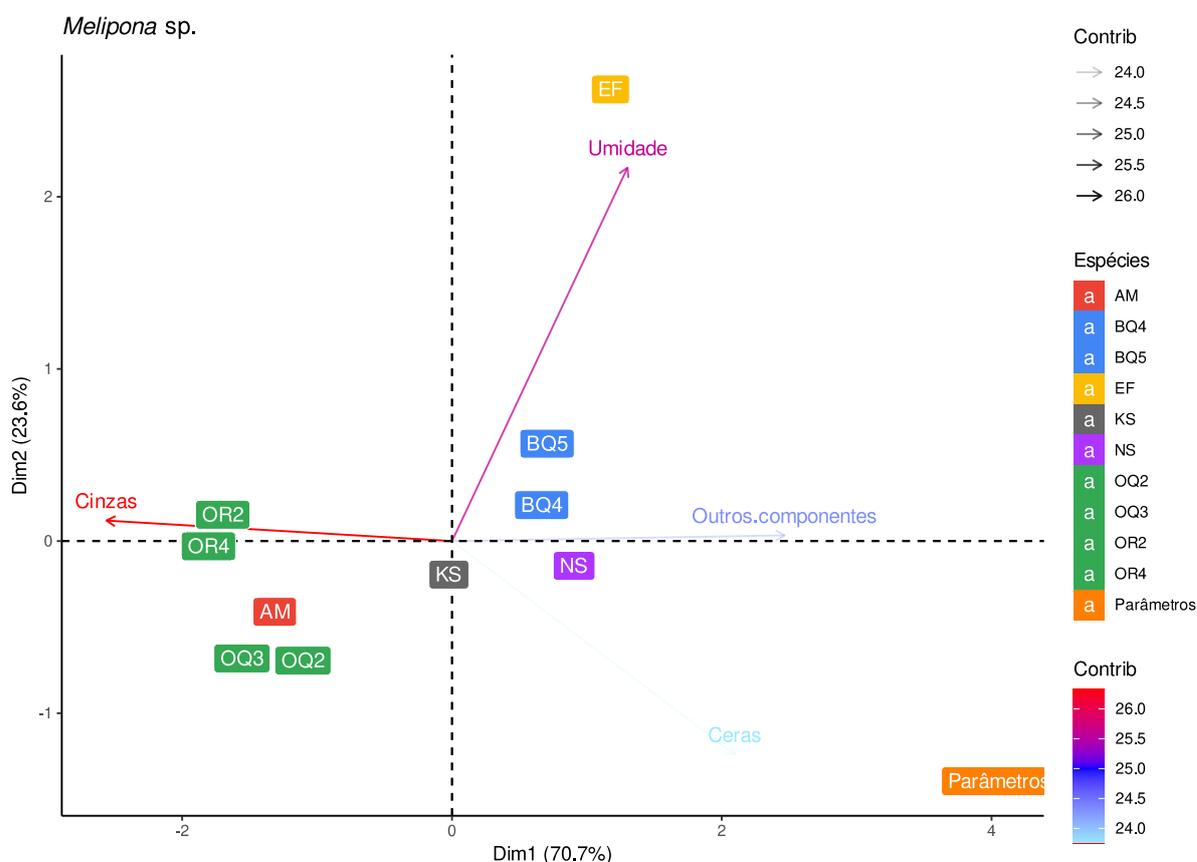


Figura 11: Diagrama de dispersão da análise de componentes principais (PCA) obtida somente com os valores das amostras de própolis do gênero *Melipona*. O gradiente dos vetores representa a contribuição para as variações das amostras. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

A distribuição dos vetores difere do padrão observado para *Scaptotrigona* (Fig. 10), tendo em vista que para o gênero *Melipona* o vetor que se opõe a presença

de outros componentes (material não identificado) é o teor de cinzas (Fig. 11), e não o de ceras, como visto anteriormente, reforçando a oposição desses componentes.

É possível observar também, a redução da importância do vetor de ceras, indicando a pouca influência na composição das amostras de *Melipona* e que a proporção de cinzas passa a apresentar uma contribuição muito grande para as diferenças observadas entre as amostras. Essa nova informação entra em conflito com o que é indicado por outros autores de que a presença de solo seria uma forma de criar um material ainda mais resistente, no qual as abelhas também acrescentam maiores proporções de resinas vegetais (GRÜETER, 2020). Os dados obtidos neste trabalho apontam para que as espécies que realizam a inclusão de solo, reduzem a proporção de cera que é incluída no material, e que maiores teores de solo, estão associados a menor inclusão de outros componentes (Fig. 11).

Com a representação de todos os componentes em barras empilhadas (Fig. 12), é possível notar como a composição é consistentemente diferente entre *Scaptotrigona*, e *Melipona* (Fig. 12) principalmente com a proporção que a cera ocupa no primeiro e o solo no segundo. Também é possível reparar como a presença de água é extremamente variante entre as amostras.

A figura 12 evidencia a grande diferença entre os componentes de cada uma das amostras, tendo em vista que o agrupamento de *Scaptotrigona* apresentam grande predominância de ceras e de outros componentes, como apresentado também pela figura 9. Em oposição, estão as amostras provenientes de *Melipona*, que possuem grande predominância de sua massa com material mineral, e menor presença de outros componentes, assim como de água, e de ceras de modo geral.

Existe um impasse associado ao restrito conhecimento da composição das própolis não oriundas do gênero *Apis*, ainda que a própolis de abelhas sem ferrão apresentem grande importância alimentar, medicinal, cultural e comercial para diferentes populações (BARBIERI JUNIOR, 2018; DE CAMARGO; DE OLIVEIRA; BERTO, 2017). A dificuldade em certificar e atestar a qualidade desse produto é uma das principais barreiras de inserção desse produto no mercado (ARAÚJO, 2013). Principalmente por não ser possível estabelecer requisitos mínimos de qualidade para comercialização (CALABRESE; FERRANTI, 2019). Isso pode ser responsável pelo panorama atual do Estado de São Paulo, no qual a atividade comercial dos produtos de Meliponini é extremamente restrita, e principalmente concentrada entre os pro-

dutores (BARBIERI JUNIOR, 2018), além do progressivo desaparecimento da meliponicultura em algumas regiões do mundo, mesmo em locais onde era uma atividade tradicional (CARRECK, 2011).

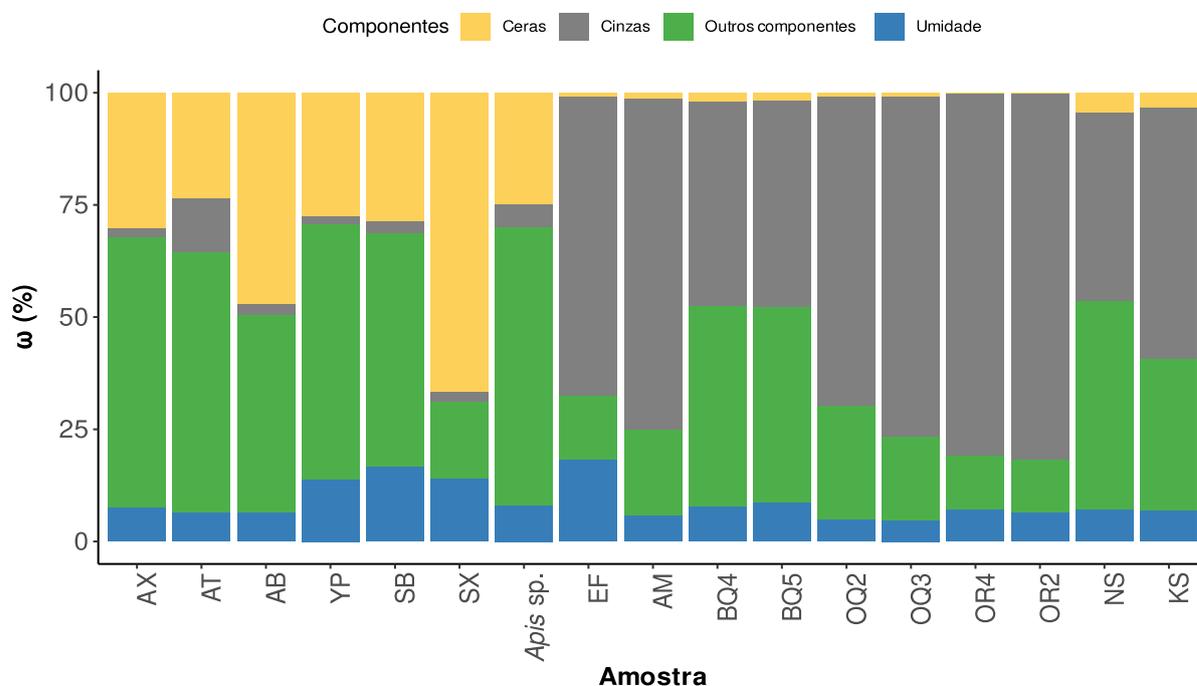


Figura 12: Barras empilhadas da fração mássica dos macrocomponentes preponderantes das amostras de abelhas sem ferrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Dessa maneira, esse estudo almejou contribuir para o reconhecimento de aspectos básicos da composição da própolis de abelhas sem ferrão, apresentando como avanço, a descoberta de que a inclusão de solo é restrita a algumas espécies. Desse modo, não é possível afirmar que todas as própolis de Meliponini devem receber a denominação de geoprópolis, pois existem abelhas que não incorporam esse componente em suas própolis. Portanto, devem ser denominadas de geoprópolis, os produtos que incluem efetivamente material de origem edáfica em sua composição (NOGUEIRA NETO, 1953). O que vem sendo mais abertamente discutido na literatura (FREITAS; VIT; BARTH, 2014; PEREIRA; SALATINO; SALATINO, 2020).

3.6 Solubilidade em etanol

O conteúdo solúvel em etanol é um dos parâmetros de análise exigido pelo ministério da agricultura para a comercialização da própolis (BRASIL, 2000, 2001). Esse parâmetro é muito utilizado tendo em vista que a tintura etanólica de própolis é uma das formas mais comuns de comercialização. Principalmente pela dificuldade de sua aplicação direta em produtos alimentares (LIAUDANSKAS et al., 2021). Sendo o extrato a principal forma de comercialização, quanto mais solúvel em etanol é a própolis, mais vantajosa é a matéria-prima.

O padrão mínimo exigido pela legislação é que 35 % da massa de própolis seja solúvel em etanol. Em grande parte dos extratos estudados neste trabalho, esse valor não é atingido (Fig. 13). A massa de própolis solúvel em etanol variou entre os dois gêneros estudados. Apenas seis espécies (três de *Melipona* e três de *Scaptotrigona*) apresentaram valores acima de 35 %. A maior porcentagem correspondeu a *M. subnitida* (NS-46,37%) e a menor a *S. tubiba* (AT-35,03%) (Fig. 13). *M. flavolineata* (EF), e as duas amostras de *M. mondury* (OR2 e OR4), quase não apresentam solubilidade em etanol, provavelmente por apresentarem altos teores de cinzas e umidade, além de baixos teores de componentes solúveis em etanol (Fig. 13).

Em especial para as amostras com maior conteúdo de solo (Fig. 3), há uma menor solubilidade em etanol. Resultado esperado, tendo em vista os altos valores que o solo e as ceras representam na massa das amostras, e serem componentes de baixa solubilidade neste solvente. Contudo, não foi encontrada uma relação tão clara da solubilidade com o gênero. Além disso, é reconhecido que o tempo, e o sistema utilizado na extração podem impactar significativamente o rendimento de tinturas (SOÓS et al., 2019), assim como o teor de cinzas pode impactar diretamente o rendimento (CUNHA et al., 2004).

A solubilidade considera a facilidade dos componentes em serem solubilizados por um solvente (FUNARI; FERRO, 2006). Ao serem comparados com os valores comumente encontrados para a própolis de *Apis*, os resultados para as abelhas sem ferrão são inferiores (FUNARI; FERRO, 2006; MATSUDA, 2006). Como a padronização foi baseada somente na composição da própolis de *Apis*, torna-se evidente que foram desconsideradas as especificidades de composição das própolis das espécies de *Melipona* e *Scaptotrigona*, gêneros estudados neste trabalho.

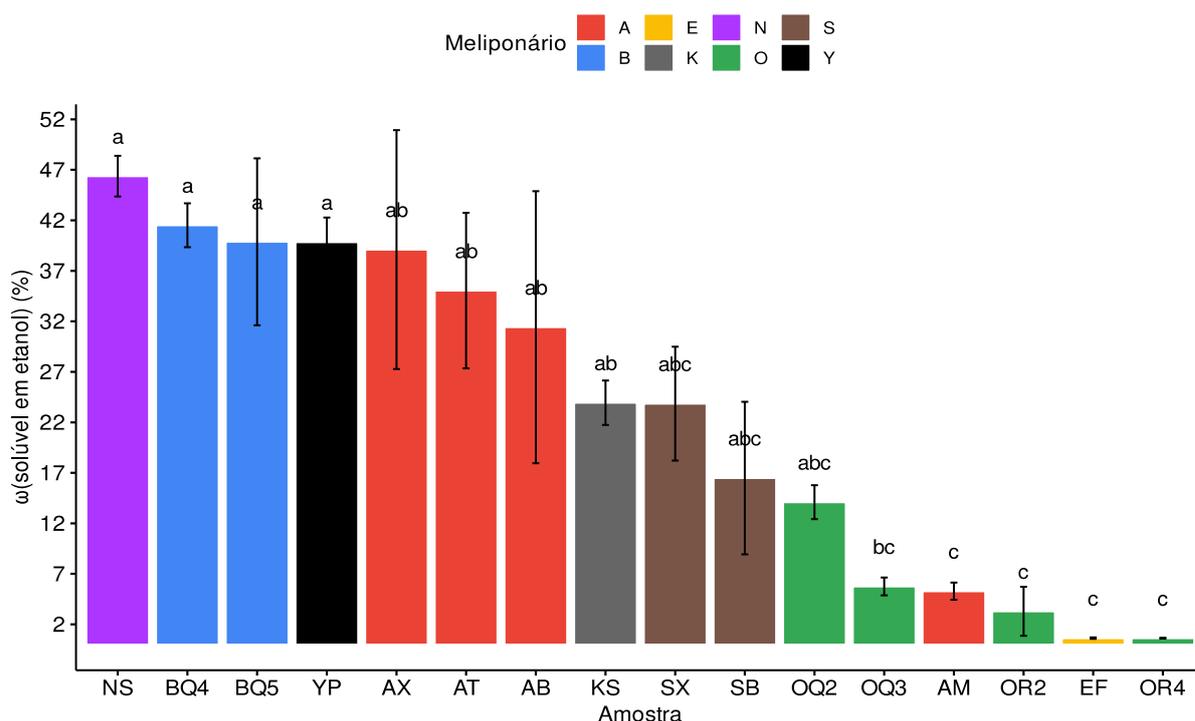


Figura 13: Solubilidade em etanol em porcentagem em massa das amostras de própolis dos gêneros *Melipona* e *Scaptotrigona*. Barras com as mesmas letras não diferem estatisticamente adotando $\alpha \leq 5\%$. As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Visando compreender quais compostos podem influenciar a porcentagem de solubilização da própolis em etanol, é possível observar que possivelmente há uma interferência negativa entre o conteúdo de solo e a porcentagem solúvel em etanol para as amostras (Fig. 14). Enquanto essa correlação negativa entre o conteúdo de solo e a massa solúvel em etanol parece ser extremamente determinante para *Melipona* (Fig. 14-A), para *Scaptotrigona*, amostras que apresentam somente cinzas, parece haver uma relação baixa, sem evidências suficientes para classificá-las como relacionadas (Fig. 14-B). Tendo em vista a baixa relevância que o teor de cinzas teve para o gênero *Scaptotrigona*, é facilmente compreensível que não há muita interferência daquele componente sobre a variação de solubilidade em etanol. Enquanto para *Melipona*, a grande proporção da massa que o solo apresenta pode ser a responsável pela reduzida dissolução, levando-se em consideração que as cinzas desse gênero apresentaram um conteúdo variado de cristais, um material denso, altamente estável, e de baixíssima solubilidade.

Concentrando-se no caso de *Scatotrígona* ainda se observa a discrepância de composição para o ponto fornecido para *S. tubiba* (Fig. 14B–AT). Como essa foi a única amostra que apresentou solo na composição da própolis, evidenciado por seu deslocamento da nuvem de pontos encontrada para outras amostras.

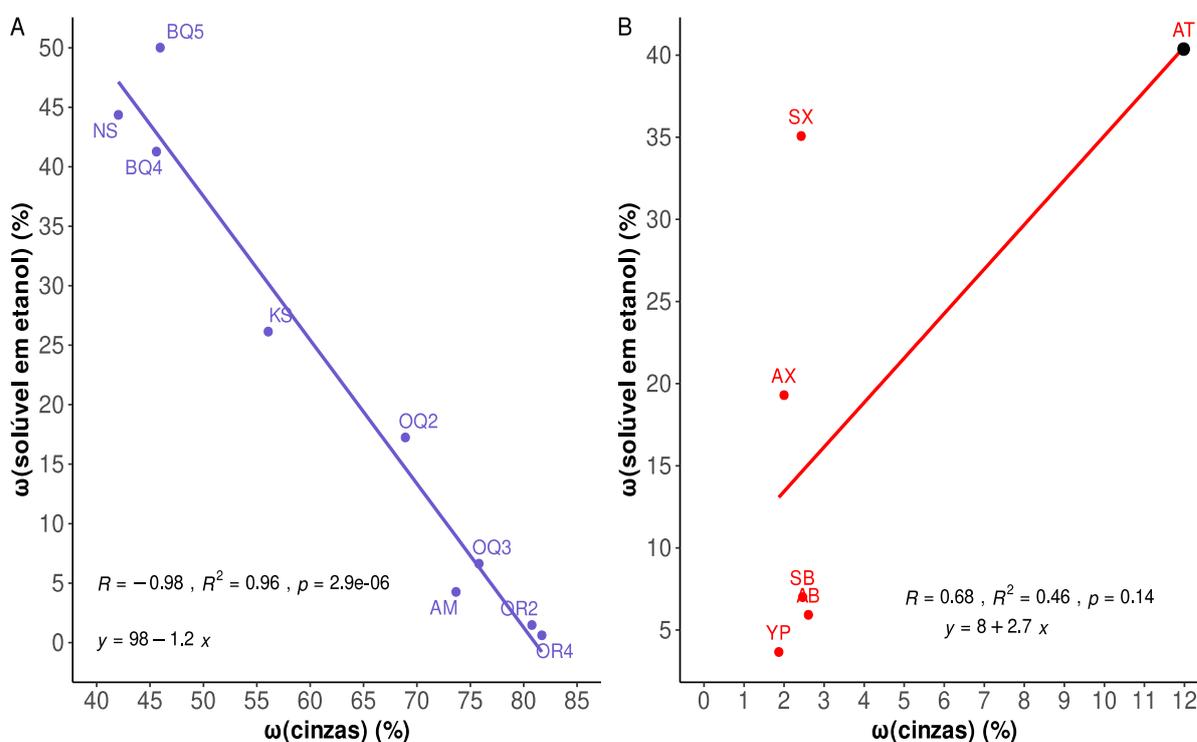


Figura 14: Gráfico de correlações lineares da porcentagem em massa solúvel em etanol em relação ao conteúdo de cinzas de própolis de abelhas nativas sem ferrão dos gêneros: *Melipona* (●) e *Scaptotrígona* (●). **A** – Correlação abordando somente as amostras de *Melipona*. **B** – Correlação abordando somente as amostras de *Scaptotrígona*. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

As própolis de uma mesma espécie, mas proveniente de uma região diferente apresentaram variações relevantes no caso de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5). Para essas amostras também foi possível observar disparidades quanto ao teor de cinzas (3.2). Desse modo, a diferença de solubilidade pode estar associada com essa variação na proporção de minerais presentes nas amostras, considerando-se a possível relação obtida entre esses dois parâmetros (Fig. 14–A).

Os melhores resultados da produção de tinturas variam entre os diversos estudos, dependendo também do destino para o qual a produção dos extratos ou tin-

turas está voltada. Diluições de etanol/água na proporção de 70 % são as mais indicadas para a obtenção de compostos fenólicos (SUN et al., 2015), enquanto para a produção de tinturas comerciais com melhor aproveitamento do material deveriam ser utilizadas proporções entre 50 % e 80 % para uma extração mais eficiente dos componentes da própolis (SOÓS et al., 2019). Para as abelhas sem ferrão, essa ainda é uma informação desconhecida.

Para outras espécies de Meliponini, uma baixa solubilidade foi obtida, compreendendo valores entre 17 e 20 % (UMTHONG; PUTHONG; CHANCHAO, 2009), proporções intermediárias do intervalo apresentado pelas amostras neste estudo. Alguns autores ainda mencionam que as geoprópolis apresentam um intervalo de solubilização, em etanol, que vai de 0,9 a 35,5 % (FERREIRA et al., 2019), e que abrange de maneira mais próxima os valores aqui obtidos, que compreendem de 0,62 a 46,37 % de solubilização (Fig. 13 e 14). Essas variações são apontadas como resultado das mudanças de composição ao longo do ano, que se refletem na solubilidade (BUDÓIA, 2019).

3.7 Doseamento de Fenóis totais

O doseamento de fenóis totais indicou que as maiores proporções desses compostos foram obtidas para a amostra de *M. subnitida* do produtor N (NS), além das duas amostras de *Melipona quadrifasciata* provenientes de São Paulo (BQ4 e BQ5) (Fig. 15). Os valores obtidos para a maioria das outras amostras foram significativamente inferiores quando comparados a essas três.

A legislação vigente adota como mínimo a proporção de 5 % em massa da própolis constituída por compostos fenólicos (BRASIL, 2000, 2001). Ao observarmos os valores obtidos, somente essas amostras, *M. quadrifasciata* provenientes do produtor B (BQ4 e BQ5), e *M. subnitida* do produtor N (NS), apresentaram os valores em acordo com o exigido pela instrução normativa (Fig. 15).

Os valores obtidos para essas amostras foram similares aos valores previamente documentados para outras espécies de abelhas sem ferrão (entre 1,5 e 28 %), como *Tetragonula biroi*, *Heterotrigona itama*, e *Tetragonula laeviceps* (FIKRI et al., 2019).

Um alto conteúdo de compostos fenólicos para própolis de *M. quadrifasciata* proveniente da região sul de minas já foi obtido (RUBINHO et al., 2019), correspondendo a valores superiores ao observado para outros membros do mesmo gênero (DA SILVA et al., 2013). Outros autores obtiveram que o teor de compostos fenólicos para *M. quadrifasciata* é baixo (1,1 %) quando comparado com os de *M. marginata* (29 %) (DE LIMA, 2015). No presente estudo as amostras de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5) diferiram quanto ao teor de compostos fenólicos segundo a origem. Apresentando teores entre 14,84 e 19,85 % para as amostras de São Paulo (B), enquanto as amostras de Cotia (O) apresentaram entre 1,12 e 3,22 %. Todavia, em nenhuma das amostras dessa espécie, o teor de fenólicos foi significativamente menor do que o encontrado para *M. marginata* (AM), que apresentou 0,61 %.

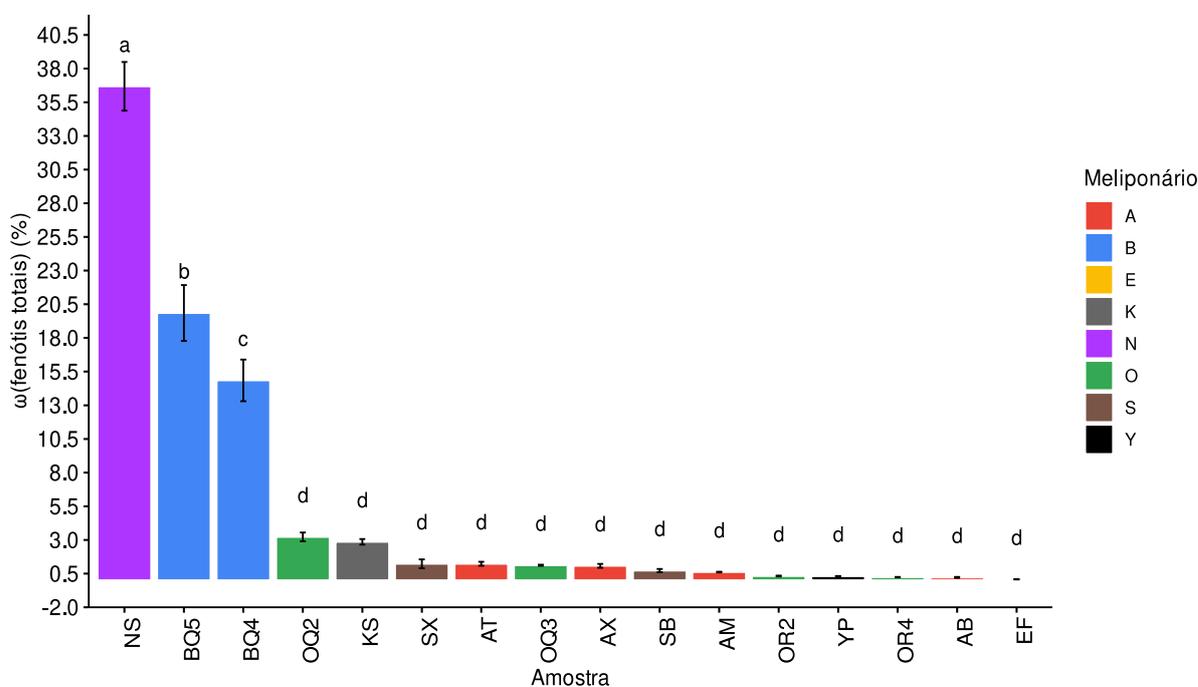


Figura 15: Porcentagem em massa de compostos fenólicos. As barras estão preenchidas de acordo com o Meliponário de origem. Os valores com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey adotando nível de significância de 5% ($\alpha \leq 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

M. mondury (OR2 e OR4), *M. flavolineata* (EF), *S. postica* (YP) e *S. bipunctata* (AB) foram as espécies que apresentaram menores teores de fenóis totais. Era de se

esperar que as duas primeiras espécies não apresentassem teor substancial de fenólicos, pois seus teores de cinzas e umidade foram muito altos. Entretanto, *S. postica* (YP) e *S. bipunctata* (AB) mostraram altos teores de outros componentes, além de cera, na constituição de suas própolis (Fig. 12).

Os dados obtidos em outros trabalhos já documentam que as geoprópolis de *M. quadrifasciata* e *M. marginata* não se adequam ao requerido pela legislação (DE LIMA, 2015). Assim como proposto por esse autor, nossos dados também sugerem ser necessário revisar ou adaptar os parâmetros aos produtos das abelhas sem ferrão. Com as informações do presente trabalho também são obtidas evidências de que os parâmetros propostos pela instrução normativa (BRASIL, 2001) que regula a qualidade da própolis não correspondem à composição típica das própolis de Meliponini.

É comum correlacionar a proporção de cera com a de fenóis totais (SILVA, 2008), visando entender como esses indicadores podem variar conjuntamente. Portanto, foi realizada uma análise de correlação desses dois parâmetros (Fig. 16).

De maneira geral é esperado uma correlação negativa entre a proporção de cera e o teor de substâncias fenólicas, considerando o teor de compostos fenólicos está associado com a adição de material vegetal. Assim, uma maior inclusão de cera se traduz em uma menor proporção de material de origem vegetal e consequentemente, menor teor de fenóis (RIGHI, 2008).

Entretanto, não observamos uma correlação consistente entre esses dois fatores (Fig. 16). Foram obtidos valores baixos do coeficiente de determinação (R^2). Desse modo, é possível que a influência apresentada por outros constituintes, aliada à interferência de outros fatores, não foram obtidas evidências que o teor de fenólicos e proporção de cera, apresentem uma associação forte (Fig. 16—A). Com o resultado observado pela PCA (Fig. 9), também é possível depreender que houve grande variação entre todos os macrocomponentes dessas amostras, e considerando os contextos de cada uma, esses fatores poderiam ser responsáveis pelo valor baixo de R^2 .

A diferença encontrada na predominância de solo ou de ceras também podem ser responsáveis pelo padrão encontrado. Em *Melipona* (Fig. 16—C) a relação entre as variáveis se deu de maneira positiva, indicando que uma maior proporção

de cera poderia se associar a um maior teor de fenólicos. Entretanto, para este gênero a presença de solo foi um parâmetro mais determinante. Assim, a ligeira relação positiva entre o teor de fenólicos e a quantidade de cera pode ter se dado por um maior conteúdo de cera estar associado com amostras com menor inclusão de solo, e assim, maior teor de resinas vegetais. Como observado para as amostras de *M. subnitida* (NS e KS) e *M. quadrifasciata* de São Paulo (BQ4 e BQ5) (Fig. 12).

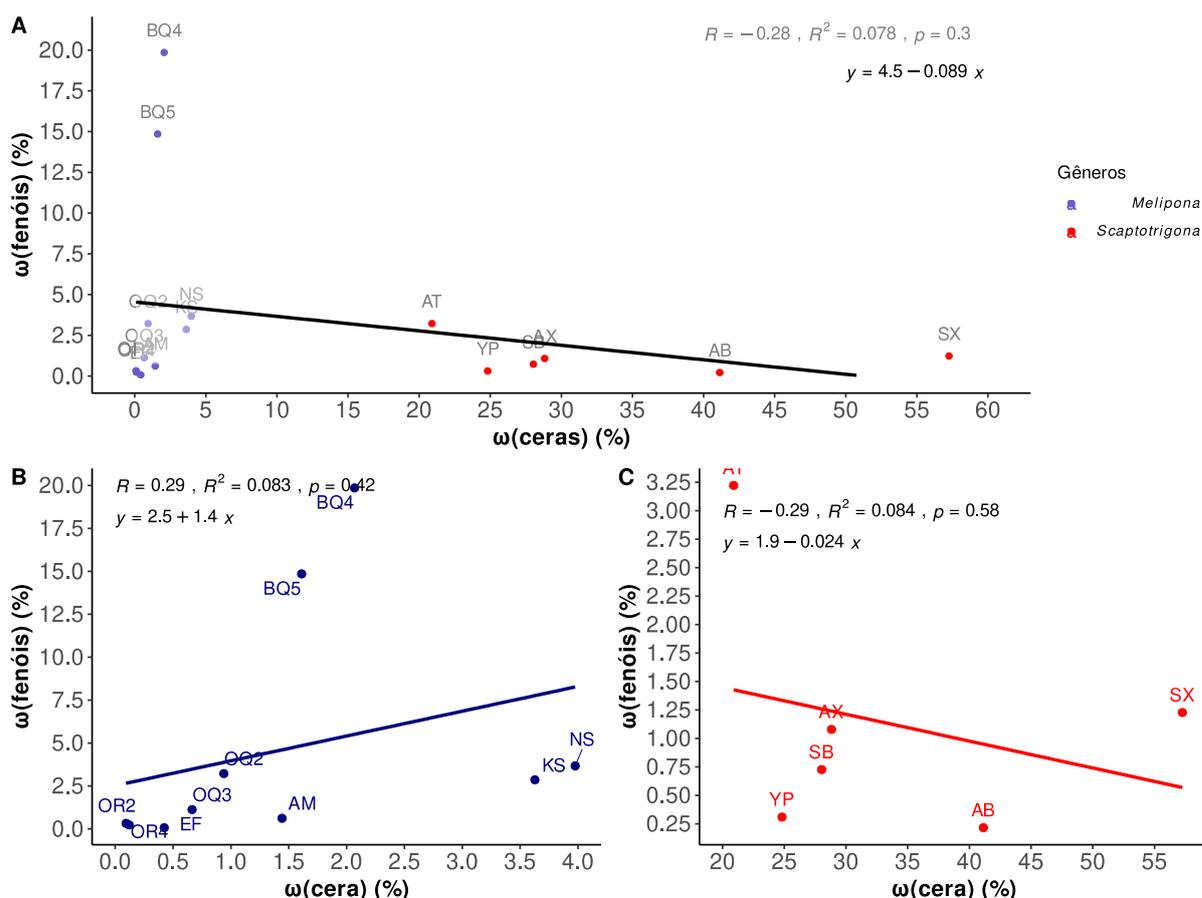


Figura 16: Gráfico de correlações lineares da porcentagem em massa de fenóis totais e massa de cera de própolis de abelhas nativas sem ferrão dos gêneros: *Melipona* (●) e *Scaptotrigona* (●). **A** – Dispersão de todas as amostras em estudo. **B** – Dispersão das amostras de *Melipona*. **C** – Dispersão das amostras de *Scaptotrigona*. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Para *Scaptotrigona* (Fig. 16–B), o solo apresenta pouca influência sobre os componentes, e a relação previamente encontrada na literatura, de que o teor de ceras e substâncias fenólicas são variáveis negativamente relacionadas (RIGHI,

2008; SILVA, 2008), é ligeiramente recuperada, devido ao fato desse grupo ter a cera como um fator mais determinante na composição. Mesmo assim, não há um padrão claro e bem representado pelo modelo linear que é proposto, indicando relações mais complexas entre esses componentes.

3.8 Doseamento de Flavonoides

A partir da metodologia que utiliza somente o cloreto de alumínio obteve-se uma maior proporção de flavonoides para as amostras de *S. bipunctata* de Jacuí (SB), seguida as amostras de *M. subnitida* (NS e KS), *M. flavolinetata* (EF) (Fig. 17). Amostras que apresentaram respectivamente 0,53, 0,39, 0,23 e 0,36 % de flavonoides.

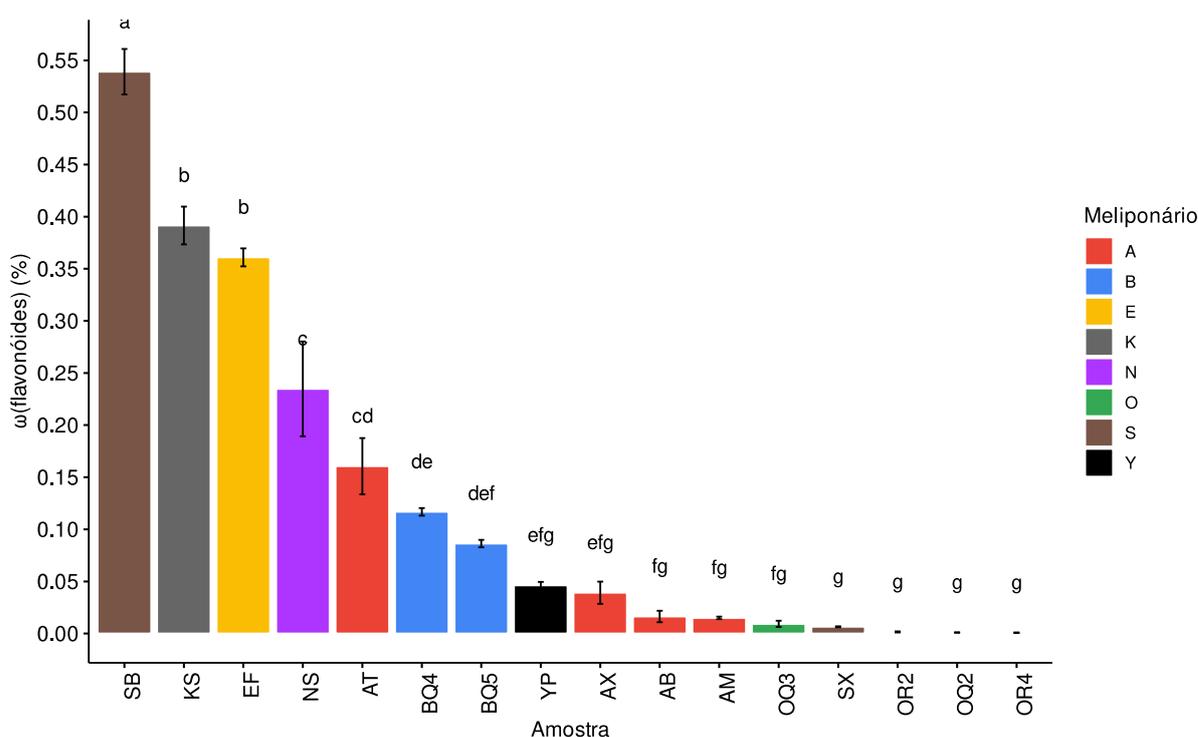


Figura 17: Porcentagem da massa seca de flavonoides pela metodologia que utiliza somente cloreto de alumínio. As barras estão preenchidas de acordo com o Meliponário de origem. Os valores com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey adotando nível de significância de 5% ($\alpha \leq 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Os valores obtidos foram bem abaixo do intervalo de 5 e 26 % que é mencionado para a própolis de *Apis* (KOSALEC et al., 2004). Com a variação apresentando grande influência da origem regional, mas nem sempre de maneira clara (FIKRI et al., 2019). Nos estudos com Meliponini, variações do teor de compostos fenólicos entre amostras também foi obtido para *M. quadrifasciata*, sendo influenciada principalmente pela origem (BUDÓIA, 2019).

Neste trabalho, é importante notar que os dados não apresentam um padrão bem definido com relação à espécie ou mesmo à origem das amostras. Principalmente para as amostras com maiores valores (Fig. 17). A metodologia utilizada sofre grande interferência dos grupos de flavonoides presentes, assim como o composto utilizado como padrão (POPOVA et al., 2004; MARCUCCI et al., 2021), podendo favorecer, ou não, o resultado de algumas amostras.

A análise da segunda metodologia também indica um teor de flavonoides maior para *M. subnitida* (NS, KS), e *M. quadrifasciata* (BQ5) com valores entre 10,21 e 2,96 % (Fig. 18). Entretanto, uma das amostras de *S. xanthotricha* (SX) passa a ter uma maior concentração (3,81 %). Ao compararmos a proporção obtida nessa metodologia, com os valores obtidos para a abordagem anterior, encontramos maiores valores (Fig. 17).

A presença de flavonoides na própolis da tribo Meliponini é extensamente mencionada (ARAÚJO et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2017b; SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017; LAVINAS et al., 2018). Tendo em vista a diversidade que as própolis podem apresentar em sua composição, além da maior seletividade que os métodos adotados apresentam, as diferenças observadas podem estar relacionadas às proporções de compostos nos quais a metodologia é mais sensível (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014). Da mesma maneira, a quantificação por essa abordagem é reconhecidamente imprecisa, mas, ainda assim, valiosa por possibilitar comparações entre amostras e/ou diferentes estudos (MARCUCCI et al., 2021).

Já foi observada uma grande e consistente atividade antioxidante das amostras de *M. subnitida* do Estado de Alagoas (DE OLIVEIRA et al., 2018). Os dados que serão apresentados oportunamente, complementarão as informações já publicadas. Nota-se a presença marcante de flavonoides na própolis nesta espécie (Fig. 18), em comparação com as outras, utilizando a mesma metodologia dos autores.

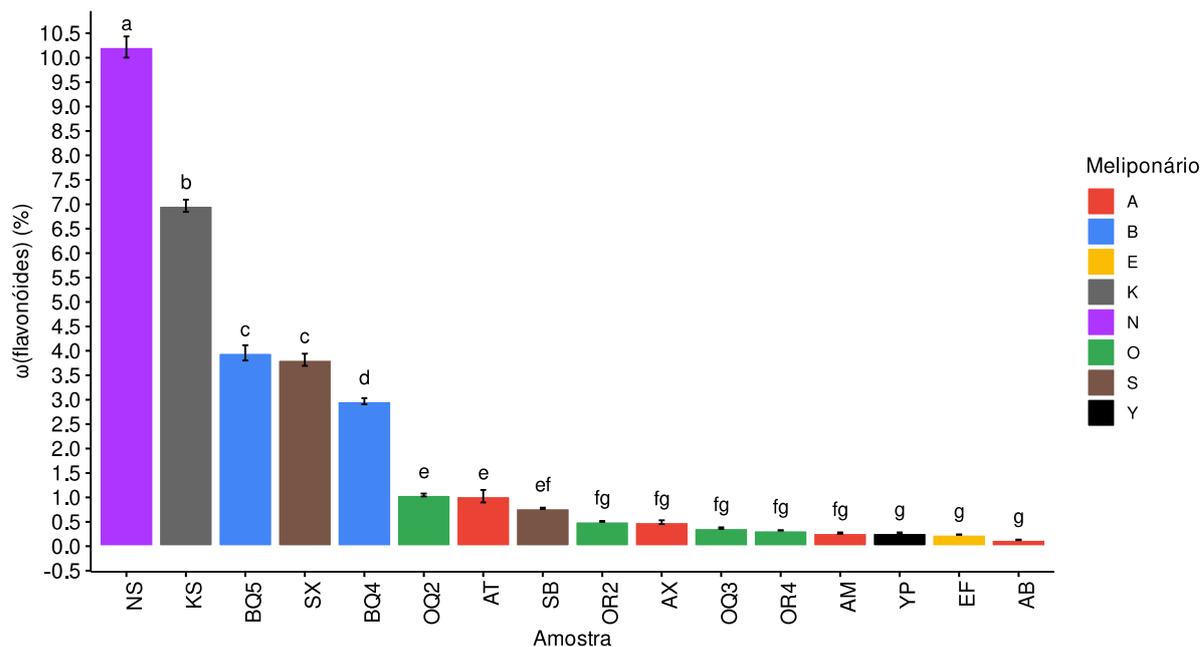


Figura 18: Porcentagem da massa seca de flavonoides pela metodologia com nitrito de sódio. As barras estão preenchidas de acordo com o Meliponário de origem. Os valores com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey adotando nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Na literatura também é indicado que possivelmente essa espécie tenha um comportamento mais especialista de coleta de material vegetal (DE OLIVEIRA et al., 2018). Entretanto, para as abelhas sem ferrão também foram observadas grandes similaridades para amostras provenientes de uma mesma região (BONAMIGO et al., 2017a). Sem o reconhecimento apropriado da flora local, de onde as amostras dos estudos foram obtidas, a similaridade encontrada pode ser devida ao material vegetal disponível na região ou a um efetivo comportamento especialista de coleta. Os dados apresentados indicam que o material de *M. subnitida* mesmo que proveniente de meliponários localizado em uma região urbana (NS) ou rural (KS), o teor de flavonoides é similar.

Os parâmetros atuais para a comercialização da própolis estabelece que sua composição deve conter um mínimo de 0,5 % em massa de flavonoides, sendo ainda classificada com teor baixo (menor de 1 %), médio (entre 1 e 2 %) e alto teor (maior que 2 %) (BRASIL, 2000, 2001). As metodologias adotadas apresentariam divergências com relação à classificação das própolis. Enquanto a primeira abordagem

resultaria na inadequação de todas as própolis estudadas (Fig. 17), a segunda resultaria nos três níveis de classificação, alto (NS, KS, BQ5, SX, e BQ4), médio (AT e OQ2) e baixo (demais amostras) (Fig. 18).

É importante ressaltar que as amostras de *Melipona* incluem solo, e mesmo assim, apresentaram um alto percentual de flavonoides. Não sendo, portanto, eventos mutuamente excludentes, nem tampouco facilmente associados, em que maiores teores de solo resultam em menores teores de flavonoides.

Devido às variadas atividades biológicas, os flavonoides são grandes candidatos como compostos-chave para identificação da qualidade da própolis. Contudo, é importante aliar as metodologias aqui adotadas ao teste com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (tópico 3.9) para melhor caracterização da composição de compostos fenólicos (CHANG et al., 2002; MARCUCCI et al., 2021), principalmente pela diferença de sensibilidade que cada uma dessas metodologias apresenta com grupos específicos de compostos fenólicos (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014).

3.9 Doseamento de Flavanonas e dihidroflavonóis

A presença de flavanonas e dihidroflavonóis se mostrou predominante para as espécies de *Melipona* (Fig. 19), em especial para *M. marginata* (AM) representando 0.38 %. Entretanto, algumas amostras desse gênero apresentaram um teor muito menor que esse. Possuindo variações até mesmo entre amostras do mesmo Meliponário. Previamente, essas variações foram documentadas para regiões próximas (POPOVA et al., 2013), mas não para a região de um mesmo produtor.

A presença de flavanonas em própolis é extensamente mencionada (ZAINULLIN et al., 2018). Alguns autores destacam que as flavanonas são conjuntos de compostos extremamente comuns nas plantas utilizadas por *Apis* (KOSALEC et al., 2004; POPOVA et al., 2009). Dessa maneira, se baseando na presença desses compostos, *Melipona* é possivelmente explorador de uma flora vegetal muito similar ao das coletas de *Apis* (DOS SANTOS et al., 2017a).

A metodologia adotada usualmente tem grande sensibilidade para reagir com o grupo de flavanonas, e menor sensibilidade para flavonas, flavonóis e isoflavonas que apresentem dupla ligação entre os carbonos C₂ e C₃, por sua dificuldade em reagir com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DOS SANTOS et al., 2017a). Isso torna a

metodologia adotada mais específica, com uma menor interferência da presença de outros compostos. Contudo, a caracterização das flavanonas da própolis de *Apis* já foi realizada (DA SILVA et al., 2019), enquanto para Meliponini, estudos mais aprofundados nesse grupo de compostos ainda são raros (POPOVA et al., 2009).

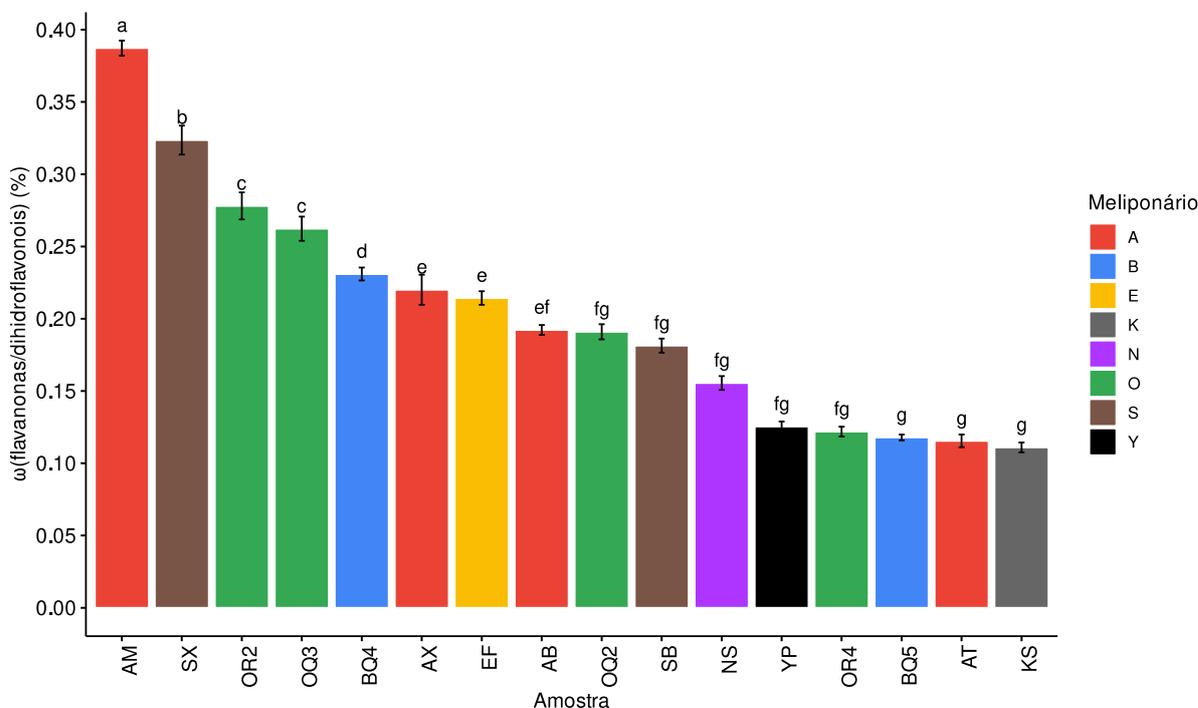


Figura 19: Porcentagem da massa de flavanonas e dihidroflavonois. As barras estão preenchidas de acordo com o Meliponário de origem. Os valores com mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey adotando nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$). As barras de erro representam o erro padrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Foram obtidos teores de flavanonas de 10,3 até 20,7 % das amostras de própolis de *Apis* provenientes da Croácia (KOSALEC et al., 2004). Valores muito maiores do que o intervalo aqui obtido de 0,11 a 0,38 % (Fig. 19), não existe uma exigência mínima com relação à presença de flavanonas ou dihidroflavonois pela legislação (BRASIL, 2000, 2001). Entretanto, a presença desses compostos é indicada por alguns autores como associada às maiores atividades biológicas, em especial antibacteriana (KOSALEC et al., 2004). Todavia, em alguns casos, a presença de flavanonas preniladas parece ser um aspecto mais relevante para a atividade biológica, ainda que metodologia aqui adotada favoreça o reconhecimento de flavanonas de manei-

ra ampla (POPOVA et al., 2009). Esse aspecto é mais profundamente discutido na seção 3.17.

Da mesma maneira, as grandes variações encontradas neste estudo, demonstram que não há uma relação estreita do teor de flavanonas e dihidroflavonóis com relação à origem geográfica (Fig. 19). Assim, as amostras de um mesmo meliponário (barras de mesma cor), em sua maioria, não pertencem ao mesmo grupo estatístico, portanto, não é possível uma generalização consistente nesse sentido.

3.10 Análise geral dos compostos fenólicos

Com os resultados obtidos nos testes colorimétricos para a composição fenólica das amostras foi construído um gráfico de dispersão (Fig. 20), focando na identificação das principais relações de cada teste realizado.

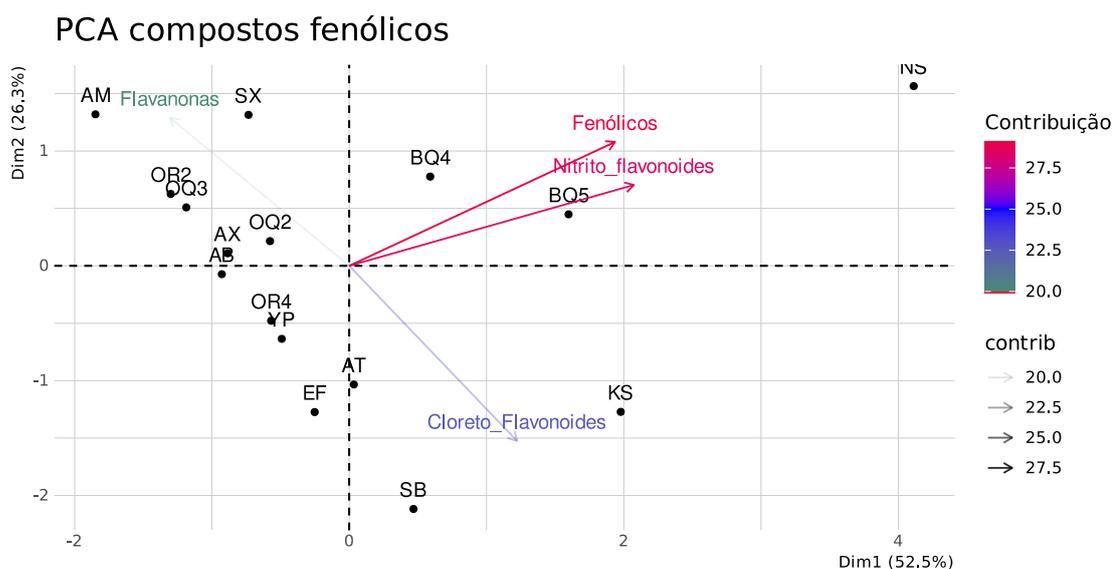


Figura 20: Gráfico de dispersão das amostras com relação á composição fenólica. Os vetores representam os testes realizados: **Flavanonas** – flavanonas e dihidroflavonóis, **Cloreto_flavonoides** – teor de flavonoides totais pelo método com cloreto de alumínio, **Nitrito_flavonoides** – teor de flavonoides totais pelo método de nitrito de sódio, **Fenólicos** – teor de compostos fenólicos. As cores representam a intensidade de contribuição para a dispersão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

É possível notar que o teor de compostos fenólicos e de flavonoides por meio da metodologia do nitrito de sódio (Fig. 20-Nitrito_flavonoides) foram os que mais contribuíram para a dispersão observada. Além disso, ambos vetores estão notadamente próximos um do outro, e apresentaram valores mais proeminentes para as amostras de São Paulo (B) e região urbana de Mossoró (N) (Fig. 20).

De todos os vetores estudados, o de menor contribuição para a dispersão corresponde ao de flavanonas e dihidroflavonóis (Fig. 20-Flavanonas), o que é consistente, tendo em vista as baixas variações dos teores obtidos entre amostras (2.11). É possível notar uma correspondência quase oposta entre os valores obtidos de flavanonas (Fig. 20-Flavanonas) e de flavonoides pelo método com cloreto de alumínio (Fig. 20-Cloreto_flavonoides).

O padrão de dispersão obtido não salienta a presença de alguma relação muito próxima entre o produtor de origem da amostra e a composição de compostos fenólicos para espécies de abelhas diferentes (Fig. 20). A importância da adoção dessas metodologias vem principalmente da capacidade de comparar os teores desses compostos entre um grande número de amostras e de maneira simples, entretanto as estimativas quantitativas não são absolutamente consistentes (MARCUCCI et al., 2021). Alternativas mais recentes vem surgindo, com espectroscopia em comprimentos de onda próximos ao infravermelho, uma técnica que possibilita estimar a presença desses compostos. Entretanto, grande parte do problema com a acurácia da estimativa ainda são preservadas (BETANCES-SALCEDO et al., 2017).

A metodologia com cloreto de alumínio para a determinação de flavonoides é uma alternativa mais conveniente, no contexto de controle de qualidade, por permitir o rápido processamento de inúmeras amostras além de ser acessível à boa parte do instrumental disponível nos laboratórios do país (MARCUCCI et al., 2021). Por ser amplamente difundida também pode ser utilizada para comparar amostras, ou ainda realizar o acompanhamento do controle de qualidade de produção.

Parece existir uma boa relação entre a presença de flavonoides e fenóis totais com menores valores de IC_{50} (COTTICA et al., 2011), o que é esperado tendo em vista que essas moléculas apresentam consistente atividade antioxidante (TUNGMUNNI-THUM et al., 2018). Essa relação com a atividade microbiana será mais explorada no tópico 3.16.

3.11 Composição das ceras por cromatografia a gás, acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

A aparência da cera obtidas após o processamento foi extremamente similar ao que já é reconhecido para as abelhas melíferas. Entretanto, em alguns casos foi mais rígida e friável que a cera de *Apis*, usualmente descrita como pálida, suave ao toque, e maleável (SCHWARZ, 1945; BLOMQUIST; ROUBIK; BUCHMANN, 1985).

A cera de abelhas pura é proveniente das glândulas de cera localizadas entre o quarto e sétimo tergito (KOEDAM et al., 2002). Logo que sai do corpo apresenta cor pálida e tende a formar escamas (DE CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002; BOGDANOV, 2004), para *Apis*, a coloração da cera se modifica temporalmente pela oxidação e/ou pelo contato com outros componentes (BOGDANOV, 2004). Entretanto, em Meliponini, raramente são construídas estruturas da colmeia compostas somente de cera (SCHWARZ, 1945; MILBORROW; KENNEDY; DOLLIN, 1987). Durante sua manipulação, a cera, em sua maioria, é misturada com componentes externos (SCHWARZ, 1945), o que modifica sua aparência de imediato. Desse modo, registros de métodos de purificação da cera de abelhas sem ferrão remontam a períodos ainda anteriores à colonização do Brasil (SCHWARZ, 1945).

Durante o processamento das amostras deste estudo, uma grande parte do conteúdo separado das ceras apresentou uma coloração escura, e em alguns casos, também foi possível distinguir visualmente a presença partículas minerais como corpo de fundo da solução, semelhante ao que é relatado para a purificação das ceras das colmeias de *Trigona australis* (MILBORROW; KENNEDY; DOLLIN, 1987).

Comumente em extrações de hexano são documentadas a presença de alcanos, principalmente de cadeias longas (STREHLE et al., 2003; RIGHI et al., 2011; OLEGÁRIO et al., 2019). Nas amostras, foram identificados alcanos de cadeia longa como hentriacontano (C_{31}), heneicosano (C_{21}), nonadecano (C_{19}), pentacosano (C_{25}), e dotriacontano (C_{32}). É notável também a predominância de ésteres de cadeia longa, como: etanoato de heptacosila (C_{29}), octosila (C_{30}), e triacontila (C_{32}) (Fig. 21).

Álcoois de cadeia longa também estão presentes (Fig. 21). Em especial, o 1-Triacontanol (C_{30}), e 1-Hentetracontanol (C_{41}) (Fig. 21). A predominância de ácidos graxos, álcoois e ésteres de cadeia longa é similar ao que é encontrado como composição para a cera de *Apis* (LIU et al., 2016), assim como da composição epicuticu-

lar de *M. marginata* (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010). Usualmente, a cera proveniente das operárias de Meliponini apresenta características macroscópicas muito similares das descritas para *Apis*. Entretanto, elas são quase sempre misturadas de maneira uniforme com resinas ou solo durante sua manipulação pelas abelhas (KOEDAM et al., 2002).

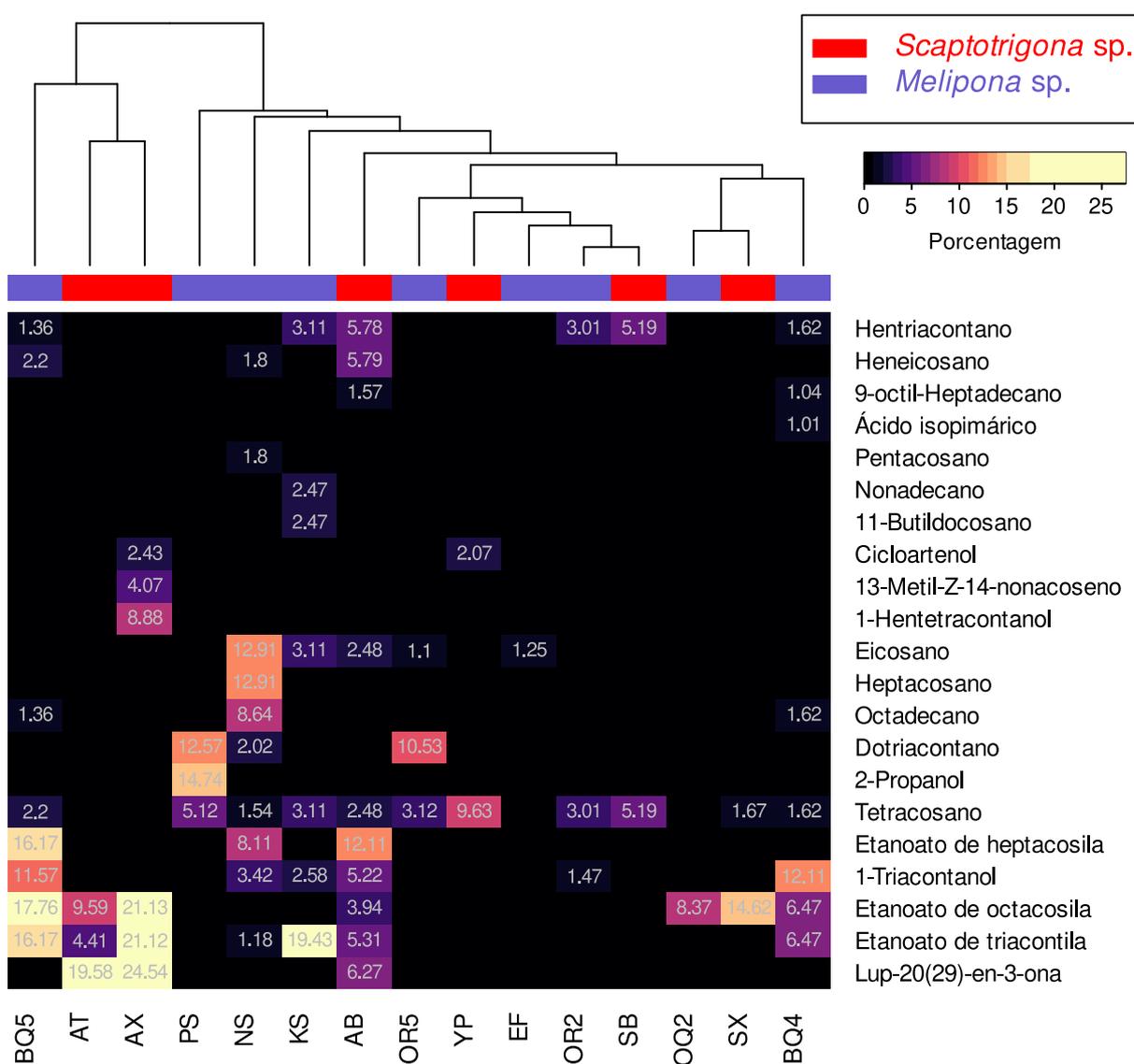


Figura 21: Mapa de calor da composição da cera obtida por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) por meio da extração inicial com diclorometano de amostras de própolis de abelhas sem-ferrão. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

O agrupamento de amostras pela região ou por espécie, não foram tão determinantes. A presença de hidrocarbonetos, principalmente alcanos e alcenos são marcantes (Fig. 21). Contudo, compostos da classe dos ésteres correspondem à maior proporção das amostras. Os estudos da composição da cera extraída da própolis de *Apis* indicam a predominância de ésteres, com destaque para monoésteres e hidrocarbonetos (NEGRI et al., 2000), e mais recentemente, a presença de sesquiterpenos como importantes marcadores químicos na composição da própolis (HUANG et al., 2014). A grande predominância desses compostos também foram observadas para as amostras de Meliponini estudadas (Fig. 21).

Em alguns casos, como para a própolis de *Melipona fasciculata*, a cera é predominantemente composta de triterpenos e carboidratos (ARAÚJO et al., 2015). Ao analisarmos as espécies de *Melipona* deste trabalho, não se observou uma predominância tão evidente de triterpenos, além de não ter sido identificada a presença de carboidratos. Entretanto, para esse último componente, é esperado que sua presença não seja notada devido ao método utilizado, além do fato de que este parecer um aspecto específico da constituição da própolis de *M. fasciculata* em vez de uma característica abrangente a todo o gênero.

Nos insetos, a cutícula é a porção mais externa do tegmento, sendo composta por duas camadas de diferente composição química, e que atuam na rigidez do exoesqueleto (POIANI et al., 2014). Ela apresenta uma grande importância na sinalização química e comunicação entre os insetos sociais (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010). Os lipídios componentes da cutícula apresentam cadeia carbônica variando entre C_{17} e C_{49} , e em sua maioria alcanos, ou alcanos com grupos metil, e alcenos (MORGAN, 2004). Nas amostras foram obtidas uma reduzida presença de alcenos (como 13-metil-Z-14-nonacoseno) e de hidrocarbonetos ramificados (como 9-octil-heptadecano). Para *Melipona* os registros apontam a presença de uma epicutícula com número ímpar de carbonos predominantemente de C_{22} a C_{31} como alcanos e alcenos (ABDALLA et al., 2003; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010), apresentando majoritariamente pentacosanos e tricosanos nas abelhas campeiras (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010). Desta forma, parte da composição obtida para as amostras corresponde ao que é encontrado como constituinte da epicutícula das abelhas, e como material proveniente da glândula de cera.

Os dados também indicam a presença de hidrocarbonetos, principalmente com cadeias carbônicas entre 18 e 27 carbonos como: octadecano (C_{18}), eicosano (C_{20}), heneicosano (C_{21}), tetracosano (C_{24}), heptacosano (C_{27}). Os tamanhos de cadeia carbônica estão próximos ao intervalo usualmente documentado na literatura, além da predominância de cadeias saturadas, e esterres, compostos identificados como parte da cutícula do exoesqueleto das abelhas (KOEDAM et al., 2002), com importante atuação como marcadores químicos de identificação entre as abelhas (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010). Este resultado parece interessante, precisando, entretanto, de novos trabalhos, voltados a confirmar esses dados.

Para a maioria das amostras houve a formação de um grande agrupamento das espécies estudadas, com pouca distinção entre os gêneros (Fig. 21). Indicando que de maneira geral, os componentes da cera são mais amplamente difundidos entre as amostras de maneira relativamente similar. Dado que a cera tem grande importância dos componentes produzidos pelas abelhas, e do seu papel similar para a colmeia (STREHLE et al., 2003; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010), é esperado que exista uma certa consistência de sua composição entre grupos de abelha próximos.

Também foram obtidos conjuntos de compostos, em baixa quantidade, que contribuiriam para a separação das amostras do agrupamento principal, em especial de diferentes espécies provenientes de uma mesma região, como Lup-20(29)-en-3-ona, composto amplamente disperso em diversas famílias de plantas (XU et al., 2018), que esteve presente nas amostras do produtor A (Fig. 21—AX e AT). Poderia ser uma indicação de que a presença de componentes hidrofóbicos da resina de plantas também pode vir associada com a cera. Tendo em vista que as abelhas homogenizam a cera retirada do abdômen com o material exsudado obtido das plantas (SCHWARZ, 1945), e assim alguns compostos presentes no extrato fracionado hexânico têm origem da resina e não somente da cera da glândula abdominal das abelhas. Essa questão vem permeando a literatura, e análises mais consistentes voltadas para esse tema ainda se fazem necessárias (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010).

De qualquer modo, a análise mais profunda da composição das cadeias carbônicas dos hidrocarbonetos das ceras é melhor explorada na próxima seção (3.12).

3.12 Composição da fração de hidrocarbonetos por cromatografia a gás com detector por ionização de chama (CG/FID)

Neste procedimento foram identificados apenas os alcanos de *Scaptotrigona*, pois as própolis desse gênero eram as que apresentavam incorporação mais substancial de cera, com já discutido anteriormente (tópico 3.4). Essa abordagem tem como princípio que o aumento de um átomo de carbono na cadeia carbônica provoca aumento quase regular do tempo de retenção (MAROTTA; NETO; AZEVEDO, 2014). Essa propriedade, aliada a extrações com solventes de baixa polaridade, promove a possibilidade de identificação do tamanho de cadeias carbônicas presentes em misturas complexas (Apêndice A).

Foram encontradas variações substanciais da composição dos hidrocarbonetos das amostras estudadas (Tabela 3). Não foram notadas semelhanças entre as amostras de uma mesma espécie, bem como, entre amostras de um mesmo produtor. Por exemplo, *S. xanthotricha* (AX e SX), dos produtores A e S, apresentam como alcanos principais C_{40} e C_{26} , respectivamente (Tabela 3). Ao se analisar amostras diferentes de um mesmo produtor, por exemplo, *S. xanthotricha* (SX) e *S. bipunctata* (SB), do produtor S, de Jacuí (MG), verifica-se também diferenças acentuadas entre os hidrocarbonetos que as constituem (Tabela 3).

Para *Meliponini*, o material de construção da colmeia é basicamente cera acrescida de materiais externos (SCHWARZ, 1945). Entretanto, os componentes predominantes da cera são oriundos da glândula cerífera das abelhas, mesmo com o acréscimo da resina vegetal utilizada na fabricação da própolis (KUMAZAWA et al., 2008). Os dados obtidos corroboram essa informação, tendo em vista que os componentes majoritários, apesar de apresentarem variações na porcentagem relativa, estão presentes em amostras da mesma espécie, independente da região de origem (Tabela 3).

Com o conjunto de dados obtidos pela cromatografia, também foi realizada a análise de agrupamento (Fig. 22). Podemos observar que existem regiões em que as moléculas identificadas possuem maior proporção. Compostos com cadeias carbônicas C_{40} , C_{39} , C_{32} , C_{26} , e C_{14} , são os mais abundantes considerando o conjunto de amostras pertencentes a *Scaptotrigona* (Fig. 22).

Tabela 3: Porcentagem (TIC) de hidrocarbonetos presentes nas amostras, conforme o número de átomos de carbono que constituem a cadeia carbônica.

Carbonos na cadeia carbônica	AX	AT	AB	SB	SX	YP
14		27.36				
19	0.04				0.13	
24		6.53				
25		1.01	8.07	2.84	2.34	
26	0.73			1.04	54.01	
27	0.28	1.05	10.66	14.24	8.37	8.01
28	0.37			2.78	1.30	
29		1.25	9.46	16.48	8.14	12.05
30	0.27	2.89	3.11	5.46	0.41	3.76
31	0.21	5.78	3.60	5.09	4.92	1.98
32	0.60	3.17	12.96	27.37	10.26	28.31
33	0.17	1.71	2.88		1.64	10.69
34		2.43	1.03	5.62	0.09	1.21
35				0.85		
36	0.17				1.03	6.42
37				11.04	2.18	10.03
38				1.34		
39	2.38	43.49	48.23		0.25	18.43
40	90.42	2.37				

A constituição do exoesqueleto de *S. postica* inclui compostos C₂₁ a C₃₃ principalmente de número ímpar de carbonos como heptacosano e tricosano predominam, especialmente para os indivíduos que trabalham na colmeia (POIANI et al., 2014). Os dados corroboram o intervalo indicado pelos autores, entretanto, com alguns compostos de cadeias carbônicas ainda maiores (Tabela 3). Isso pode ser devido a grande parte dos componentes dessa extração serem oriundos do material produzido pela glândula de cera, e não necessariamente esse componente e a epicutícula das abelhas apresentam a mesma composição.

É importante ressaltar que apesar das amostras provenientes dos produtores A e S, pertencerem a regiões com vegetações diferentes e cada produtor possuir mais de uma espécie, a constituição das ceras parece ser mais predominante determinada pela espécie de abelha do que pela sua origem geográfica (Fig. 22).

Com isso, é notável as amostras de *S. xanthotricha* compostos com cadeia

carbônica entre C_{26} e C_{34} predominam. As amostras de *S. bipunctata* apresentaram predominância de C_{25} e C_{34} , mostrando também compostos com cadeias carbônicas C_{37} , C_{39} .

Distância de Ward

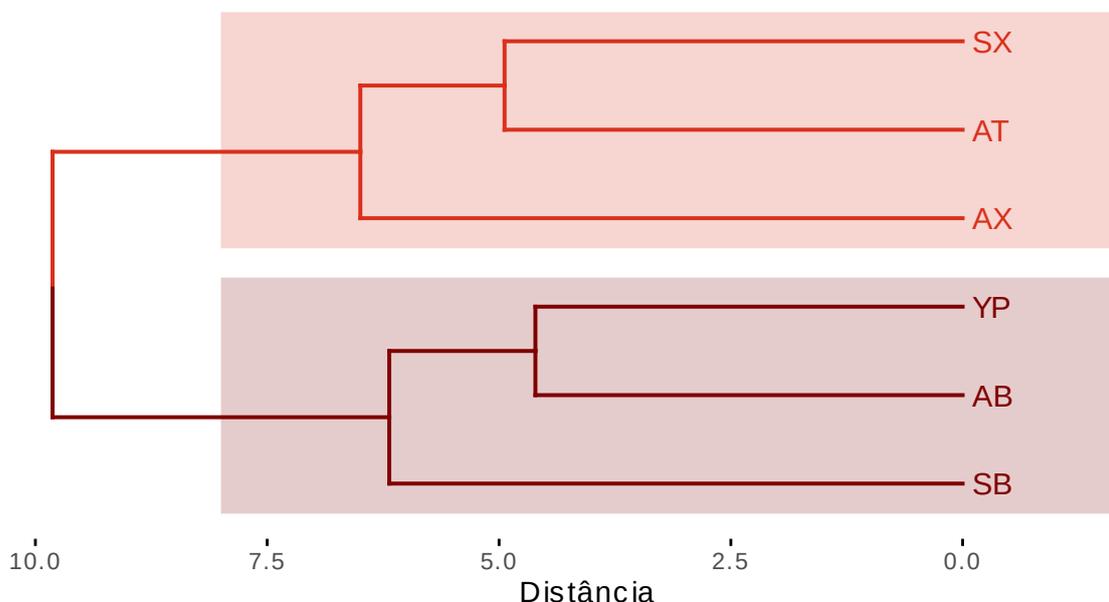


Figura 22: Dendrograma obtido para a análise da composição da fração de hidrocarbonetos de própolis de abelhas sem ferrão, utilizando a distância euclidiana e o método de Ward corrigido. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Apesar de a análise de agrupamento mostrar uma certa afinidade entre amostras de um mesmo produtor, como *S. xanthotricha* (AX) e *S. tubiba* (AT), há uma grande distância entre amostras da mesma espécie, provenientes de produtores diferentes, como se nota entre *S. xanthotricha* dos produtores A (Guarujá, SP) e S (Jacuí, MG). O mesmo acontece com as amostras de *S. bipunctata*, provenientes dos produtores A e S.

A composição da cera do corpo de abelhas em Meliponini é complexa. Além de constituir um dos principais componentes da própolis em alguns gêneros como visto anteriormente para *Scaptotrigona* (item 3.4 Teor de ceras), ainda assim, sua composição é comparável à composição relatada para outros grupos de abelhas (BLOMQUIST; ROUBIK; BUCHMANN, 1985). Usualmente a fração de cera da própolis apresenta pouca interferência do lugar de origem (NEGRI et al., 2000), mas a com-

posição genéticas das abelhas podem influenciar nessa e em outras de suas características (NEGRI et al., 2000; SILVA; ARAÚJO; SCHER, 2012). Esse conjunto de fatores além da interferência de compostos presentes nas resinas vegetais exploradas localmente pelas abelhas, podem ser responsáveis pelas variações encontradas, e mereceriam uma melhor exploração e atenção das pesquisas futuras.

3.13 Cromatografia a gás dos compostos voláteis

A própolis também é constituída por substâncias voláteis, em maior ou menor quantidade, dependendo da resina da qual a abelha se utiliza na sua constituição. Estas substâncias foram analisadas por cromatografia gasosa, sendo possível identificar a presença de um conjunto diverso de componentes (Fig. 23).

Os dados demonstram que não há uma proximidade clara, entre o perfil de seus componentes e as proporções em que estão presentes, mesmo para amostras da mesma espécie. Com relação á origem, somente alguns dos materiais provenientes de um mesmo produtor apresentaram proximidade dos constituintes e suas quantidades, o que é observado para *M. mondury* (OR2) e *M. quadrifasciata* (OQ3) de Cotia (O), e de *S. xatotricha* (SX) e *S. bipunctata* (SB) de Jacuí (S).

Assim, o conjunto de compostos voláteis variou quantitativamente, e qualitativamente entre as amostras, mesmo quando provenientes do mesmo produtor. A fração volátil de amostras de própolis difere com relação à origem geográfica (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; OLEGÁRIO et al., 2019), impactando a percepção organoléptica e a aparência visual das amostras (KAŠKONIENĚ et al., 2014).

A composição de voláteis do presente estudo indicam que os grupos de diferentes colmeias, mesmo quando presentes em um mesmo meliponário talvez explorem de maneira desigual as fontes de materiais vegetais disponíveis na região, resultando na diferença de proporção de componente de cada amostra (Fig. 23), observação similar ao que é encontrado para as abelhas melíferas (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; ISIDOROV et al., 2016).



Figura 23: Mapa de calor da composição obtida por cromatografia a gás, acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) para os compostos voláteis obtidos por hidrodestilação de amostras de própolis de Meliponini. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Os componentes majoritários das amostras compreendem a classe de terpenos, principalmente mono e sesquiterpenos (Fig. 23). Esses grupos de compostos também são preponderantes em estudos da própolis de *Apis* (FERNANDES et al., 2015; OLEGÁRIO et al., 2019), assim como compostos das classes de álcoois e aldeídos (KAŠKONIENĖ et al., 2014).

É ressaltada a presença de cariofileno (Fig. 24-C), δ -cadineno, espatulenol (Fig. 24-G), α -copaeno, aromadendreno, e α -trans-bergamoteno (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; OLEGÁRIO et al., 2019). Para a própolis verde de Minas Gerais também são mencionados os compostos nerolidol, β -cariofileno (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; LAVINAS et al., 2018). Todas essas moléculas mencionadas foram obtidas em maiores ou menores quantidades para as amostras estudadas (Apêndice B).

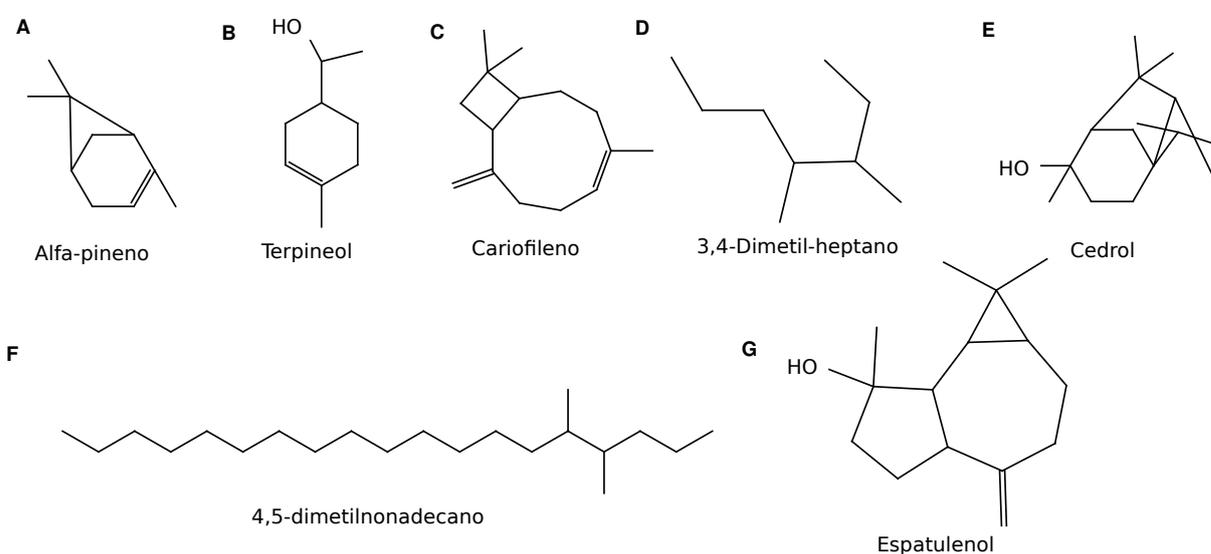


Figura 24: Fórmula molecular dos principais componentes das amostras estudadas. As nomeações sem destaque seguem as normas estabelecidas pela IUPAC.

Os compostos mencionados também são característicos da própolis de *M. quadrifasciata*, além de estarem presentes em outras espécies de Meliponini

(BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019). Estudos mais recentes ainda indicam a presença em menor proporção de α -cubebeno, α -pineno (Fig. 24-A), α -muuruleno, β -selineno, γ -muuruleno, β -bisaboleno, γ -cadineno, e α -curcumeno (FERNANDES et al., 2015). Todos esses compostos, também estiveram presentes (Fig. 25) nos óleos voláteis do conjunto de amostras deste estudo (Fig. Apêndice B).

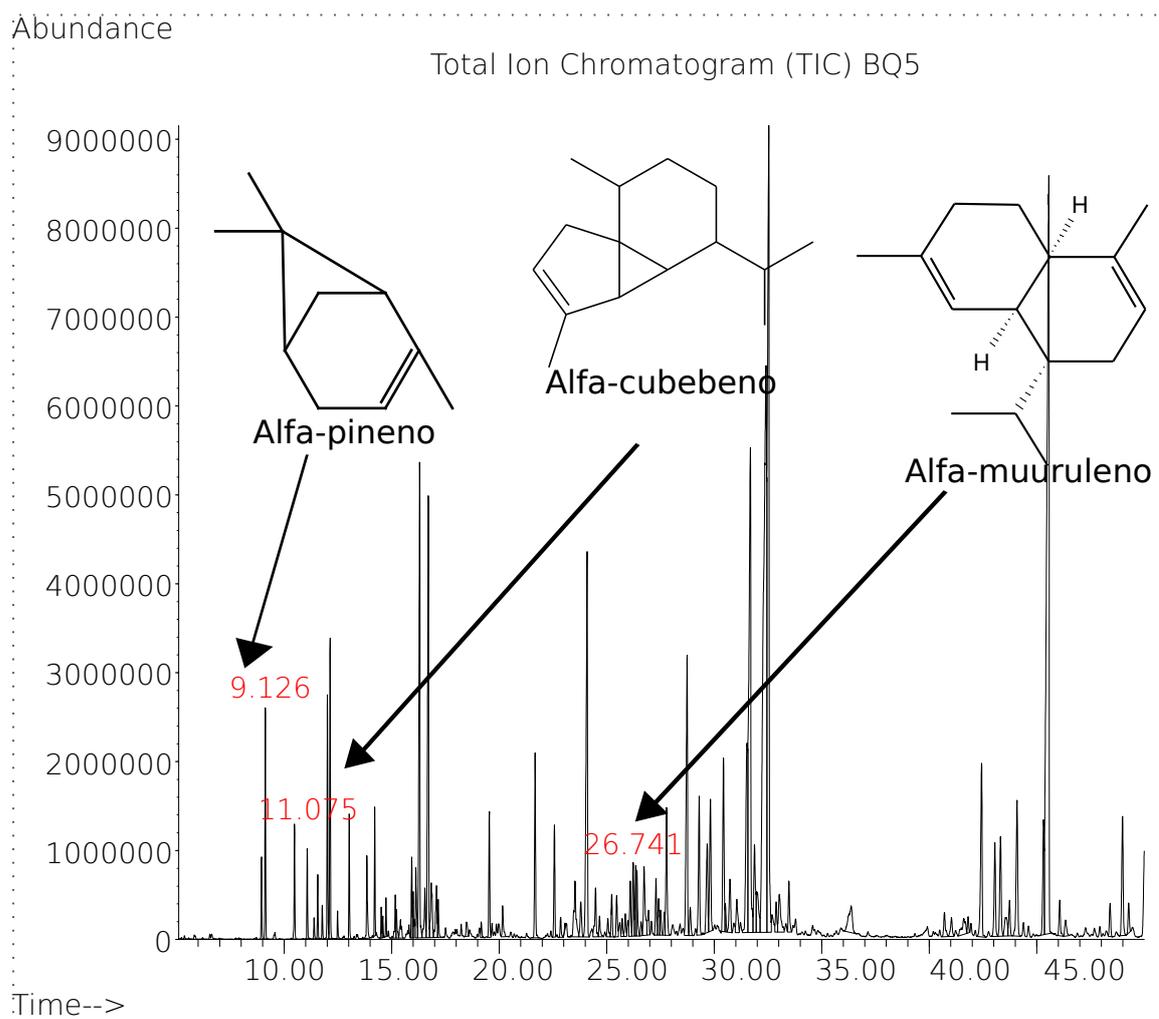


Figura 25: Cromatograma de *M. quadrifasciata* (BQ5) com os principais compostos identificados que são comuns aos óleos voláteis dessa espécie.

Entretanto, a proporção correspondente a cada composto foi altamente variável entre as amostras. Disparidades dentro da mesma espécie podem ser observadas, como por exemplo os compostos presentes singularmente na própolis vermelha de *Apis* que parecem ser mais específicos desse produto (RIGHI et al., 2011;

HERRERA-LÓPEZ et al., 2019) e que não são abrangentemente encontrados em outras própolis.

Notadamente também estão a presença de terpineol (Fig. 24-B), monoterpeneo que de grande proporção nas amostras de São Paulo (meliponário B), assim como α -cariofileno (Fig. 24-C), é quase onipresente nas amostras estudadas. Foi também observada a presença dos alcanos ramificados 3,4-dimetileptano (Fig. 24-D) e 4,5-dimetilnonadecano (Fig. 24-F), nas amostras de Cotia (meliponicultor O).

Estudos mais abrangentes com os componentes voláteis de *Apis*, indicam uma grande proporção de pinenos (Fig. 24-A) como majoritários para própolis verde, proveniente do Brasil, correspondendo a cerca de 50 % das amostras (KAŠKONIENĚ et al., 2014). Esse resultado tem uma boa correspondência com a proporção desse composto obtido para as coletas realizadas no produtor O, nas quais cerca de 40 % dos óleos é constituída por esse terpenoide. Todavia, esses valores são muito variáveis entre as outras amostras, independentemente da origem ou da espécie.

O cedrol (Fig 24-E) foi um composto identificado somente algumas das amostras de *M. quadrifasciata* (BQ4 e OQ2), assim como *M. flavolineata* (EF) e *S. bipunctata* (AB), similar ao que já foi observado para *M. quadrifasciata* e *Plebeia remota* (SUREK et al., 2021). Este composto é mais amplamente obtido em óleos essenciais de coníferas dos gêneros *Cupressus* e *Juniperus* (NCATS, 2021). Essa categoria de composto também foi obtido anteriormente para *Apis*, em que os autores sugerem que no cenário brasileiro, espécies do gênero *Araucaria* podem fornecer resina vegetal rica neste composto (BANKOVA et al., 1996), assim como própolis de regiões temperadas costumam ser ricas em componentes de Pinaceae (EROĞLU; ACAR; KEKEÇOĞLU, 2021). Esses dados sugerem que as abelhas de um mesmo meliponário devem explorar grupos de plantas diferentes como fontes de resina, e que possivelmente as abelhas também sejam capazes de coletar resina desses gêneros de plantas.

Observações em campo da coleta de material resinoso são mais laboriosas de serem observadas, principalmente por ocorrerem no dossel da vegetação nativa (BANKOVA et al., 2019). Assim, poucos aspectos do comportamento de coleta de resina empregada em própolis são conhecidos (REGNIER, 2021). Entretanto, a composição química pode ser utilizada como indicadora das fontes exploradas pelas abelhas (SAWAYA et al., 2009). Fatores como a interação ecológica das diferentes es-

pécies de abelhas também podem ser responsáveis por diferenças no padrão observado. Com os dados obtidos neste estudo há a indicação de que as abelhas exploram de maneira desigual as fontes vegetais, mesmo pertencendo a um mesmo produtor, e que não há um comportamento altamente especialista de coleta.

Apesar de ser extensamente mencionado que a composição da própolis apresenta cerca de 10 % de óleos voláteis (PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002; KOSALEC et al., 2004; SCHELLES et al., 2021; DAMODARAN, 2021), esse valor se mostrou extremamente discrepante do que foi observado para as amostras deste trabalho, tendo em vista que foi obtida uma proporção muito inferior ao valor estipulado. Contudo, os resultados obtidos se aproximariam muito do teor documentado por Woisky e Salatino (WOISKY; SALATINO, 1998) em que a fração mássica (ω) é cerca de 0,5 %.

3.14 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) dos extratos fracionados de hexano e diclorometano

3.14.1 Extrato fracionado de Diclorometano

O extrato fracionado de diclorometano das amostras analisadas, apresentou uma alta proporção, mas baixa riqueza de compostos, se comparada aos outros extratos (Fig. 26). Há pouca proximidade das coletas de uma mesma região, com exceção de *M. mondry* (OR4) e *M. quadrifasciata* (OQ3) de Cotia (O) que apresentaram baixa proporção de compostos identificados. Com relação à espécie existe ainda uma menor proximidade.

Os compostos com maior frequência entre amostras foram: glicerol (Fig. 26, Fig. 27–A) e o ácido desidroabiético (Fig. 26, Fig. 27–B). Esses dois compostos apresentaram uma importância muito grande nas amostras oriundas do Guarujá (A), e não estiveram presentes somente nas amostras de *M. quadrifasciata* de Cotia (O). De forma genérica, a composição obtida é muito diferente do que foi previamente documentado para própolis vermelha de *Apis*, por exemplo (RIGHI et al., 2011), e apresenta pouca relação com este gênero.

Para esse extrato fracionado também é importante destacar a presença de ácido desidroabiético (Fig. 27–B) nas amostras de *M. marginata* (AM) e *M. quadrifasciata* (OQ2) (Fig. 26), principalmente por sua recente descoberta como um composto antibacteriano contra algumas cepas bacterianas (NETO et al., 2015). O que poderia explicar a presença de atividade biológica para extratos apolares de própolis e/ou envolvendo a cera de abelhas (KACÁNIOVÁ et al., 2012; LIU et al., 2016).

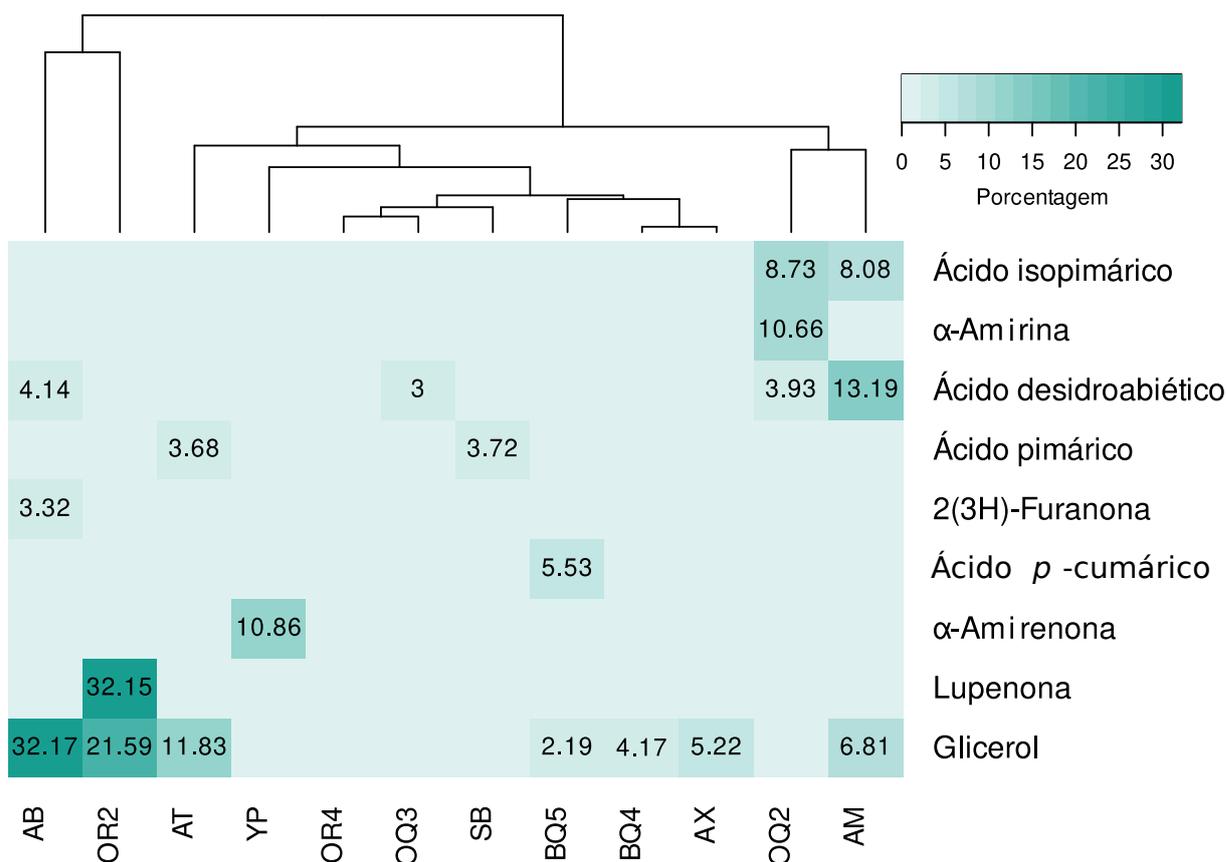


Figura 26: Mapa de calor da composição obtida por cromatografia a gás, acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) para o extrato fracionado obtido com diclorometano de amostras de própolis de abelhas sem-ferrão. A coloração das barras indica a porcentagem relativa. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Os componentes: α-amirina (Fig. 26, Fig. 27–C) e lupenona (Fig. 26, Fig. 27–E) que foram previamente mencionados como presentes nas própolis de *Melipona* (DUTRA et al., 2019), estiveram presentes nas amostras de Cotia (O). Esses compostos também são comumente descritos nas frações apolares de *Apis* (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013; MACHADO et al., 2016; DA SILVA et al., 2019). A composição da

fração clorofórmica de *Apis*, é predominantemente de ácidos graxos (DUTRA et al., 2019), e por se tratar de um solvente de polaridade semelhante ao diclorometano, seria de se esperar que a composição das amostras desse estudo fossem semelhantes. Todavia, não foi obtida a presença desses compostos para o extrato fracionado em diclorometano. Mesmo assim, nas amostras analisadas, não foram identificados nem ácido esteárico e ácido gálico, que apresenta presença marcante nas própolis de *M. fasciculata* (DUTRA et al., 2019). Portanto, a presença desses compostos pode ser algo característico dessa espécie, e não um aspecto abrangente ao gênero.

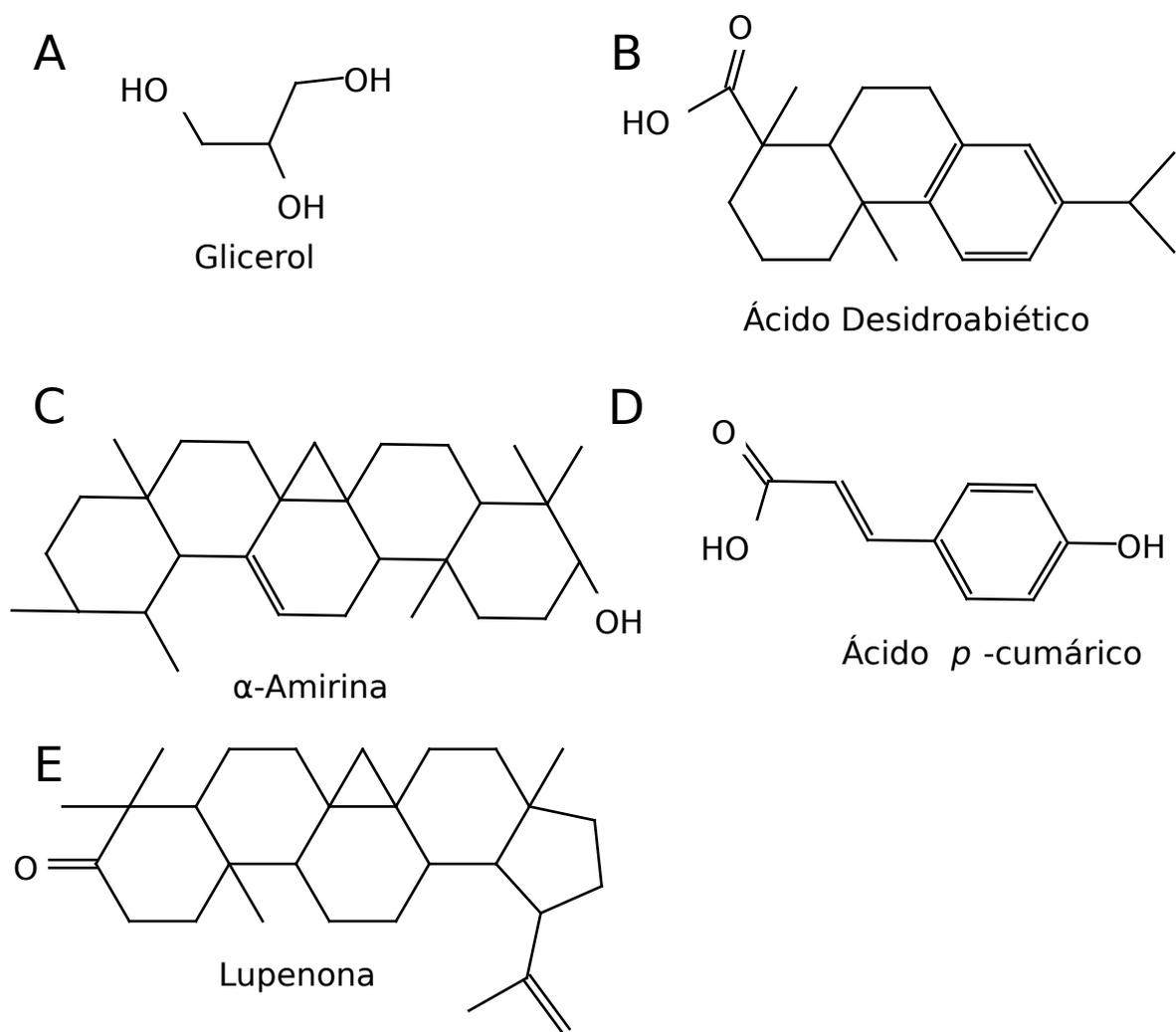


Figura 27: Principais compostos obtidos pela biblioteca NIST nos extratos fracionados de diclorometano das amostras de própolis de Meliponini.

A presença de ácido *p*-cumárico (Fig. 27–D) (VELIKOVA et al., 2000a; FREIRES et al., 2016) e amirinas (Figura 27C) (BONAMIGO et al., 2017b; FREIRES et al., 2016) são usuais tanto para a própolis de *Apis*, quanto para abelhas sem ferrão, de maneira independentemente da espécie (ÇELEMLI, 2013; BONAMIGO et al., 2017a; LAVINAS et al., 2018). Entretanto, nas amostras estudadas, só foi identificada a presença desse ácido (Fig. 27–D) em *M. quadrifasciata* de São Palo (BQ5). Enquanto os isômeros de amirina foram mais amplamente observados, principalmente nos extratos fracionados hexânicos, e na forma de β -amirina.

3.14.2 Extrato fracionado de Hexano

Para o extrato fracionado de Hexano, foi encontrada uma maior diversidade de compostos, com a predominância de somente alguns deles (Fig. 28). Foram obtidas grandes similaridades entre as coletas de um mesmo produtor (Fig. 28), entretanto a espécie pareceu ser mais determinante, para os agrupamentos.

Aparentemente, os compostos obtidos nesta análise são característicos da espécie, do que da região de procedência. Isso pode ser observado pelos compostos e proporção similar das amostras de *M. mondury* (OR2 e OR4) e *M. subnitida* (NS e KS), o que resultou no agrupamento das duas espécies (Fig. 28). As amostras de *M. subnitida* são de regiões diferentes, e ainda assim estarem agrupadas é um indício de que essa aproximação se dá principalmente pela espécie da abelha e não pela região.

As classes de compostos responsáveis pelos agrupamentos compreendem triterpenos, diterpenos ácidos graxos e alcanos, componentes com origem predominante da cera. Como esse produto tem sua composição majoritariamente determinada pela variabilidade genética e metabolismo da abelha (MORGAN, 2004), além de mais facilmente solubilizado no extrato apolar. Seria esperado que a espécie e o gênero de abelha seja mais determinante de sua composição.

Para a amostra de *M. subnitida* (NS e KS), cicloartenol (Fig. 28–16 29A), β -amirina (Fig. 28–34) e lupenona (Fig. 28–25 27E) são os compostos majoritários, sendo uma composição muito próxima do que já foi descrito para a espécie (FREIRES et al., 2016). Havendo o agrupamento dessas amostras, pelo teor e presença desses compostos mesmo em amostras de localidades diferentes (Fig. 28).

A presença de ácido hexadecanoico (Fig.28–11, e 29F) na amostra de *M. mondury* é importante, tendo em vista que esse composto já foi documentado para outra espécie do mesmo gênero (DUTRA et al., 2019). Além deste, a presença de ácido isopimárico (Fig.28–12, e 29B), e heptadecano (Fig.28–23), foram marcantes para a própolis dessa espécie.

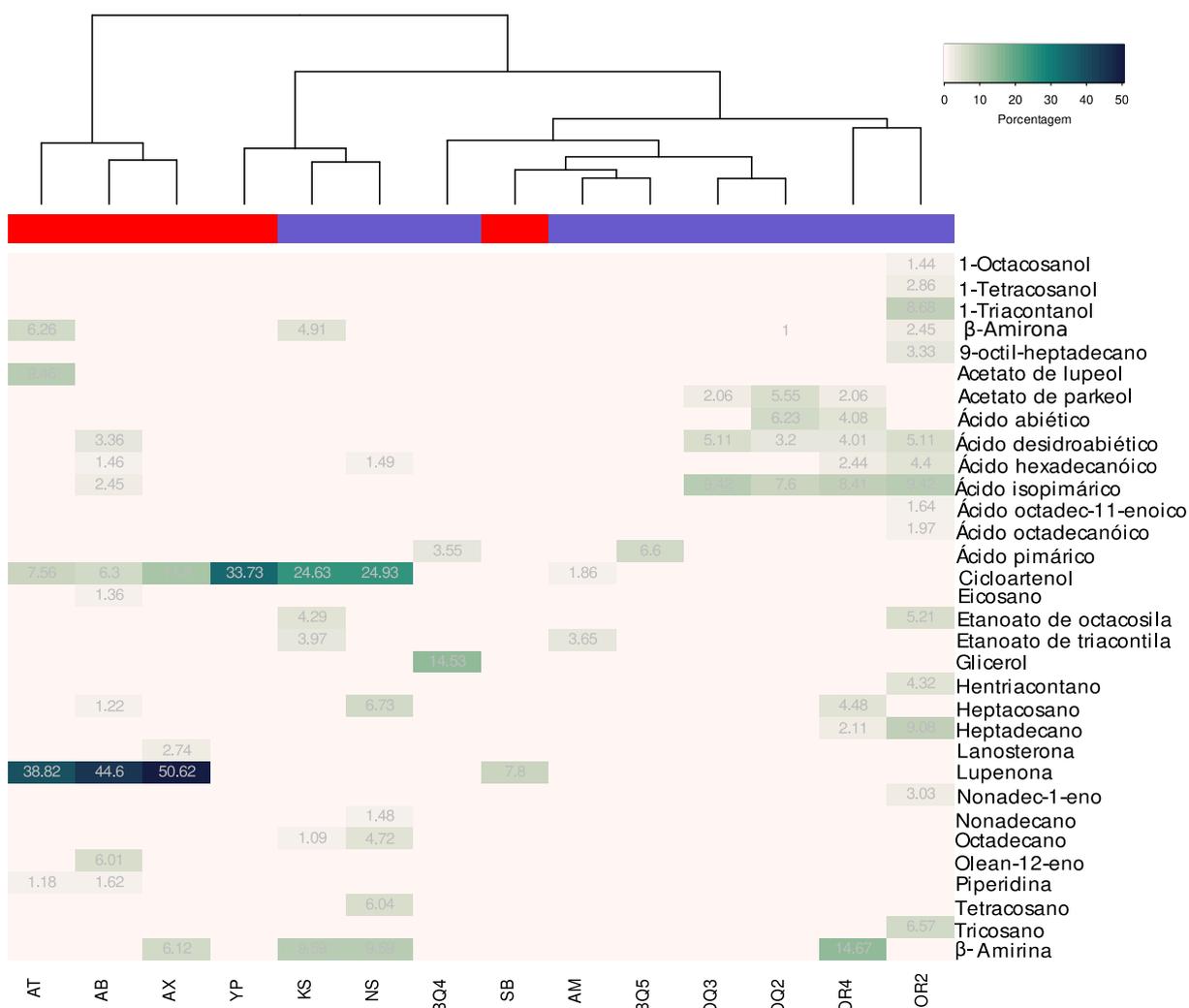


Figura 28: Mapa de calor da composição obtida por cromatografia a gás, acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) para o extrato fracionado hexânico de amostras de própolis de abelhas sem ferrão. A coloração das barras indica a porcentagem relativa no extrato. As siglas utilizadas correspondem às espécies nominadas, como indicado pela Tabela 1.

Contudo, não foi identificada a presença de ácido octadecanoico de maneira ampla nas amostras de *Melipona*, como previamente mencionado para *M. fasciculata* (DUTRA et al., 2019). Da mesma maneira, a presença de alcanos como tricosano,

pentacosano e heptacosano, presentes no extrato hexânico da cutícula das abelhas campeiras de *M. marginata* (FERREIRA-CALIMAN et al., 2010), não foram obtidos na amostra de própolis de *M. marginata* ou mesmo como compostos amplamente presentes nas amostras de *Melipona* deste estudo. Entretanto, como mencionado para na análise dos hidrocarbonetos (item 3.12), compostos com esse intervalo de cadeia carbônica foram obtidos. Assim, estudos mais amplos precisam ser feitos para que possam ser comparados mais profundamente hidrocarbonetos das própolis e das cutículas das abelhas.

Para a própolis de *Scaptotrigona* é documentada como marcante a presença de ácidos orgânicos e terpenos (AKATSU; SOARES, 2009; SAWAYA et al., 2009). Os dados obtidos corroboram essas indicações, tendo em vista a presença de glicerol (Fig. 26,27–A, e 28–20), Cicloartenol (Fig. 28–16 e 29–A) e alcenos de cadeia longa, como nonadec-1-eno (Fig. 28–1 e 29–E).

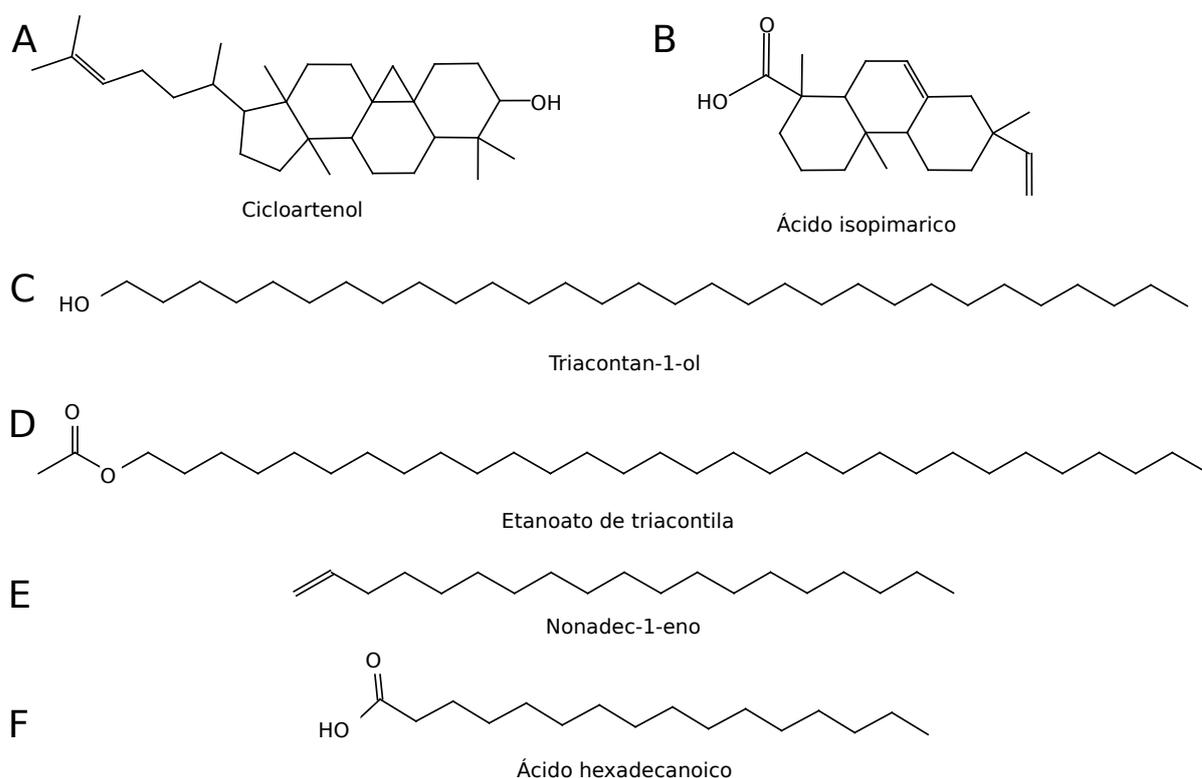


Figura 29: Principais compostos indicados pela biblioteca NIST no extrato fracionado de hexano dos extratos dos gêneros *Scaptotrigona* e *Melipona*.

Há também a indicação de lupenona (Fig. 26, 27–E, e 28–25), em todas as amostras de *Scaptotrigona* do Gurarujá (A), e também presente em algumas amostras de *Melipona*. Esse composto é mencionado como presente nas própolis de *Melipona* (DUTRA et al., 2019), e sua presença em *Scaptotrigona* não é tão extensamente documentada (PEREIRA; BICALHO; NETO, 2003).

Nas amostras de *Melipona*, predominaram ácido isopimárico (Fig. 28–12 e 29–B) e ácido desidroabiético (Fig. 28–10 e 27–B), componentes também presentes na extração das ceras (tópico 3.11) e este último também esteve presente no extrato fracionado de diclorometano. A presença de isômeros de ácido pimárico e ácidos terpênicos foi previamente documentada para *Tetragonula carbonaria* (MASSARO et al., 2011). A contribuição desses compostos para os extratos fracionados apolares de *Melipona* também parecem ter grande importância.

Em *Apis*, comumente nos extratos em hexano são documentadas a presença de alcanos, álcoois, e ésteres sobretudo de cadeia longa (STREHLE et al., 2003; RIGHI et al., 2011; OLEGÁRIO et al., 2019). Nos extratos hexânicos das amostras analisadas foram observados etanoato de triacontila (Fig. 29–D), nonadec-1-eno (Fig. 29–E), ácido hexadecanoico (Fig. 29–F), e triacontan-1-ol (Fig. 29–E) indicando, portanto, que ésteres, alcenos, ácidos graxos, e álcoois de cadeia longa também são encontrados nas própolis das abelhas sem ferrão.

3.15 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM)

Tendo em vista que o foco deste trabalho foi avaliar o perfil químico das amostras, verificando o grau de afinidades entre as espécies e o ambiente no qual foram coletadas, não foram apresentados aqui os espectros de massas das substâncias encontradas.

As amostras apresentaram maior semelhança pela origem geográfica do que pela espécie de abelha. Isso pode ser observado pelas amostras vindas de Jacuí (SB e SX), principalmente pela presença de derivados de kaempferol (Fig. 30). Assim como as de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5), que foram agrupadas quanto à origem (Fig. 30).

A presença de flavonoides, e compostos derivados de ácido cafeico são marcantes em própolis da Europa. Para própolis de origem tropical usualmente é observada uma maior preponderância de ácidos fenólicos e seus derivados prenilados (SALOMÃO et al., 2008; BACHEVSKI et al., 2020). Entretanto, para própolis de Meliponini brasileiras é documentado que a presença de compostos prenilados não é tão marcante (SUREK et al., 2021). O que é confirmado pelas amostras estudadas (Fig. 30).

Dentre os ácidos, o *p*-cumárico é o ácido fenólico mais predominante em amostras da Lituânia (LIAUDANSKAS et al., 2021). Entretanto, nas amostras analisadas, o ácido *p*-cumárico não foi identificado, apesar de vários outros ácidos fenólicos estarem presentes na maioria das amostras (Fig. 30).

Usualmente é mencionado que a própolis brasileira não apresenta altos teores de ácido cafeico (AKHIR; BAKAR; SANUSI, 2018). Mesmo que a predominância de compostos fenólicos tenha sido alta, a composição obtida para as amostras também não indica uma ampla presença desse ácido (Fig. 30), identificado somente para uma amostra de *M. quadrifasciata* proveniente da região de Cotia (OQ3). Usualmente, são encontrados altos teores de compostos fenólicos na própolis de *Apis*, inclusive como componentes majoritários (BANKOVA et al., 1994). Isso também foi observado para as amostras de Meliponini aqui estudadas.

A utilização de abordagens similares leva principalmente à identificação da presença de α -amirina na própolis (HALIM et al., 2012). Entretanto, com os dados aqui obtidos, esse composto é mais amplamente observado como componente do material volátil, e presente mais intensamente nos extratos fracionados apolares dos extratos. Assim, a presença desse composto foi mais profundamente discutida nos tópicos 3.13 e 3.14.

Nas própolis verdes de alecrim-do-campo é registrada uma maior presença de ácidos fenólicos ao ser comparada com a presença de flavonoides (MARCUCCI et al., 2021). Nos dados deste estudo, essa relação não parece ser condizente, tendo em vista que há um certo equilíbrio entre a proporção desses dois componentes, principalmente se incluídas as moléculas glicosiladas (Fig. 30).

A presença de kaempferida, flavonoide mencionado como típico da própolis brasileira (MARCUCCI et al., 2021), foi marcante para as amostras de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5) independente de sua origem, assim como para a amostra de *M. flavolineata* (EF). Isso pode estar associado a uma preferência da espécie ou mesmo a uma grande fidelidade na exploração de certas fontes vegetais (EROĞLU; ACAR; KEKEÇOĞLU, 2021).

Se faz importante comentar que na composição do mel de *M. flavolineata* também da região amazônica, predomina a quercetina entre os flavonoides (OLIVEIRA et al., 2012), ao passo que na amostra dessa espécie (EF), não obtivemos a identificação desse composto. A presença de quercetina é marcante em *S. bipunctata* proveniente da região Norte do Paraná (SUREK et al., 2021), enquanto das amostras analisadas neste trabalho (EF, AB e SB), somente a proveniente de Minas Gerais (SB), apresentou esse composto, indicando que alguns aspectos regionais podem impactar a composição da própolis.

A presença de ácido rosmarínico não é tão amplamente observada para amostras de própolis, mas esteve presente em estudos comparativos de subespécies de *Apis* sp. (EROĞLU; ACAR; KEKEÇOĞLU, 2021). As amostras de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5), *M. marginata* (AM) e *S. postica* (YP) foram as que principalmente tiveram esse composto identificado em sua composição.

Com todo o conjunto de dados, foi elaborada uma análise de componentes principais visando identificar os grupos de compostos mais determinantes sobre a composição das própolis (Fig. 31). Observa-se que um grande número de compostos se situam ao centro do gráfico, indicando que esses estão mais uniformemente distribuídos entre as amostras (Fig. 31).

Aquelas com composição mais diversa são as provenientes de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5) independente da origem, principalmente pela presença de flavonóis como derivados de isoramnetina e kaempferol, além da presença de derivados de vitaminas do complexo B (Fig. 31). Isoramnetina, ramnetina e quercetina são compostos que tem sua presença sendo confirmadas na própolis brasileira desde os anos 2000 (ANJUM et al., 2018). Alguns deles são mais preponderantes em própolis provenientes de determinadas localidades do mundo, como, por exemplo, a presença marcante de isoramnetina em própolis provenientes da Turquia (EROĞLU; ACAR; KEKEÇOĞLU, 2021).

Uma diversidade intermediária foi encontrada para *M. mondury* (OR2), *S. tubiba* (AT), *S. postica* (YP), e *S. xanthotricha* (AX), que são diferenciadas das outras principalmente pela presença de vitamina A (Ácido retinoico) (Fig. 31).

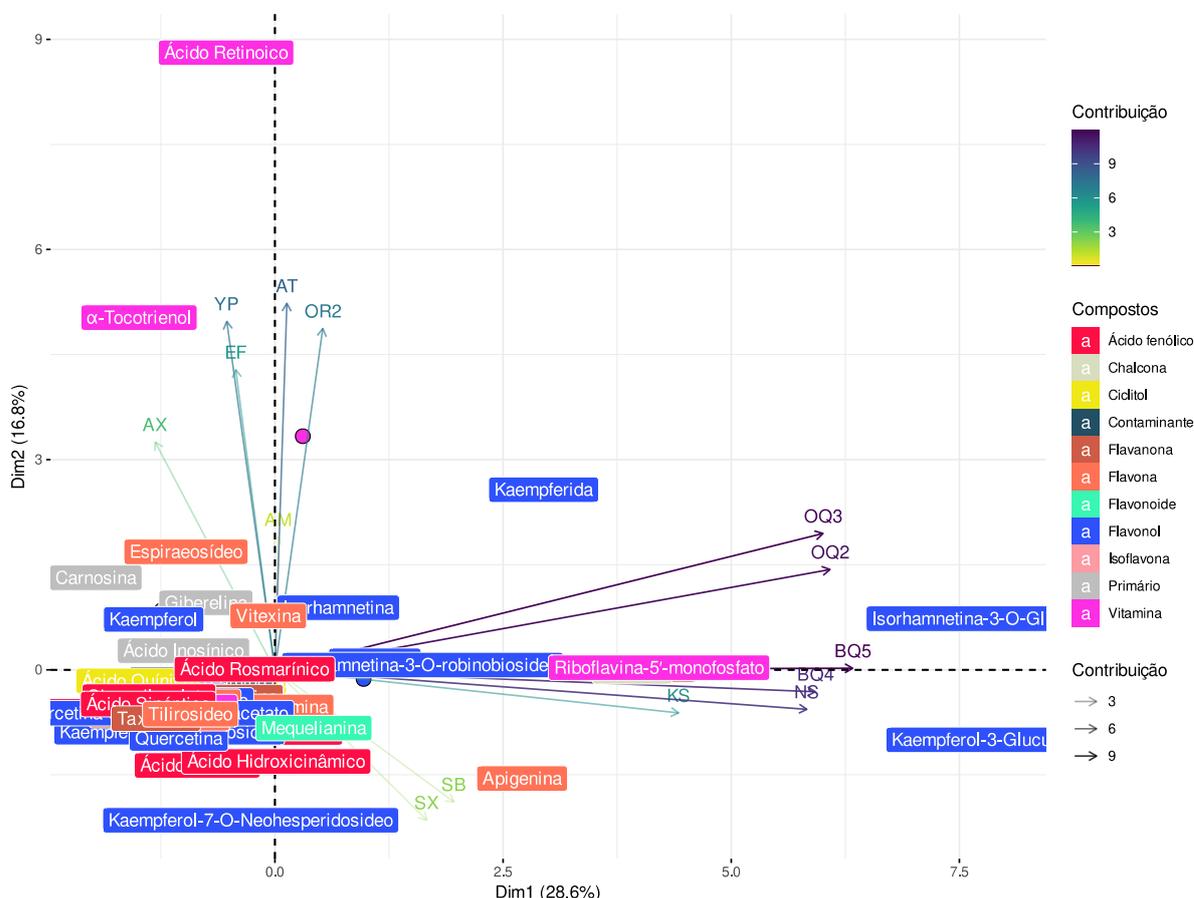


Figura 31: Análise de componentes principais (PCA) para os principais grupos de compostos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tanto a cromatografia a gás (3.11), quanto a líquida indicaram a presença de vitamina A e B em algumas amostras estudadas. Apesar de não serem os compostos mais abundantes, a presença de vitaminas é relatada para a própolis (BITTENCOURT et al., 2015; ANJUM et al., 2018; POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; KHLEIFAT et al., 2021). Também já foi documentada a presença de vitaminas do complexo B em amostras de própolis de abelhas do gênero *Trigona* (MULYATI et al., 2021), e maiores teores de vitaminas também parecem estar associadas com uma melhor atividade cicatrizante da própolis (ANJUM et al., 2018).

Como a principal fonte de resina vegetal da própolis verde brasileira corresponde à exploração de ramos jovens de *Baccharis dracunculifolia*, a presença de terpenos, lignanas, derivados prenilados de ácido *p*-cumárico assim como acetofenonas e flavonoides são muito marcantes (BITTENCOURT et al., 2015; ZHAO et al., 2017). O que observamos é que a composição das própolis de Meliponini apresenta grandes variações, muito possivelmente associada com a exploração de outros grupos vegetais, compondo um arranjo ainda mais diverso. Mesmo quando em um mesmo ambiente, *Apis* e membros de Meliponini não costumam explorar as mesmas fontes vegetais de resina. Entretanto, existem algumas exceções, como indicado para *Mangifera indica* (POPOVA et al., 2021).

Os compostos galangina (Fig. 32–B), apigenina (Fig. 32–C) e kaempferol (Fig. 32–F), foram obtidos nas amostras (Fig 30), sendo moléculas mencionadas como muito comum nas própolis verde de *Apis*, (DAMODARAN, 2021), em conjunto com os flavonoides crisina, quercetina e pinocembrina e pinobanksina compõem o grupo de compostos mais representativos em própolis no mundo (HUANG et al., 2014).

Além desses, a presença de Artepilina C (Fig. 32–D) é extensamente mencionada para a própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020), entretanto, das amostras estudadas, somente *M. marginata* do Gurarujá (AM) e as amostras de *M. quadrifasciata* de Minas Gerais (BQ4 e BQ5) esse composto foi identificado (Fig.30). Esse é um componente utilizado como marcador da fonte vegetal para a própolis de *Apis*, e neste caso, depreendemos que para Meliponini esse não é um composto tão determinante da composição química. Aspecto também destacado por outros autores (SUREK et al., 2021). Com relação à composição da própolis de Meliponini, a presença de ácido cinâmico, gálico e cafeico foram reportados para as própolis de *Tetragonisca angustula* (ZHAO et al., 2017). Além disso, para a própolis de alecrim-do-campo os ácidos fenólicos são bem mais preponderantes e diversos ao ser comparada com a composição de flavonoides (MARCUCCI et al., 2021). Grande frequência de ácidos fenólicos também é algo estranhamente comum para as própolis provenientes de regiões tropicais, principalmente devido ao acesso das abelhas a uma diversidade vegetal muito grande (ÇELEMLI, 2013; MARCUCCI et al., 2021). Contudo, um baixo teor de ácidos fenólicos foi identificado nas amostras estudadas (Fig. 30).

Os flavonoides, catequinas, morina e quemperol são os mais comuns em própolis de Meliponini (ZHAO et al., 2017). Os dados obtidos corroboram essa informação, principalmente com compostos associados a kaempferol (Fig. 32-F). Apesar de não ter sido identificada a presença de morina nas amostras.

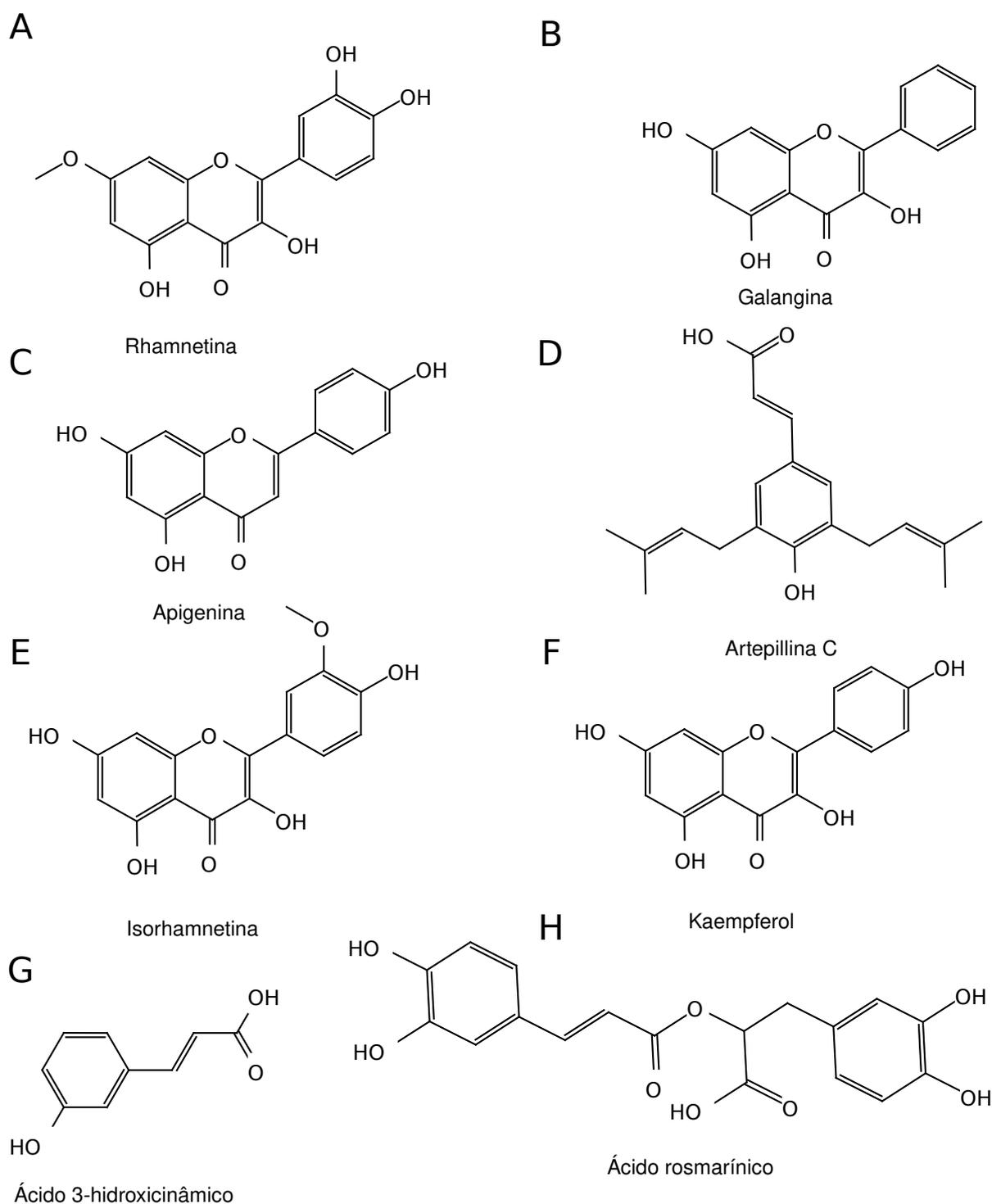


Figura 32: Principais compostos fenólicos obtidos por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência através de comparação com os padrões e análise de espectro de massas.

Na literatura também há indicações de que na própolis de *M. subnitida* há uma presença marcante de 7-O-metilnarigenina (ZHAO et al., 2017). Esse composto

não foi identificado nas amostras trabalhadas (Fig. 30), e ainda foram pouco usuais a presença de flavonoides metilados.

Não são amplamente encontrados compostos glicosilados, principalmente mono e diglicosídeos, embora açúcares sejam frequentemente encontrados na própolis (ÇELEMLI, 2013). Contudo, nas amostras analisadas, foram obtidos compostos com glicídios associados (Fig. 33). O que vem sendo mais frequentemente identificado para própolis provenientes de regiões tropicais, com fontes vegetais mais diversas (RISTIVOJEVIĆ et al., 2018).

A indicação da presença desses compostos é até certo ponto esperada do ponto de vista da polaridade considerando que flavonoides glicosilados apresentam maior solubilidade em solventes polares (AGUIAR et al., 2007). Ainda que a presença desse composto seja tida como rara em própolis (MARCUCCI et al., 2021). Isso é atribuído principalmente ao fato de enzimas salivares das abelhas possam ser capazes de hidrolisar os compostos, separando esses dois componentes (ÇELEMLI, 2013; ALANAZI et al., 2021). Entretanto, ainda não foram obtidas evidências contundentes dessa transformação química (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018; ALANAZI et al., 2021). O papel que os microrganismos presentes na própolis podem apresentar nesse processo também é pouco conhecido, entretanto, a capacidade de bactérias e fungos de alterar alguns desses compostos já foi identificada (AGUIAR et al., 2007).

A presença de Genisteína (Fig. 30), uma isoflavona, para as amostras de *M. subnitida* (NS e KS) é extremamente importante, tendo em vista que esse grupo de compostos são importantes marcadores químicos de Fabaceae. O uso de resinas dessa família de plantas para composição da própolis de *Apis* já é reconhecido (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018). No caso das abelhas sem ferrão, essa família de plantas tem grande importância na composição do pólen (BISUI; LAYEK; KARMAKAR, 2019), e observações da coleta de resina por alguns membros de *Scaptotrigona* e *Teragonisca* já foram mencionados anteriormente (AKATSU; SOARES, 2009; REGNIER, 2021). Entretanto, neste estudo há uma indicação nova de que *Melipona* também pode explorar a resina de Fabaceae para compor a própolis.

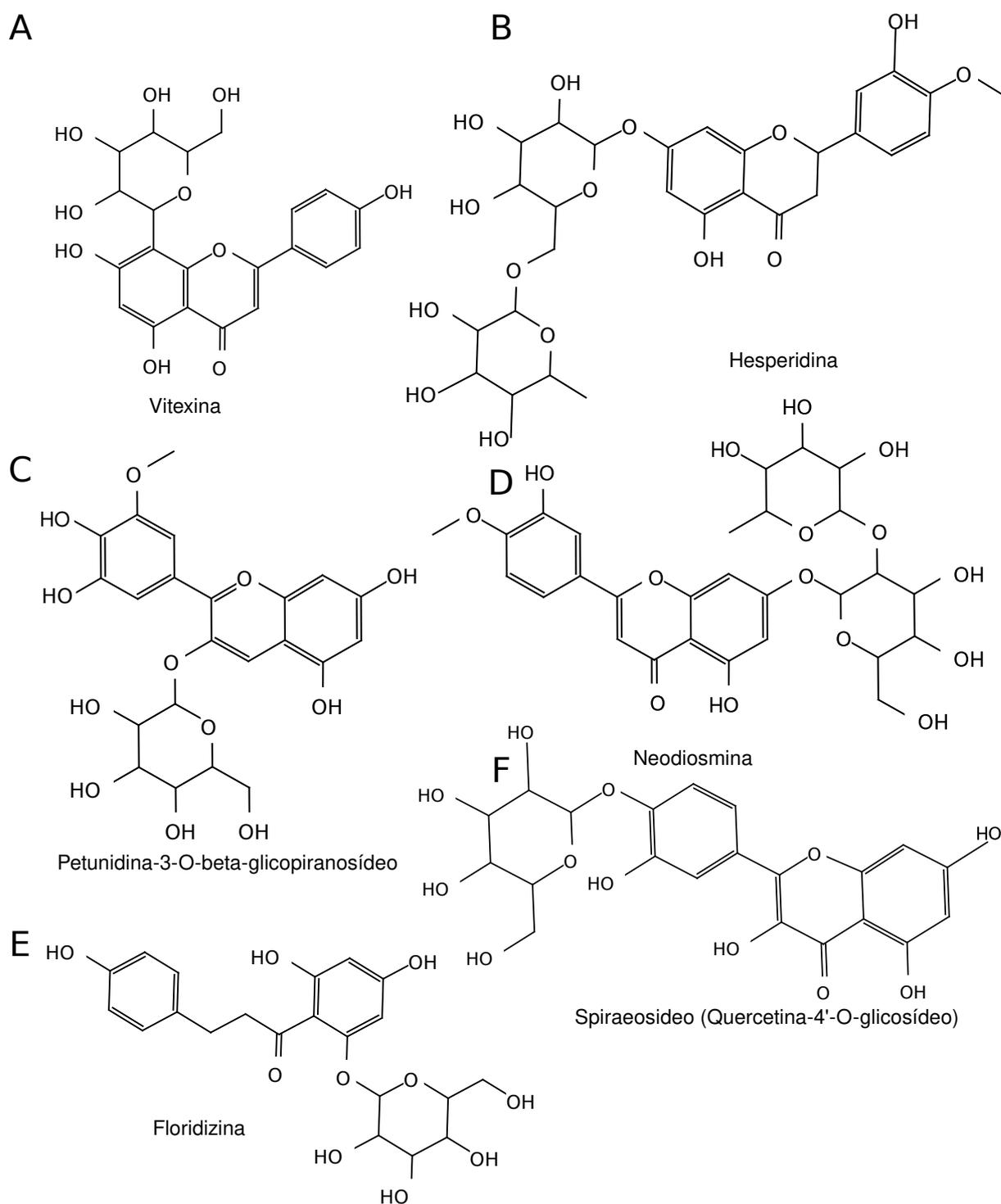


Figura 33: Flavonoides glicosilados presentes nas amostras de própolis.

A atividade antioxidante de ácidos fenólicos é inversamente proporcional ao tamanho da entalpia de dissociação das ligações O-H presentes no núcleo aromático em um ambiente pouco polar (KUREK-GÓRECKA et al., 2014). Desse modo, o au-

mento de hidroxilações associadas a núcleo benzênicos apresenta maiores atividades antioxidantes, tal como as hidroxilações do ácido cafeico, promovem uma atividade antioxidante mais intensa do que ao ser comparada com o ácido *p*-cumárico (KUREK-GÓRECKA et al., 2014). Na própolis, compostos com alto número de hidroxilações em núcleos benzênicos costumam ser comuns, e isso confere a esse produto uma intensa atividade antioxidante, como se pode perceber nos compostos obtidos nas amostras analisadas (Fig. 33). Esses aspectos serão mais profundamente discutidos na seção seguinte (3.16).

3.16 Análise de atividade Antioxidante

3.16.1 Atividade sequestradora de radical DPPH*

Dependendo da metodologia de extração são observadas diferenças entre amostras (DAMODARAN, 2021). Estudos preliminares da atividade antioxidante indicam que existem fatores-chave que afetam a composição da própolis, e, também podem influenciar os resultados para as própolis de Meliponini. Alguns deles são: a espécie de abelha, a zona geográfica, a composição vegetal local, estação de produção da própolis, momento da coleta, assim como método de extração (AKHIR; BAKAR; SANUSI, 2018). É apontada também uma correlação alta entre os conteúdos de flavonoides ou de fenóis totais, e os resultados de DPPH devido a maiores concentrações desses compostos resultam em maior atividade antioxidante (COTTICA et al., 2011).

Alguns meliponicultores mencionam que produzem cosméticos como hidratantes e sabões a partir da porção da própolis solúvel em matrizes oleosas. Além disso, a própolis é classificada como um antioxidante forte (JASPRICA et al., 2007). Sendo, portanto, importante explorar a atividade antioxidante de maneira ampla, incluindo as frações apolares das amostras, podendo identificar o potencial antioxidante obtido para essas outras formas de extração (BITTENCOURT et al., 2015; LI-AUDANSKAS et al., 2021).

Foram obtidas variações consistentes entre os extratos de uma mesma amostra (Fig. 34). O comportamento para a atividade antioxidante até mesmo para os materiais da mesma espécie foram muito diferentes. De maneira geral, os extratos brutos etanólicos (Bet), os extratos fracionados de acetato de etila (Ae) e etanol

(Et) apresentaram as maiores atividades antioxidantes (Fig. 34). Ao passo que a maioria dos extratos fracionados de hexano (Hx) e diclorometano (Dm) apresentaram baixa atividade.

O mecanismo do procedimento com DPPH se baseia na presença de moléculas doadoras de hidrogênio no extrato que reagem com radical DPPH (BITTENCOURT et al., 2015). Com isso, o grupo reconhecido como principal responsável pela atividade antioxidante em própolis para essa metodologia são os compostos fenólicos (ÇELEMLI, 2013; HUANG et al., 2014; GRANATO et al., 2018). Extrações com solventes polares são os mais adequados para a obtenção dessa classe de compostos, sendo o etanol o solvente mais indicado para a extração de própolis (MARTINOTTI; RANZATO, 2015). Com isso, é esperado que frações gradualmente mais polares apresentem maior atividade antioxidante por essa abordagem, o que é obtido para a maioria das amostras estudadas (Fig. 34 e 35). Como as diferenças obtidas entre as curvas de dose resposta dos extratos de *M. subnitida* do produtor K (KS).

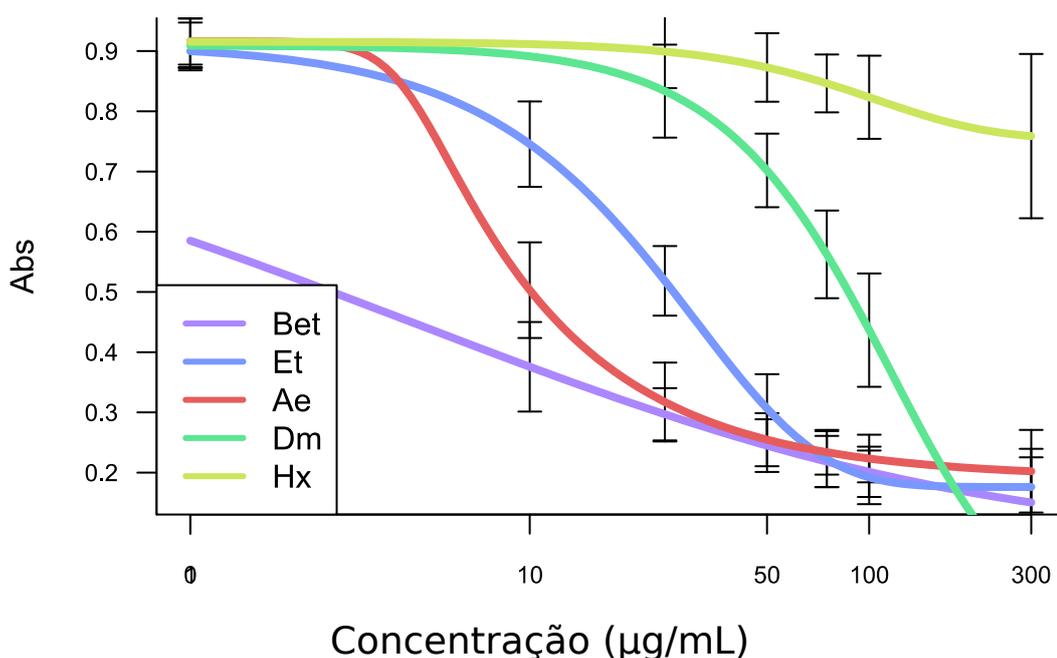


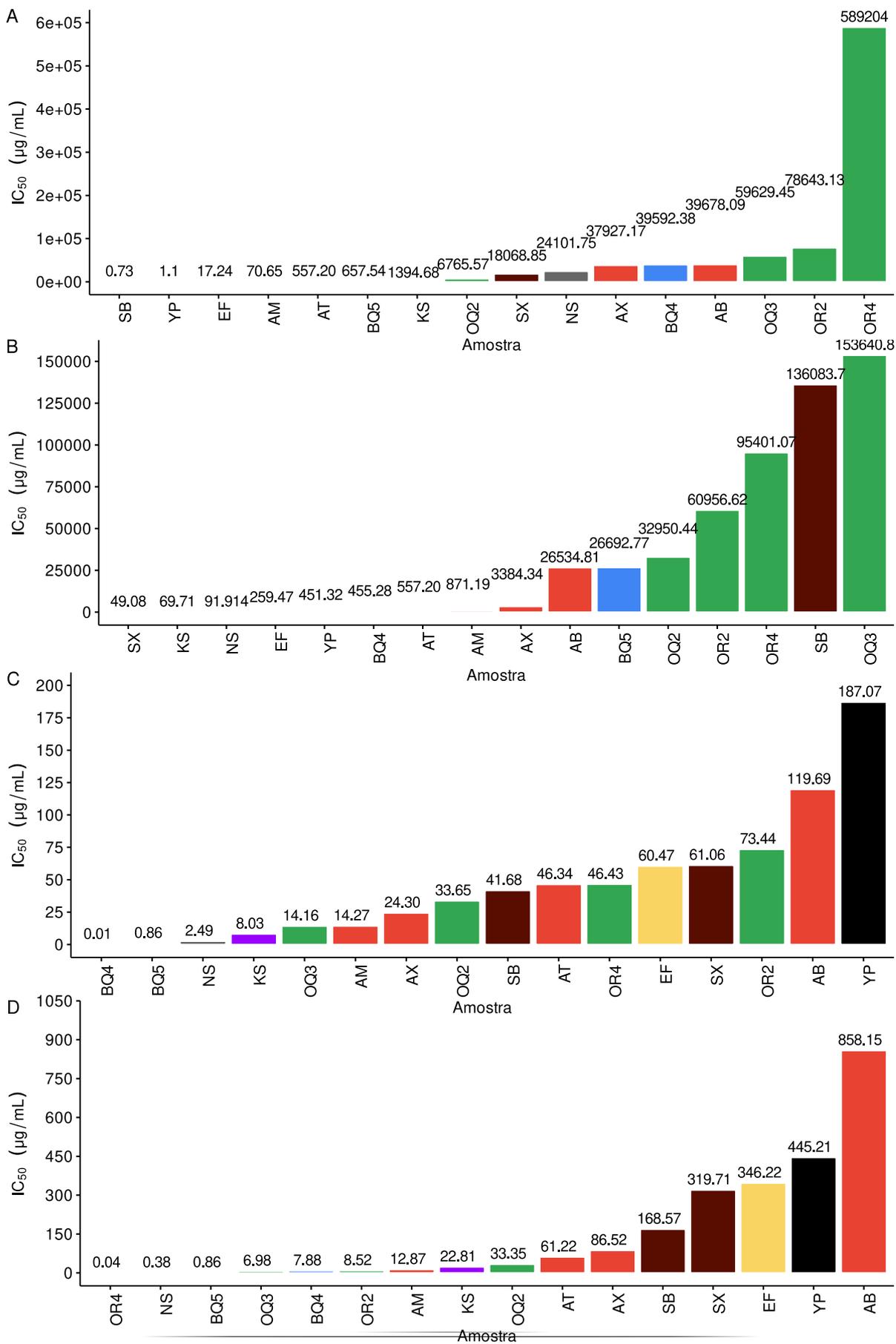
Figura 34: Curvas de dose resposta para o extrato de *M. subnitida* do produtor K, com intensa atividade antioxidante. Estão representadas as curvas dos extratos brutos etanólicos (Bet), e os extratos fracionados de etanol (Et), acetato de etila (Ae), diclorometano (Dm), e hexano (Hx).

Alguns autores mencionam ainda que a porcentagem com melhor rendimento desses compostos está na proporção de etanol-água contendo 70% ou mais etanol (CUNHA et al., 2004). Enquanto a utilização de outros solventes como glicerina ou propileno glicol são mais usuais na indústria farmacêutica e cosmética (MARTINOTTI; RANZATO, 2015), solventes de polaridade intermediária como acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, são mais utilizados em fins de pesquisa.

Os valores obtidos para o índice de IC_{50} reforçam o padrão observado anteriormente, nas quais os extratos de solventes apolares apresentam menor atividade antioxidante (Fig. 35). De modo que os extratos fracionados de hexano e diclorometano apresentam menor atividade antioxidante ao serem comparadas com os extratos fracionados de etanol, acetato de etila ou mesmo o extrato bruto etanólico, fato já previamente mencionado na literatura (AKHIR; BAKAR; SANUSI, 2018; DO NASCIMENTO et al., 2019; DAMODARAN, 2021). Usualmente, extrações usando solventes mais polares a diversidade de compostos fenólicos é maior (POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019; HOCHHEIM et al., 2020), sendo esperada uma maior atividade.

Porém, foi observada a presença de alguns ácidos fenólicos, que apresentam atividade antioxidante no extrato fracionado de hexano e diclorometano pela cromatografia gasosa (item 3.14) o que poderia explicar a consistente atividade encontrada para o extrato fracionado hexânico das amostras de *S. bipunctata* (SB) e *S. postica* (YP) (Fig. 35–A), assim como o diclorometânico de *S. xanthotricha* (SX) e *M. sunitida* (NS e KS) (Fig. 35–B). Em alguns casos, extrações de produtos naturais com solventes de polaridade intermediária também apresentam altos índices de atividade antioxidante (PRAKASH et al., 2020).

Compostos como ácido clorogênico, e antocianidinas são relatados como componentes com favorecida atividade antioxidante para a metodologia de DPPH (TUNGMUNNITHUM et al., 2018). Contudo, não foi identificada a presença desses componentes nos extratos pela cromatografia líquida (Fig. 30). No extrato bruto etanólico, os compostos fenólicos, principalmente flavonóis foram predominantes (Fig. 30), o que poderia explicar a intensa atividade obtida nesse extrato da maioria das amostras (Fig.35–E).



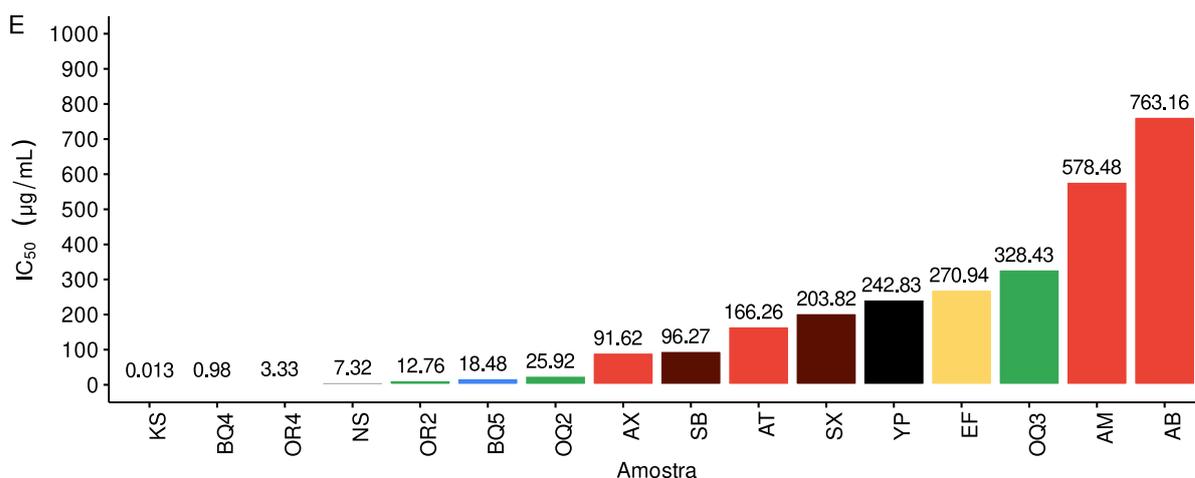


Figura 35: Valores de IC₅₀ obtidos para o método de DPPH* em amostras de própolis e Meliponini de acordo com o solvente utilizado na extração: **A** – Hexano **B** – Diclorometano, **C** – Acetato de etila, **D** – Etanol, **E** – Extração bruta etanólica. As cores se referem ao meliponário de origem. As cores utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

A localização das amostras influenciou pouco a atividade antioxidante por DPPH. A espécie de abelha pareceu ter mais relação com a atividade obtida (Fig. 35). No entanto, as amostras de Cotia (O) (Fig. 35—cor verde) apresentaram uma afinidade crescente com a redução da polaridade do solvente do extrato. O que poderia indicar um certo grau de influência regional na atividade antioxidante. Com relação à composição desses extratos, a cromatografia gasosa revelou a presença unânime de ácido isopimárico, e desidroabitético nas amostras desse produtor (Fig. 28). O fenômeno de agrupamento de amostras de um mesmo produtor também foi obtido para *Apis* e em *Meliponini* (PEREIRA; BICALHO; NETO, 2003).

É reconhecido que a própolis de *Apis* é composta principalmente por compostos fenólicos, sobretudo flavonoides e ácidos fenólicos, que são moléculas fortemente antioxidantes (JASPRICA et al., 2007). Compostos identificados como presentes nas amostras na análise de cromatografia líquida (item 3.15). Portanto, é esperado que uma maior atividade antioxidante seja obtida para extratos mais polares. Especialmente pela maior solubilidade dessa classe de composto no grupo de solventes polares.

Existe uma boa consistência entre o extrato bruto etanólico e o extrato fracionado etanólico (Fig. 35—D e E). Desse modo, valores similares foram obtidos para a mesma amostra quando tratada diretamente com etanol (Fig. 35—E), ou mesmo

após extrações sucessivas com outros solventes (Fig. 35–D). O extrato bruto etanólico é uma abordagem importante em estudos com própolis principalmente por ser o método de extração com objetivo comercial mais comum (MARTINOTTI; RANZATO, 2015).

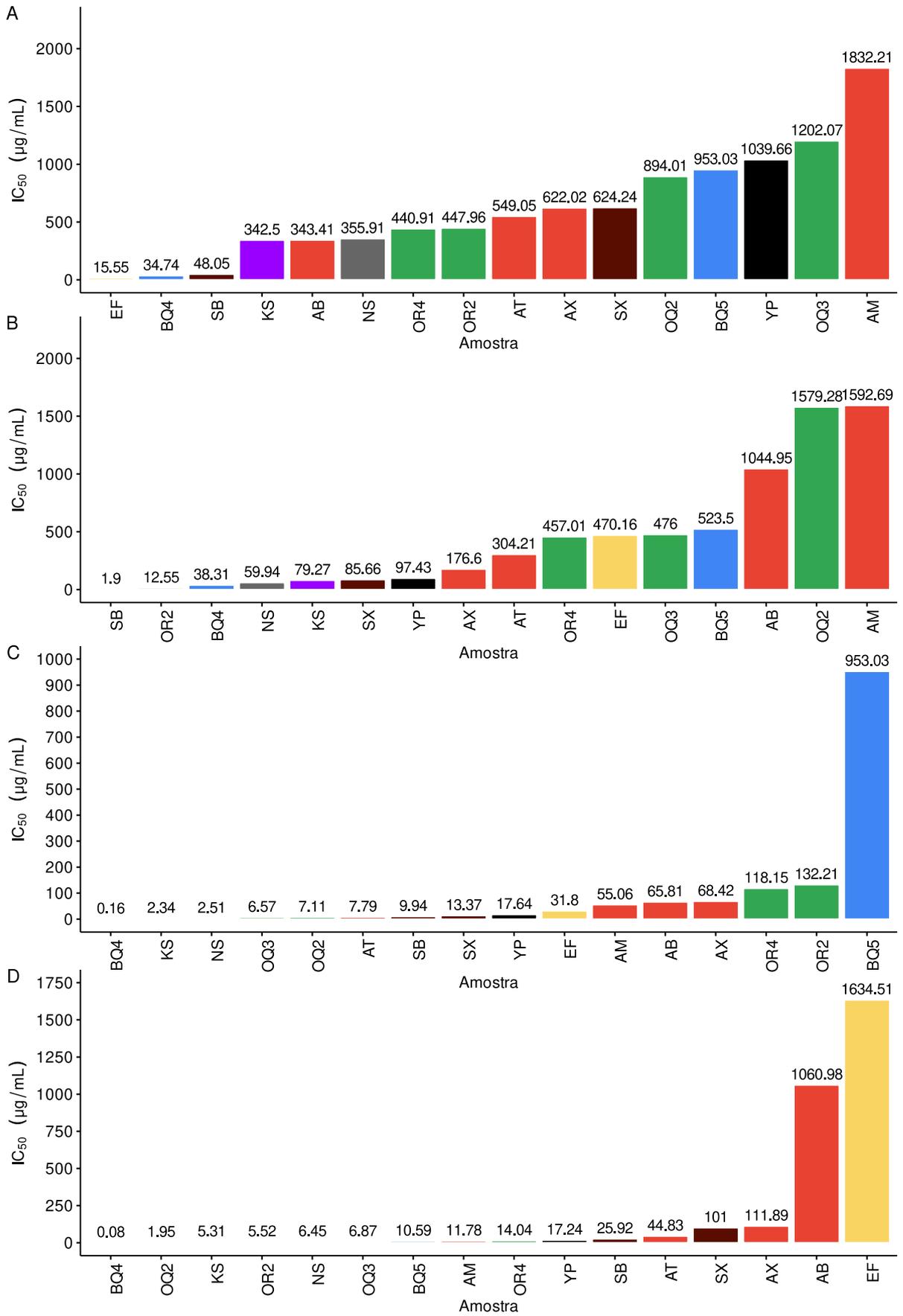
Além disso, existem diversas abordagens utilizadas na extração bruta, principalmente com relação à proporção de etanol–água. Usualmente as variações recomendadas ficam entre 70 e 100% de etanol, havendo alteração do rendimento entre elas (PEREIRA; BICALHO; NETO, 2003; BANKOVA et al., 2019) e a atividade biológica (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020). A consistência obtida entre os métodos de extração com etanol é um novo indicativo de que os compostos que são capazes de promover maiores atividades antioxidantes são mais facilmente extraídos com esse do que com os solventes de menor polaridade.

Os valores de IC_{50} usualmente mencionados para própolis pela metodologia de DPPH fica em torno de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (KHLEIFAT et al., 2021). Em nossos resultados, algumas das amostras apresentam atividade antioxidante ainda maior para os extratos em hexano de *S. bipunctata* (SB) e *S. postica* (YP) (Fig. 35–A) e para a amostra de *M. subnitida* (NS) com a extração bruta etanólica (Fig. 35–E) que apresentam, respectivamente 0,73, 1,1, 0,013 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para as outras amostras e formas de extração, os valores são superiores ao mencionado, indicando uma baixa atividade utilizando esse parâmetro (Fig. 35).

Outras avaliações da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *M. quadrifasciata* apresentaram valores de EC_{50} entre 28.9 e 60.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto o extrato bruto etanólico atinge cerca de 21.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a metodologia de DPPH (BUDÓIA, 2019). O intervalo aqui obtidos foi bem maior do que os mencionados (entre 0,98 e 328,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indicando uma atividade antioxidante mais variável (Fig. 36). Além do fato de ter sido obtido um intervalo de atividade mais intenso para o extrato de etanol, com valores de 0,86 a 33,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ao ser comparado ao extrato bruto etanólico que apresentou de 0,98 a 328,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 36).

3.16.2 Atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}

Pelo método de atividade sequestradora do radical ABTS, um padrão similar ao obtido para o método DPPH pôde ser encontrado (Fig. 36). Os extratos fraciona



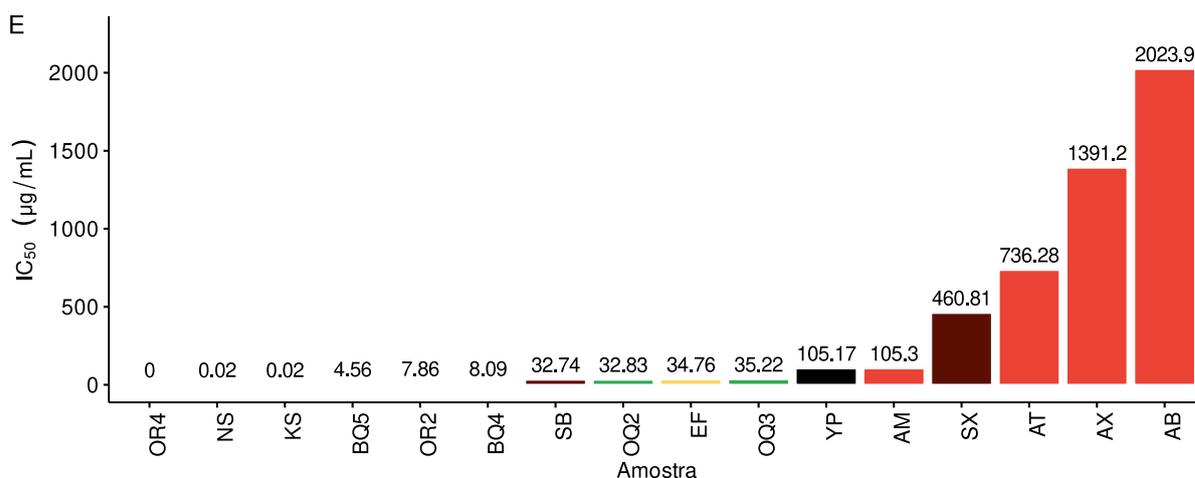


Figura 36: Valores de IC₅₀ obtidos para o método de ABTS em amostras de própolis de Meliponini de acordo com o solvente utilizado na extração: **A** – Hexano **B** – Diclorometano, **C** – Acetato de etila, **D** – Etanol, **E** – Extração bruta etanólica. As cores se referem ao meliponário de origem. As cores utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

dos polares, especialmente de etanol (Fig. 36-D) e de acetato de etila (Fig.36-C) apresentaram os melhores índices de IC₅₀. De maneira que o gradual aumento de polaridade resulta em uma redução do valor, indicando o aumento da atividade antioxidante para a maioria das amostras (Fig. 36).

Para as amostras provenientes do Guarujá (Fig. 36–Vermelho) o extrato bruto etanólico (Fig. 36–E) apresentou menor atividade antioxidante ao ser comparado com a extração etanólica (Fig. 36). Em geral, diluições seriadas são capazes de promover uma melhor separação dos componentes e conseqüentemente promover diferentes respostas. Para esse grupo de amostras, a sequência de solventes pareceu ter um efeito mais eficiente para separação dos componentes que apresentam atividades antioxidantes. Contudo, não foi observado esse feito de maneira tão pronunciada para a metodologia de DPPH (Fig. 35).

É reconhecido que a própolis de *Apis* é composta principalmente por componentes fenólicos, notadamente flavonoides e ácidos fenólicos, que são moléculas fortemente antioxidantes (JASPRICA et al., 2007). Esse grupo de compostos foi amplamente identificado como presentes nas amostras na análise de cromatografia líquida (item 3.15). Portanto, é esperado que uma maior atividade antioxidante seja

obtida para extratos mais polares (Fig. 36-D e E). Acima de tudo pela maior solubilidade desse grupo de composto nesse solvente.

Outros autores encontraram melhores atividades antioxidantes para os extratos com polaridade ainda maior, ao utilizar maiores proporções de água na extração com etanol (COTTICA et al., 2011; LIAUDANSKAS et al., 2021). Ao passo que outros pontuam que extrações com maior proporção de etanol exibiram maiores atividades biológicas (CUNHA et al., 2004). Com os dados aqui apresentados, comparando-se os extratos mais apolares com os extratos mais polares, o aumento de polaridade levou a um aumento generalizado da atividade antioxidante, de modo que os valores necessários para atingir 50% da atividade gradualmente se reduzem. Esse efeito ocorre principalmente para as amostras de própolis de *Melipona* e de maneira independente da origem (Fig. 36).

É importante notar que os solventes mais apolares (diclorometano e hexano) apresentaram os valores mais baixos que os obtidos na metodologia com DPPH, portanto, indicando maior atividade antioxidante. O método de ABTS é utilizado por sua amplitude de detecção de compostos antioxidantes tanto hidrofílicos quando hidrofóbicos, como vitamina E, e carotenoides (RE et al., 1999). De modo que este é um ensaio mais responsivo para sistemas hidrofóbicos (APAK et al., 2016). Dessa forma, a maior amplitude de detecção que essa metodologia apresenta pode ser responsável pelos resultados de maior atividade antioxidante para os extratos pouco polares.

Desde os anos 2000, alguns estudos vêm demonstrando que os extratos apolares de *Apis* podem conter carotenoides (KUREK-GÓRECKA et al., 2014), além dos terpenoides em sua composição (HUANG et al., 2014), e assim, apresentam um potencial de atividade antioxidante maior (ELLISON, 2016). Tendo em vista que alguns extratos apolares possuem reduzidos valores de EC_{50} , podem estar presentes compostos como os mencionados. Ainda que pelas cromatografias não tenha sido identificada a presença especificamente de carotenoides nas amostras deste estudo, foi observada a presença de vitamina A (item 3.15), o que poderia estar relacionado com o padrão de atividade antioxidante observado. Considerando que principalmente essa vitamina apresenta consistente atividade antioxidante em múltiplos testes, inclusive o ABTS (PALACE et al., 1999).

Ao examinar a figura 30, *M. mondury* (OR2), *M. quadrifasciata* (OQ2 e OQ3) e *M. flavolineata* (EF) possuem em sua própolis, ácido retinoico, mas apresentaram altos valores de IC₅₀ portanto baixa atividade antioxidante (Fig. 36). Os extratos de acetato de etila, fração metanólica e extrato etanólico bruto mostraram o alto poder antioxidante de *M. subnitida* (NS e KS). De acordo com as identificações em CLAE/massas, essa espécie de Mossoró apresentou riboflavina e riboflavina-5'-monofosfato em sua constituição, além de várias substâncias fenólicas (Fig. 30). Desse modo, com essa metodologia também há uma consistência da atividade entre amostras provenientes de uma mesma espécie de maneira mais consistente do que a obtida para a análise com DPPH (item 3.16.1).

O potencial antioxidante apresentou grandes variações entre os extratos fracionados apolares das amostras. O material proveniente da mesma espécie, porém de produtores diferentes apresentaram grandes flutuações (Fig. 36-A a C). Especialmente para *M. quadrifasciata*, em que somente a amostra BQ4 apresentou alta atividade antioxidante no extrato de hexano, enquanto as outras amostras da mesma espécie, incluindo a que é proveniente do mesmo meliponário, não apresentaram a mesma intensidade de atividade para esses extratos (Fig. 36-A). Além da disparidade de atividade antioxidante, a variação de composição entre as amostras de *M. quadrifasciata* desse produtor, foi demonstrada pela cromatografia a gás (Fig 28).

Essas variações de ação antioxidante entre amostras de mesma origem também foram observadas para estudos envolvendo *Apis* (TEIXEIRA et al., 2005; HERRERA-LÓPEZ et al., 2019; FERREIRA et al., 2019). Os quais atualmente continuam a trazer a discussão sobre como as abelhas se comportam em um mesmo ambiente, não necessariamente explorando as mesmas plantas como fonte de resina estando em um mesmo produtor (POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019).

Comparando-se os dois gêneros estudados, observamos que para a maioria dos extratos provenientes de *Scaptotrigona*, a atividade antioxidante foi menor ao ser comparada com os valores obtidos para *Melipona* (Fig. 36). Esses dois gêneros compreendem abelhas muito distintas morfológicamente (MICHENER, 2007). Diferenças essas que impactam diretamente o alcance de voo (ARAÚJO et al., 2004; SILVA; RAMALHO; ROSA, 2021), e possivelmente o conjunto vegetal que pode ser utilizado como fonte de resina. Assim, essa menor capacidade de exploração, pode afe-

tar a composição e conseqüentemente se refletir em uma menor atividade biológica dos extratos.

Os resultados obtidos para a metodologia de ABTS (Fig. 36) foram ligeiramente diferentes do que foi observado para a de DPPH (Fig. 35). O método de ABTS é mais amplamente utilizado para aferir a capacidade antioxidante da própolis de *Apis* (BANKOVA et al., 2019). Contudo, alguns autores afirmam que o DPPH é mais adequado por sua maior estabilidade e solubilidade ao ser comparado com ABTS, promovendo resultados mais confiáveis sobre a atividade antioxidante total do extrato (JASPRICA et al., 2007). Entretanto, além da capacidade de interagir com componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, assim como ter sido utilizado em compostos puros ou extratos alimentares complexos (RE et al., 1999), a metodologia com radical ABTS fornece uma boa relação com o conteúdo total de compostos fenólicos (FLOEGEL et al., 2011). Esse conjunto de características possibilita identificar atividade antioxidante de compostos não facilmente evidenciada pela metodologia de DPPH. O que poderia explicar os valores de DPPH mais altos do que os de ABTS, especialmente para os extratos pouco polares (Fig. 36-A e B). Além da maior atividade para as amostras com maior teor de compostos fenólicos de diferentes grupos (Fig. 31).

Contudo, restringir a mensuração da atividade antioxidante a um único método não é indicado, justamente pelas características de cada uma das metodologias favorecerem a presença de alguns compostos. Sendo assim, são recomendados ao menos duas abordagens para essa avaliação (LIAUDANSKAS et al., 2021). Com os dados aqui obtidos isso é reforçado, principalmente pela diferença da intensidade de atividade obtida entre as amostras, de modo que o grupo de amostras com melhor atividade difere, dependendo da abordagem utilizada (Fig. 35 e 36).

Os dados obtidos são coerentes com os apresentados previamente na literatura, em que há uma abrangência de valores de EC_{50} entre 9,5 até 13,5 $\mu\text{g/mL}$ (DOS SANTOS et al., 2017a; PEIXOTO et al., 2021) para extratos etanólicos. Os valores são, até certo ponto, correspondentes com a metodologia de ABTS, principalmente para as amostras de *M. quadrifasciata* de São Paulo (BQ4 e BQ5), *M. subnitida* independentemente da origem (NS e KS), e *M. mondury* (OQ2 e OQ3) de Cotia (Fig. 36-E). Ainda com relação a *M. quadrifasciata*, o poder antioxidante do extrato fracionado etanólico foi de 0,08 $\mu\text{g/mL}$ e 10,59 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para as amostras de São Paulo BQ4 e BQ5. As amostras de Cotia, apresentaram uma ação antioxidante de

1,95 µg/mL e 6,87 µg/mL, respectivamente, para OQ2 e OQ3. Entretanto, apenas os extratos etanólicos brutos de *M. quadrifasciata* do produtor de São Paulo, mostrou alto poder antioxidante, com valores de 4,56 µg/mL e 8,09 µg/mL (Fig. 36-D e E). *M. quadrifasciata* do produtor de Cotia, apresentaram baixo poder antioxidante, com valores de 32,83 µg/mL e 35,22 µg/mL, respectivamente, para OQ2 e OQ3 (Fig. 35-E).

Se faz importante mencionar que para os extratos brutos etanólicos de Cotia, uma menor atividade foi observada, sendo necessários entre 32.83 até 35.22 µg/mL para os mesmos resultados (Fig. 36-E). O que poderia ser uma influência das diferenças de rendimento dos extratos, tendo em vista que apresentaram uma grande proporção de compostos mais apolares como terpenoides (item 3.15), que não estão presentes em uma proporção tão alta no extrato fracionado etanólico, devido ao fracionamento de solventes apolares se dar anteriormente.

Via de regra, própolis provenientes de regiões tropicais tem demonstrado maiores atividades biológicas, representando o impacto da diversidade vegetal (MARTINOTTI; RANZATO, 2015). Neste estudo também podemos observar que as variações entre amostras de mesma espécie, mas de diferentes regiões também apresentam grande diversidade de composição (Fig. 36), o que também pode ser reflexo da biodiversidade presente nessas regiões do mundo, alterando a composição de maneira local também.

3.16.3 Capacidade de Absorção de Radicais Oxigenados (ORAC)

Nessa abordagem, o ganho de área temporalmente representa a presença de compostos antioxidantes, assim quando maior o valor de área relativa ao controle, melhor capacidade antioxidante do extrato (GILLESPIE; CHAE; AINSWORTH, 2007).

Para essa metodologia foram observadas diferentes respostas antioxidantes. Para o extrato em hexano é encontrada uma alta atividade para as amostras provenientes do Guarujá (A) e de São Paulo (B) (Fig. 37-A), enquanto as de Cotia (O) apresentam uma menor atividade para quase todas vindas deste produtor.

Dentre os extratos, a menor atividade antioxidante é observada para a extração com diclorometano (Fig. 37-B). Em contraste a isso, é possível notar que geralmente as amostras mais polares apresentam melhores atividades antioxidantes,

sendo o extrato bruto etanólico que apresentou maior intensidade de atividade (Fig. 37-E).

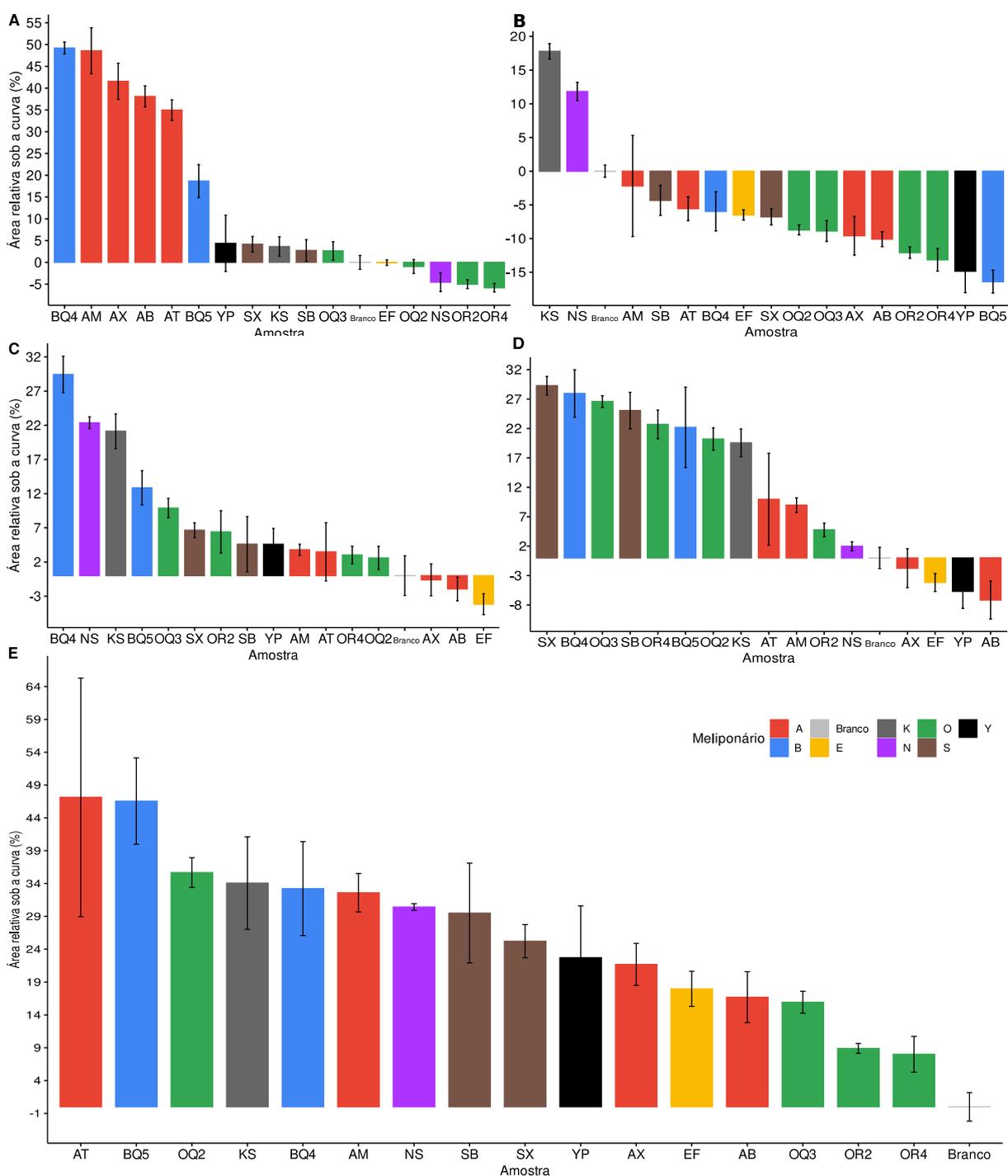


Figura 37: Área sob a curva (AUC) relativa ao controle do método de ORAC para amostras de própolis de Meliponini de acordo com o solvente utilizado na extração: **A** – Hexano **B** – Diclorometano, **C** – Acetato de etila, **D** – Etanol, **E** – Extração bruta etanólica. As cores se referem ao meliponário de origem. As siglas e cores utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

É importante notar que as amostras do Guarujá (A) apresentaram baixa atividade antioxidante pelas outras duas metodologias adotadas (Fig. 35 e 36). Contudo, no extrato de hexano as amostras do Guarujá (A) e de São paulo (B) apresentaram um ganho consistente, cerca de 50% da área, para o período analisado (Fig. 37-A). Esse fato enfatiza as variações que podem ser observadas pelos métodos aqui adotados. Essas discrepâncias entre as abordagens são esperadas, tem em vista que não existe uma única metodologia capaz de refletir a totalidade da capacidade antioxidante principalmente de misturas complexas como a própolis (APAK et al., 2016; GRANATO et al., 2018). Usualmente, ORAC é uma metodologia muito sensível, capaz também de responder a carotenos (BARBOSA et al., 2019). O teor mais acentuado de vitaminas lipofílicas com atividade antioxidante (Fig. 30), além da presença de compostos como terpenos (OKIŃCZYC et al., 2021) nessas amostras pode ter sido responsável pelos resultados obtidos.

Ainda que a metodologia de ORAC não seja diretamente aplicável para identificar a atividade antioxidante de amostras com grande conteúdo de compostos lipofílicos, adaptações com DMSO são adequadas para análises de caráter exploratório (PRIOR et al., 2003). Essa metodologia também é relevante principalmente pelo uso de radicais livres biologicamente importantes, além de ser capaz de integrar tanto a intensidade quanto o tempo da reação antioxidante (BISBY; BROOKE; NAVARATNAM, 2008; ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009).

A metodologia do ORAC é baseada na transferência de átomos de hidrogênio (em inglês, abreviada como HAT) (BISBY; BROOKE; NAVARATNAM, 2008), e quando utilizada em valores de pH fisiológicos pode simular o estado de reações que ocorrem no ambiente celular (CÖMERT; VURAL, 2018). Contudo, é uma metodologia que envolve aparelhos caros, apresenta grande variabilidade de resultados entre equipamentos, alta interferência do pH utilizado para reação, além de requerer um tempo considerável para suas análises (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009). Algumas variações com relação ao tempo de armazenamento das amostras também parecem ter certo grau de influência nos resultados obtidos por essa metodologia (MARTINOTTI; RANZATO, 2015).

Já as metodologias de DPPH e ABTS se baseiam na transferência de elétrons (em inglês, abreviado como ET) eliminando os radicais livres e resultando em um panorama diferente (LIAUDANSKAS et al., 2021). Desse modo possuem como van-

tagem a simplicidade, a disponibilidade, e estabilidade dos reagentes no processo, assim como a reprodutibilidade, podendo ser aplicados em uma vasta gama de concentrações, e ainda sim, obter resultados consistentes. Contudo, eles são mais indicados para determinar a atividade antioxidante de alimentos ou de amostras biológicas (CÖMERT; VURAL, 2018). Todavia, a escolha dessas duas abordagens não são adequadas para análises de peroxidação lipídica, por exemplo.

As amostras de *M. subnitida* apresentam atividade muito alta em quase todos seus extratos (Fig. 37), de maneira independente de sua origem. A presença de uma gama muito grande de compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos foi documentada para a própolis dessa espécie (DE SOUZA et al., 2018). O que também foi verificado para essas amostras na análise da cromatografia líquida (tópico 3.15). Esses compostos apresentam grande atividade antioxidante quando analisados com o ORAC (CÖMERT; VURAL, 2018). O que pode ser responsável pela magnitude de resultados obtidos para estas amostras em estudo.

A presença de compostos antioxidantes e de antimicrobianos é extremamente relevante para a indústria de alimentos e que atualmente promovem a utilização da própolis devido ao seu potencial de atrasar a oxidação lipídica assim como o aumento do tempo de conservação de produtos alimentares (GRANATO et al., 2018; SULAEMAN; NUSA; MARLIYATI, 2021).

A análise do mel de abelhas sem ferrão de diferentes regiões da Malásia, indicam que as características físico-químicas, a composição e as atividades antioxidantes já eram discrepantes dos valores obtidos para *Apis mellifera*, e que os ácidos orgânicos seriam bons marcadores regionais (SHAMSUDIN et al., 2019). Também foram obtidos dados que indicam padrões de atividade antioxidante muito diferentes dos obtidos para *Apis*. Tanto pelo aspecto de composição das amostras (tópicos 3.5 e 3.15), quanto pela intensidade de atividade antioxidante observada para os extratos apolares das própolis.

3.17 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi analisada através de curvas de crescimento, e de impacto dos compostos sobre a produção de biofilme.

3.17.1 Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* PA14

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa presente em diversos ambientes naturais, tanto terrestres quanto aquáticos. É uma bactéria de comportamento oportunista que infecta um grande número de seres vivos incluindo seres humanos. A cepa PA14 apresenta alta virulência, sendo um dos grupos clonais mais amplamente distribuído no planeta apresentando grande importância médica (MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011).

3.17.1.1 Extratos brutos etanólicos

A partir da análise dos extratos brutos etanólicos sobre a cultura de *P. aeruginosa* PA14 foi possível obter variações de efeitos entre as amostras de própolis, principalmente entre as oriundas de uma mesma região (Fig. 38). Com as amostras do Guarujá (Produtor A), é notável que todas apresentaram redução do crescimento bacteriano. Desse produtor, há ainda uma atividade mais acentuada para as própolis de *S. tubiba* (AT) e *S. bipunctata* (AB) (Fig. 38-A).

Foi obtida uma atividade inibitória mais promissora para as amostras de *S. bipunctata* independente da origem (AB e SB) (Fig. 38—A e B). A inibição ocorre ao final da fase *log*, afetando principalmente o número de células na fase estacionária, sendo esse efeito observado para as duas amostras dessa espécie, mesmo provenientes de produtores diferentes (Fig. 38—A e B). Os extratos brutos etanólicos dessa espécie também apresentaram acentuada atividade antioxidante para a metodologia de ABTS (Fig. 36) e ORAC (Fig. 37). Usualmente, os extratos etanólicos, são acompanhados de uma maior concentração de compostos fenólicos, e coincidentemente apresentam propriedades antibacterianas mais intensas (BOUZAHOUANE et al., 2021). Fato que pôde ser verificado neste estudo.

Das amostras estudadas de Jacuí (S), a de *S. xanthotricha* (SX) foi a que menos apresentou atividade antibacteriana (Fig. 38—B). Relativamente similar ao observado para a amostra da mesma espécie do Guarujá (AX) (Fig. 38—A). *S. xanthotricha* apresentou baixa atividade antioxidante pela metodologia de DPPH, e atividades intermediárias tanto para a metodologia com ABTS (Fig. 36) quanto para a de ORAC (Fig. 37). Essa espécie tem ganhado espaço por sua promissora produção de mel (AGUIAR, 2012), além de ser muito importante para estudos genéticos e evoluti-

vos com relação ao gênero *Scaptotrigona* (CUNHA et al., 2021). Todavia, poucas informações estão disponíveis com relação à atividade biológica de sua própolis. O que é observado pela técnica utilizada é que essa espécie apresenta um efeito antibacteriano sutil ao ser comparado a algumas das outras espécies desse gênero (Fig. 38–A e B).

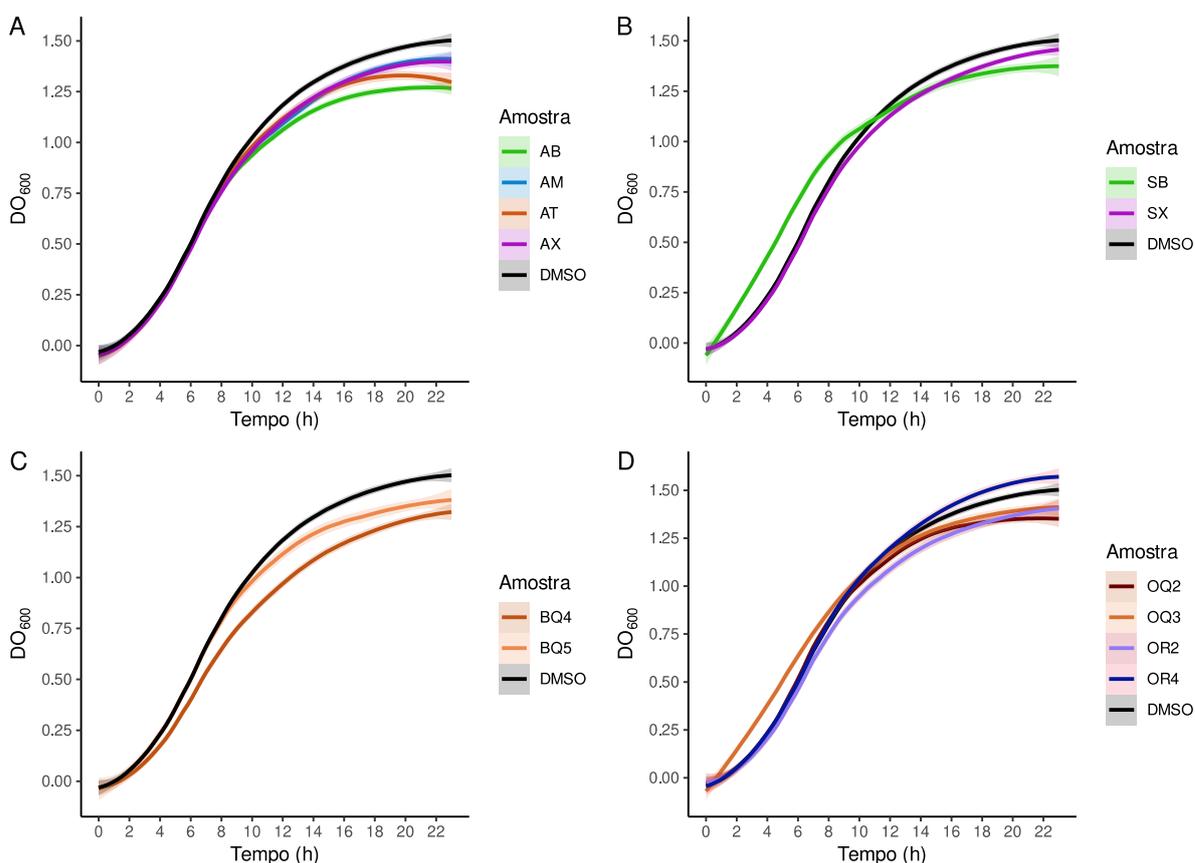


Figura 38: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO_{600}) da cultura de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos de própolis de Meliponini. **A** – Amostras do Guarujá (Produtor A). **B** – Amostras de Jacuí (Produtor S). **C** – Amostras de São Paulo (Produtor B). **D** – Amostras de Cotia (Produtor O). A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

A baixa atividade contra *P. aeruginosa* é esperada de uma forma geral, tendo em vista que notadamente própolis apresenta um efeito reduzido sobre bactérias Gram-negativas (COSTA et al., 2021; PEIXOTO et al., 2021). Essa é uma espécie de bactéria Gram-negativa, que acomete principalmente indivíduos imunologicamen-

te comprometidos, e apresenta grande importância em relação à resistência a antibióticos nos últimos anos (SANTOS, 2018). É altamente dispersa ambientalmente, com caráter oportunista, e alta adaptabilidade. Essa capacidade se deve principalmente ao seu extenso e complexo genoma, que possibilita grande resistência intrínseca a antibióticos, além da expressão de fatores de virulência (SANTOS, 2018). A grande diversidade de rotas bioquímicas faz com que essa espécie seja muito resistente aos tratamentos com antissépticos e antibióticos (SILVA et al., 2019), e esse efeito parece se estender para a própolis.

O meliponário de São Paulo (B), apresentou consistentes diferenças entre as amostras (Fig. 38-C). Enquanto BQ4 apresenta uma redução do crescimento bacteriano desde a quinta hora do experimento, a amostra BQ5 exibe uma redução de estabilização da cultura somente após a 17.^a hora do experimento (Fig. 38-C). Portanto, ainda que oriundas da mesma espécie e do mesmo produtor, há variações da resposta da cultura bacteriana para a presença do extrato. Essa análise é considerada valiosa, justamente por aumentar a compreensão de variações localmente observadas (DUTRA et al., 2014). Ao comparar esses resultados com os obtidos para as amostras de *M. quadrifasciata* de Cotia (OQ2 e OQ3) (Fig. 38-D), as primeiras apresentaram pouco efeito sobre o crescimento bacteriano para *P. aeruginosa*. Além disso, alguns autores já obtiveram que as própolis de *M. quadrifasciata* podem apresentar de pouca a moderada atividade contra cepas de *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas (RUBINHO et al., 2019). Complementando os dados obtidos neste estudo. Além disso, variações entre as colmeias com relação à composição (HERRERA-LÓPEZ et al., 2019), assim como diferentes interações com bactérias (DE PAULA et al., 2021) é algo reconhecido, porém não é um aspecto muito explorado.

Para a amostra de *S. postica* (YP) encontramos uma significativa redução do crescimento bacteriano a partir da décima hora de exposição ao extrato bruto etanólico da amostra (Fig. 39-A). Indicado pelo período no qual não há sobreposição dos intervalos de confiança entre as curvas.

A própolis de *S. postica* vem sendo investigada com relação a sua atividade contra micro-organismos de maneira mais intensa nos últimos anos. Recentemente alguns experimentos com amostras de própolis dessa mesma espécie e produtor indicaram promissora atividade antiviral contra cepas de *Herpes simplex* (COELHO

et al., 2015; POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019), e mais recentemente de rubéola (COELHO et al., 2018). Já neste estudo o extrato bruto etanólico de *S. postica* foi responsável por uma atividade antimicrobiana notável ao ser comparada com as outras amostras.

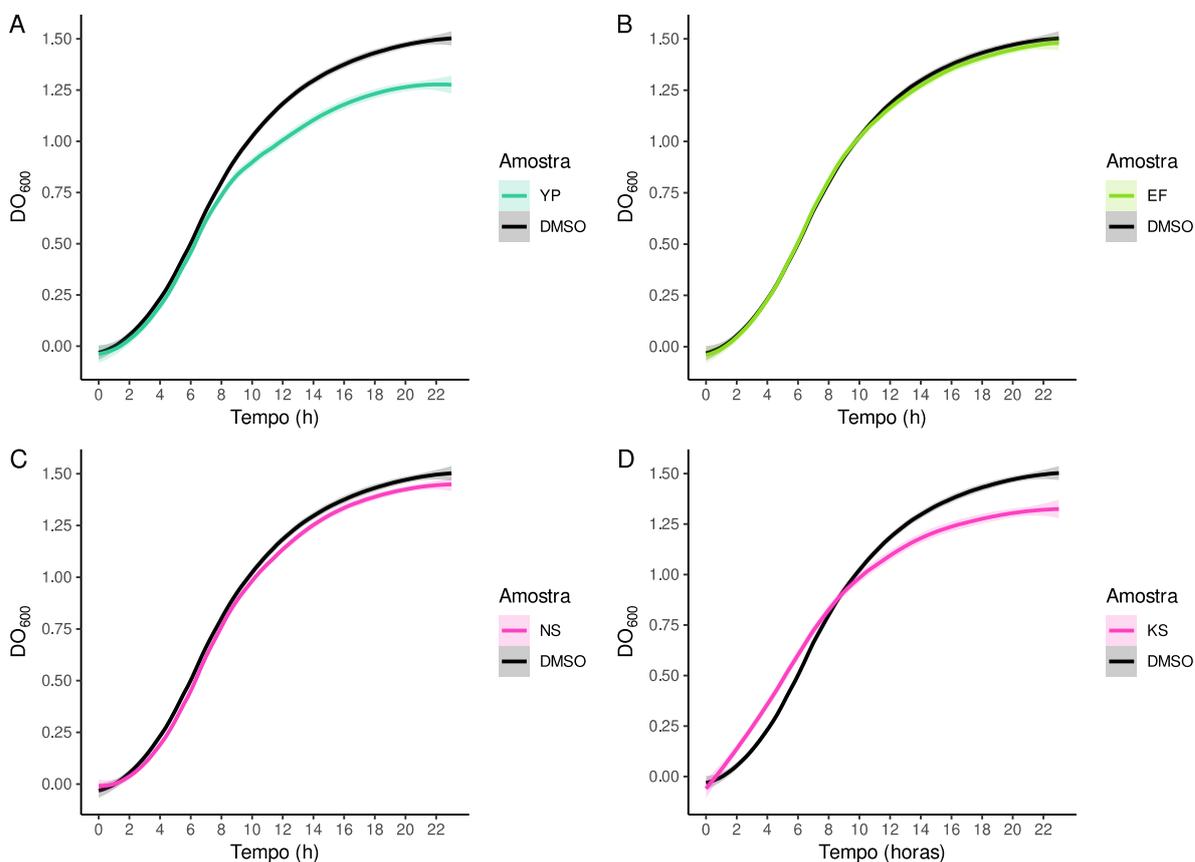


Figura 39: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO_{600}) de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos de própolis de Meliponini. **A** – Amostra de *S. postica* (Produtor Y). **B** – Amostras de *M. flavolineata* (Produtor E). **C** – Amostra de *M. subnitida* (Produtor N). **D** – Amostra de *M. subnitida* (Produtor K). A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

A própolis de *S. postica* também apresentou efeito inibidor sobre alguns tumores, contudo, existe uma grande dependência de concentração sobre o resultado obtido (ARAÚJO et al., 2009). Os autores ainda pontuam que a presença de diterpenos e triterpenos, assim como a presença de flavonoides atuando sinergicamen-

te, ou mesmo isoladamente, podem ser responsáveis pelas atividades biológicas observadas (ARAÚJO et al., 2009).

Com relação à composição, observamos que a amostra de própolis de *S. postica* não apresentava um grande número de compostos nos extratos apolares (item 3.11), mas possui compostos fenólicos no extrato Bruto etanólico (item 3.15). Esse extrato também apresentou consistente atividade antioxidante para os três métodos utilizados (seção 3.16), possivelmente associada com essa presença de compostos fenólicos no extrato. Assim, os dados aqui obtidos corroboram as informações presentes na literatura de que maior teor desses compostos pode culminar em uma maior atividade biológica.

Analisando os resultados obtidos para a amostra de *M. flavolineata* (EF), há um efeito incipiente, com as curvas de crescimento correspondendo aos valores obtidos para o controle (Fig. 39–B) sendo um padrão muito similar ao observado para as amostras de *M. subnitida* de Mossoró, também houve pouco impacto no desenvolvimento da cultura bacteriana tanto do produtor urbano (NS) (Fig.39–C), quanto para a amostra rural (KS) (Fig.39–D), estando muito próximos ao observado para o controle. São utilizadas duas principais formas de classificação dos efeitos de compostos sobre bactérias. Efeitos bactericidas são aqueles que dificultam a sobrevivência e o estabelecimento de bactérias, mesmo quando em condições ambientais e meio favoráveis ao seu crescimento (SILVA et al., 2011), enquanto compostos com efeito bacteriostático dificultam o estabelecimento de culturas bacterianas (TOSI et al., 2007).

Em suma, as amostras de *S. bipunctata* (AB) do Gurarujá (Fig. 38–A), *M. quadrifasciata* de São Paulo (BQ) (Fig. 38–C), e *S. postica* (YP) de Barra do Corda (Fig. 39–A) foram as mais efetivas na redução do crescimento de *P. aeruginosa*. Contudo, as amostras apresentaram efeitos bacteriostáticos, de modo que ocorreu principalmente atraso do desenvolvimento bacteriano, e/ou uma redução da capacidade de suporte (representada pelo número máximo de bactérias) da cultura.

Com o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos atuais vêm crescendo o interesse por produtos de origem natural que possam substituir essas moléculas em algumas de suas aplicações. Desse modo o emprego de própolis como componente adjuvante no tratamento de infecções tem se tornado uma possibilidade (COSTA et al., 2021; SCHELLES et al., 2021; SOUZA, 2021). As principais formas de re-

sistência parecem ter surgido com diferentes mecanismos, como os de inativação enzimática, mutação do sítio alvo, assim como por efluxo dos fármacos atualmente empregados nos tratamentos (SANTOS, 2018).

Usualmente, quadros de úlceras cutâneas são propensos à infecção por bactérias Gram-positivas comuns na pele como *Staphylococcus aureus*, e de algumas Gram-negativas como *P. aeruginosa* e *E. coli* (COSTA et al., 2021). A própolis pode ser empregada nesse quadro visando conter o desenvolvimento bacteriano e a piora do quadro infeccioso (SANTANA et al., 2012). Utilizando-se os dados aqui obtidos para inferir a atividade das amostras nessas aplicações, o efeito que poderia ser esperado com uso das amostras estudadas seria uma ligeira redução ou o atraso do desenvolvimento bacteriano para esse quadro.

Outros autores obtiveram que para culturas de *P. aeruginosa* as própolis de *Melipona* parecem ser mais efetivas do que as provenientes de *Scaptotrigona* e *Apis* (FARNESI et al., 2009). Entretanto, os dados apresentados indicaram uma certa atividade para o mesmo número de amostras de cada gênero, mesmo que a atividade mais intensa tenha sido para obtida para uma das quatro amostras de *M. quadrifasciata*, também é importante ressaltar que as outras três dessa espécie obtiveram efeito menos acentuado, portanto, não parece ser uma generalização clara e somente determinada pela espécie.

A atividade da própolis é geralmente colocada como moderada para *P. aeruginosa* (COSTA et al., 2021). Tendo em vista a complexidade do genoma dessa espécie, assim como a adaptabilidade desse organismo, é de certa forma esperada que a atividade da própolis possa variar muito entre linhagens desse organismo assim como para amostras diferentes. Alguns autores ainda pontuam que a própolis pode apresentar atividade contra patógenos Gram-negativos (KUJUMGIEV et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2017a), mas que geralmente é bem menos ativa do que ao ser comparada com sua atividade contra cepas de bactérias Gram-positivas (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020; HOCHHEIM et al., 2020). Havendo, possivelmente, impacto da própolis principalmente com relação à estrutura da parede bacteriana (BUENO-SILVA et al., 2017). No entanto, a composição diferenciada das células de bactérias Gram-negativas, que possuem uma parede de peptidoglicano acrescida de uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, dificulta a lise dessas bactérias ao serem expostas aos extratos (COSTA et al., 2021).

Em alguns casos as amostras parecem ter promovido aumento do crescimento bacteriano (Fig. 38-D). Todavia, isso não se deve necessariamente ao um estímulo de crescimento gerado pela presença do extrato. É reconhecido que a presença de compostos com atividade antimicrobiana em concentrações subinibitórias pode levar ao aumento do crescimento bacteriano, principalmente pela formação de biofilmes (RANIERI; WHITCHURCH; BURROWS, 2018).

3.17.1.2 Atividade sobre o crescimento de *P. aeruginosa* pelas extrações fracionadas

Os efeitos observados para os extratos das amostras de *S. bipunctata* do Guarujá (AB) foram muito baixos (Fig. 40-A), contudo, para as própolis da mesma espécie de Jacuí (SB), os extratos são moderadamente ativos, sendo o de hexano o mais proeminente (Fig. 40-C).

Essa diferença é relevante, tendo em vista que usualmente, os estudos com própolis, quando abordam extratos apolares, realizam partições a partir de extratos etanólicos (SANTOS et al., 2002; ELBAZ; ELSAYAD, 2012), e não realizando extrações diretas com solventes apolares. Assim, essa descoberta se complementa ao que vem sendo documentado de que componentes da cera de *Apis* possuem atividade antibacteriana (KACÁNIOVÁ et al., 2012), e antioxidante (MARTINELLO; MUTINELLI, 2021). Os dados obtidos também indicam que isso pode ocorrer para extratos apolares das própolis de Meliponini. Propriedades antimicrobianas para compostos apolares, como os terpenos também vem sendo apontadas mais recentemente (DOS SANTOS et al., 2017a). Em alguns casos, compostos diterpênicos da própolis se mostraram ativos contra *Staphylococcus aureus* (BANKOVA et al., 1996). Neste estudo podemos apontar que os compostos presentes em extratos de solventes apolares também parecem afetar *P. aeruginosa*, mesmo que de maneira reduzida.

Para *S. xanthotricha*, é possível notar a variação encontrada entre as amostras de diferentes produtores (Fig. 40-B e D). Enquanto todos os extratos das amostras provenientes de Jacuí (SX) apresentaram atividade de redução do crescimento após 15 horas de tratamento (Fig. 40-D), as amostras do Guarujá (AX) apresentaram pouco efeito sobre a cultura (Fig. 40-B).

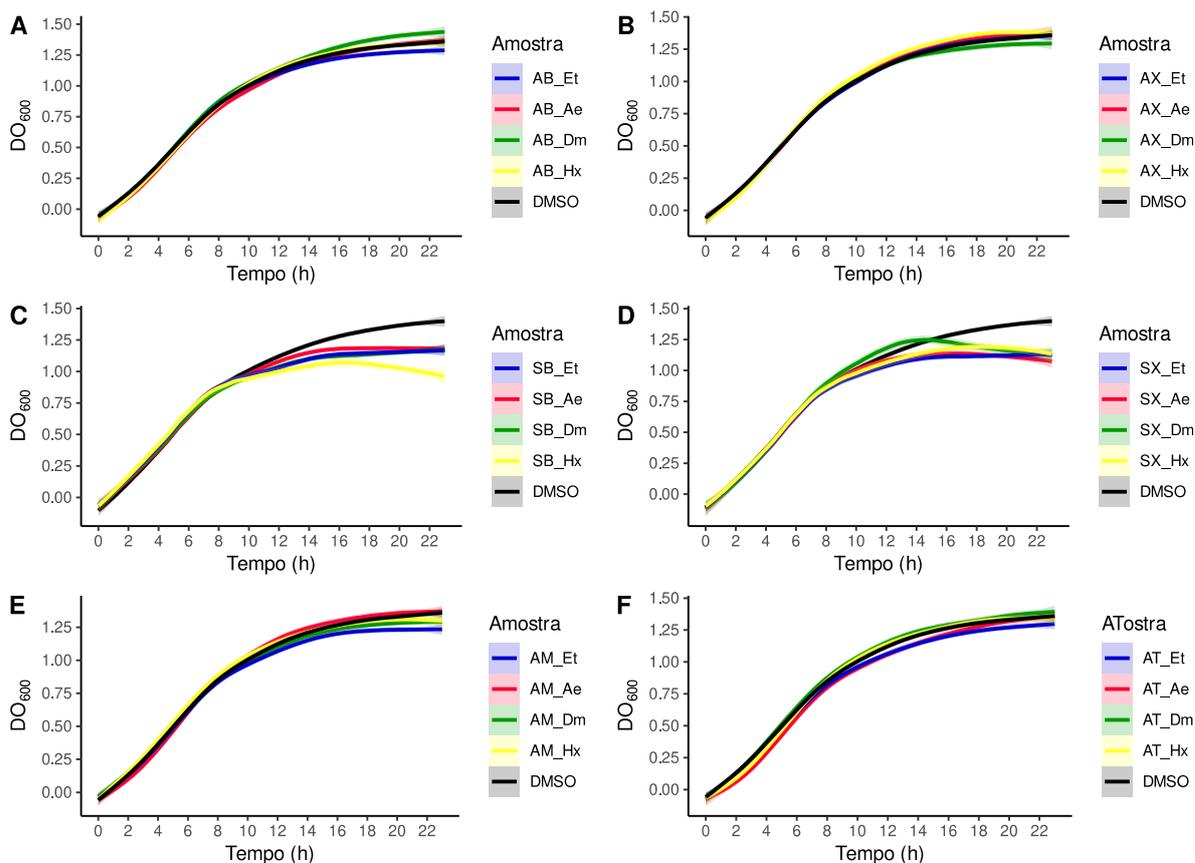


Figura 40: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO_{600}) de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ao ser exposta aos extratos de hexano (Hx), diclorometano (Dm), acetato de etila (Ae) e etanol (Et) em DMSO. Curvas de crescimento de: **A** – *S. bipunctata* do Guarujá. **B** – *S. xanthotricha* do Guarujá. **C** – *S. biunctata* de Jacuí. **D** – *S. xanthotricha* de Jacuí. **E** – *M. marginata* do Guarujá. **F** – *S. tubiba* do Guarujá. A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Nesta análise podemos identificar a grande influência que a região de origem da amostra pode ter sobre sua atividade biológica. Neste caso, tanto Guarujá quanto Jacuí estão localizados em regiões de mata Atlântica, no entanto, as atividades (Fig. 40) e a composição química (Fig. 30) indicam que isso não significa que as abelhas tenham acesso e/ou explorem os mesmos recursos vegetais. Por exemplo, entre as amostras de *S. xanthotricha*, a de Jacuí (SX) é muito mais rica em compostos fenólicos do que a do Guarujá (AX), que tem uma constituição química muito pobre. Provavelmente, essas diferenças levaram aos diferentes resultados entre suas atividades no crescimento de *P. aeruginosa*. Variações influenciadas pelo ambiente da colmeia já foram observadas para o microbioma de *Tetragonula carbonaria* quando

movidas para um ambiente de monocultura (HALL et al., 2021). Neste trabalho obtivemos que a diferença de localização das amostras também se reflete em diferenças de composição e de atividade.

Geralmente, é esperado que amostras de regiões urbanas apresentem uma composição diferenciada pela restrita diversidade de fontes vegetais. Com essa restrição, a própolis teria uma diversidade menor de compostos, impactando negativamente sua atividade. Os resultados de *S. xanthotricha* quando analisada a atividade contra *P. aeruginosa*, favorece essa hipótese (Fig. 40—B).

Contudo, essa inferência pode não ser adequada tendo em vista que o comportamento e o planejamento urbano pode ser consistentemente diferente entre as cidades. Além do pouco conhecimento existente do impacto do ambiente urbano, principalmente porque vêm crescendo iniciativas de paisagismo mais amigável a polinizadores (KLEINERT; SILVA, 2020).

Para a amostra de *M. marginata* (AM), há uma ligeira redução do crescimento bacteriano sendo mais intensa para as culturas expostas aos extratos de diclorometano e etanol (Fig. 40—E). Deve-se salientar que no extrato etanólico bruto desta amostra foi detectada riboflavina-5'-monofosfato (Fig. 30), que pode ter tido influência na sua atividade nos extratos menos polares. A extração sequencial se mostrou próxima dos resultados obtidos para o extrato bruto etanólico da mesma espécie (Fig. 38—A).

Os estudos envolvendo *M. marginata* se concentram em outros aspectos dessa espécie como a fisiologia (KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1986), ecologia (BORGES; BLOCHTEIN, 2005), e conscientização ambiental (ARBOITTE et al., 2021). Entretanto, há poucos estudos que se concentrem nas atividades biológicas. Portanto, a descoberta do padrão de atividade para o extrato de *M. marginata* se mostra como algo novo.

Os resultados de atividade de *S. tubiba* (AT) também indicam que dos extratos analisados o de etanol apresentou uma redução mais efetiva do crescimento de *P. aeruginosa*, se dando principalmente após a oitava hora do experimento (Fig. 40—F). Usualmente é esperado que esse extrato seja o mais ativo, tendo em vista que a atividade bacteriana é atribuída aos extratos polares das amostras pela abundância de compostos fenólicos (BANKOVA et al., 1996; SANTOS et al., 2002). Contudo, não

há um padrão de atividade promissor para o emprego dessa própolis em tratamentos clínicos.

Alguns autores demonstraram que extratos mais polares de própolis de outras espécies de Meliponini, como os etanólicos ou aquosos, possuem efeito antimicrobiano mais intenso (UMTHONG; PUTHONG; CHANCHAO, 2009). Entretanto, neste estudo também foram observadas atividades biológicas para os extratos apolares (Fig. 40—C e D).

Para as amostras de *M. quadrifasciata*, obtivemos variações dos efeitos observados para cada um dos extratos. Para as amostras de São Paulo (BQ4 BQ5) o extrato em etanol foi mais ativo (Fig. 41—A e B). Enquanto para as amostras de Cotia (OQ2 e OQ3) os extratos de hexano e acetato de etila, respectivamente, apresentaram maior atividade dentre os estudados (Fig. 41—C e D). É importante ressaltar que a amostra OQ2 apresenta riboflavina na constituição de sua própolis, enquanto OQ3 possui riboflavina e riboflavina-5'-monofosfato no extrato bruto etanólico (Fig. 30), possivelmente a proporção e presença desse composto nos extratos pode ser responsável pelo padrão observado nesses extratos.

Enquanto alguns autores indicaram que somente os extratos de própolis de *M. quadrifasciata* foram eficientes na redução do crescimento de cepas de *P. aeruginosa* ao serem comparados com *Scaptotrigona* e *Apis* (FARNESI et al., 2009). Outros observaram uma redução moderada de cepas resistentes a antibióticos, expostas à própolis verde de *Apis* (SANTOS, 2018), e de *M. quadrifasciata* em algumas culturas bacterianas (VELIKOVA et al., 2000b). Neste estudo o efeito foi moderado, com destaque para a atividade do extrato de Acetato de etila de OQ3 (Fig. 41—D). O que pode se relacionar com a maior riqueza de compostos fenólicos desse extrato do que o de OQ2 (Fig. 30).

Como visto na cromatografia a gás (item 3.14), essa amostra é rica em terpenoides, e alguns autores atribuem a presença de di e triterpenos como responsáveis pela atividade biológica observada para a própolis proveniente dessa espécie (ARAÚJO et al., 2009). Contudo, para a concentração aqui estudada os extratos não apresentaram atividade antibacteriana consistente.

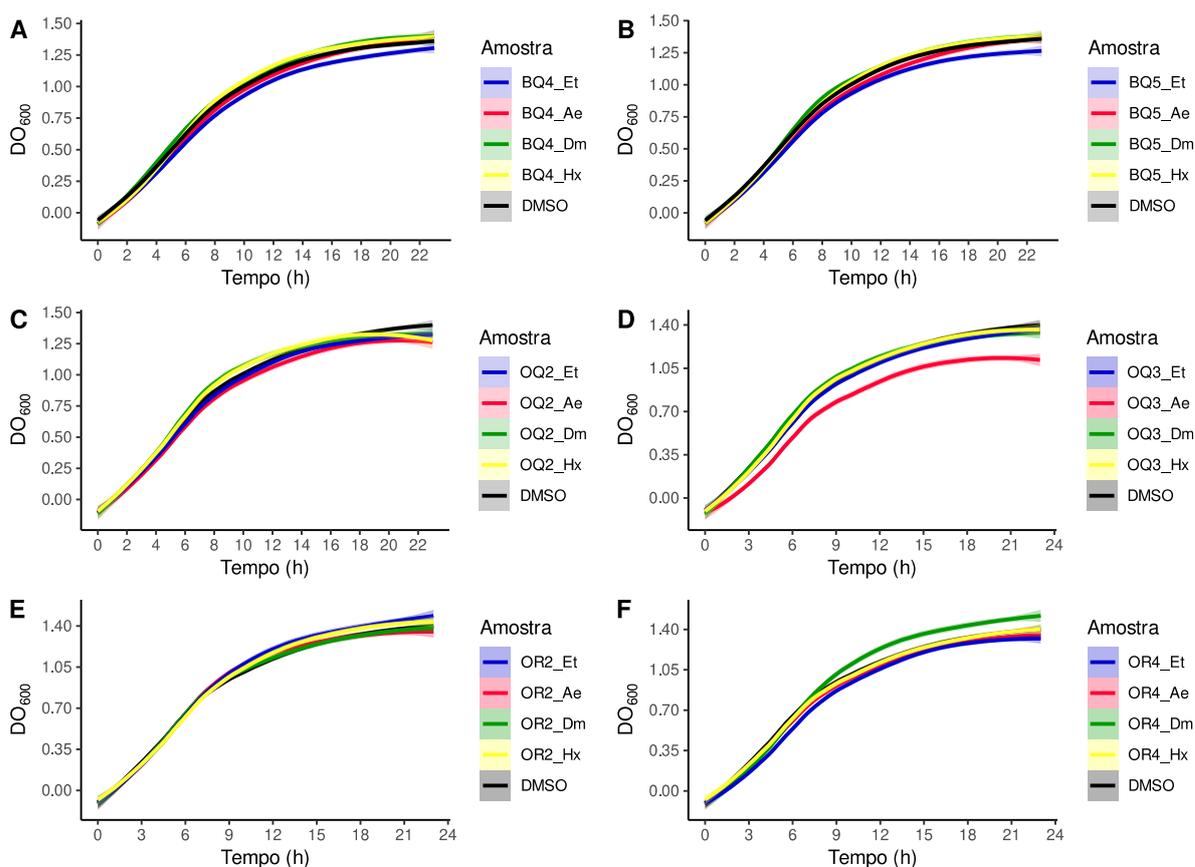


Figura 41: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO_{600}) de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ao ser exposta aos extratos de hexano (Hx), diclorometano (Dm), acetato de etila (Ae) e etanol (Et) em DMSO. Curvas de crescimento de: **A** – *M. quadrifasciata* de São paulo. **B** – *M. quadrifasciata* de São paulo. **C** – *M. quadrifasciata* de Cotia. **D** – *M. quadrifasciata* de Cotia. **E** – *M. mondury* de Cotia. **F** – *M. mondury* de Cotia. A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

A amostra de *M. flavolineata* (EF) apresentou uma atividade moderada para quase todos os extratos, sendo o de hexano com maior diminuição do crescimento da cultura (Fig. 42–B). Ainda assim, o efeito observado pode ser considerado bacteriostático para essa concentração, tendo em vista que não foram observadas reduções drásticas do número de bactérias em cultura (ARAÚJO et al., 2015). Esse fato não descarta a possibilidade de aplicações de extrato de própolis. Essa amostra apresenta na constituição de sua própolis, α -tocotrienol (vitamina E) e ácido retinóico (forma oxidada da vitamina A), que são substâncias que provavelmente foram extraídas com solvente apolar, justificando sua maior atividade no extrato hexânico. Muitas vezes, tratamentos padrão para controle de placa bacteriana a longo prazo são mais seguramente realizados com o uso de própolis (LÓPEZ-VALVERDE et al.,

2021). Além da possibilidade da utilização de tratamentos já estabelecidos em conjunto com produtos como a própolis. Entretanto, se faz necessário reconhecer a atividade e os fatores que podem influenciar nos resultados dessa análise.

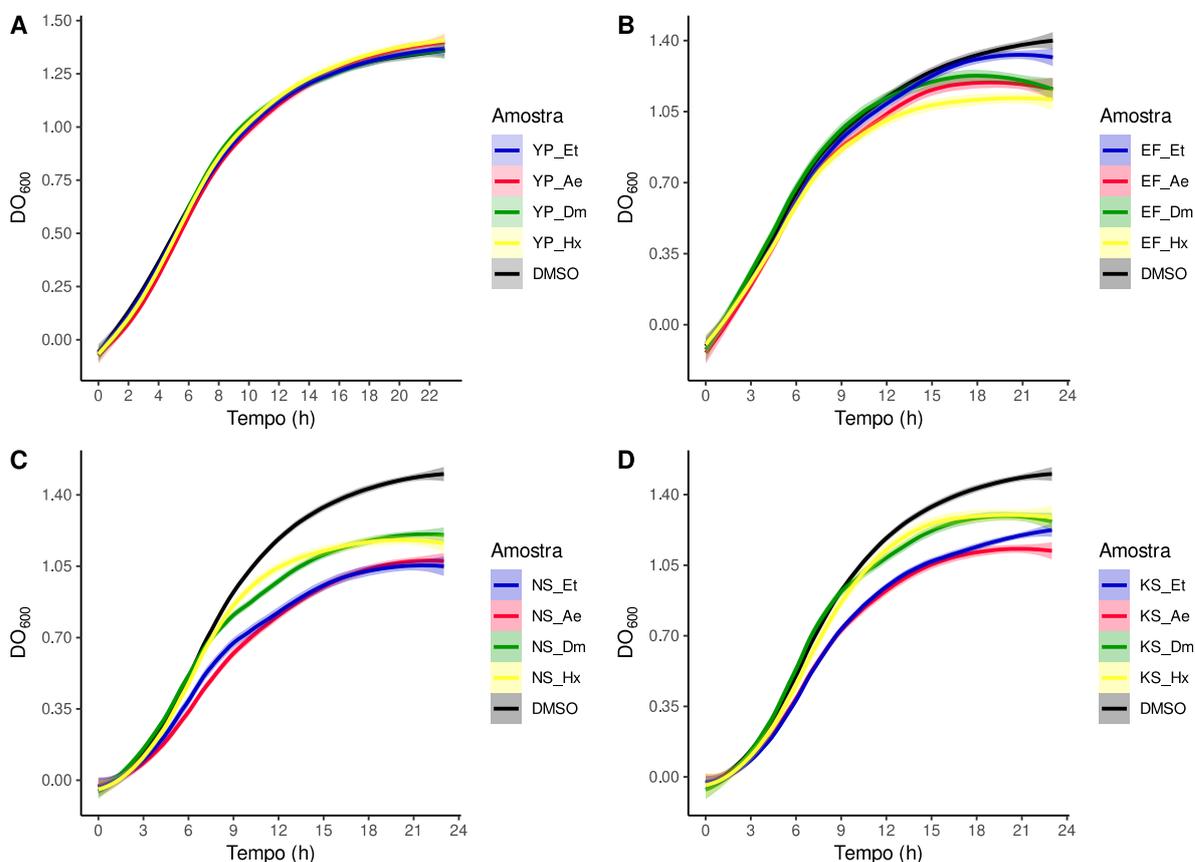


Figura 42: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO_{600}) de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ao ser exposta aos extratos de hexano (Hx), diclorometano (Dm), acetato de etila (Ae) e etanol (Et) em DMSO. Curvas de crescimento de: **A** – *S. postica* de Barra do Corda. **B** – *M. flavolineata* de Castanhal. **C** – *M. subnitida* da região urbana de Mossoró. **D** – *M. subnitida* da região rural. A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

As amostras de efeito mais acentuado são as de *M. subnitida* (Fig. 42–C e D). Nas quais as extrações com os dois solventes mais polares apresentam uma atividade mais intensa do que as amostras com os solventes mais apolares, e de maneira independente da origem. Apesar dessas amostras apresentarem riboflavina na constituição de suas própolis, são muito ricas em compostos fenólicos (Fig. 30). No caso dessas amostras a redução do crescimento bacteriano se dá no início da fase

log, por volta da quarta hora após o início do experimento (Fig. 42—C e D). Os extratos polares também apresentaram intensa atividade antioxidante para a metodologia de ABTS (Fig. 36) e ORAC (Fig. 37).

Analisando os resultados obtidos com o tratamento do extrato bruto etanólico (Fig.39—C e D), a disparidade entre os resultados para a amostra de origem rural (KS) e para a amostra com origem urbana (NS) é reduzida na extração sequencial. Ao compararmos com os resultados obtidos para a extração bruta etanólica vemos que o método de extração impacta significativamente nos resultados obtidos para a atividade. Fato previamente explorado na literatura (PIPPI et al., 2015; BITTENCOURT et al., 2015; BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2021).

Uma das grandes peculiaridades da forma de atuação da própolis é o efeito sinérgico de seus componentes (PIPPI et al., 2015). Com os dados apresentados para as amostras de *S. bipunctata* de Jacuí (Fig. 40—C) e *M. flavolineata* (Fig. 42—B) obteve-se que o conjunto de moléculas dos extratos apolares, apresentou melhor atividade antibacteriana, do que os componentes extraídos ao final do processo com os solventes mais polares. Já é bem reconhecido que o método de extração, assim como a região de origem da própolis apresentam grandes diferenças na atividade observada (PIPPI et al., 2015), assim como a espécie em teste também impacta os resultados (BITTENCOURT et al., 2015). Atualmente vem sendo levantadas questões com relação à possível atividade antimicrobiana dos compostos terpênicos presentes na própolis (LEONHARDT, 2010). O que poderia justificar a atividade encontrada mesmo para os extratos fracionados de baixa polaridade.

3.17.2 Crescimento de *Staphylococcus aureus*

Indivíduos adultos são intermitentemente colonizados por *Staphylococcus aureus* desde a amamentação, e com isso essa espécie compõe a microbiota da pele, nasofaringe e em casos raros, o canal vaginal de humanos adultos e sadios (BRASIL, 2014). Esse contato próximo com seres humanos faz a presença dessa espécie de bactéria ser comum em infecções cutâneas, intoxicações alimentares, além de ser responsável por alguns casos de síndrome de choque tóxico (KHLEIFAT et al., 2021).

Recentemente algumas cepas resistentes aos tratamentos mais comuns têm surgido, e alternativas para os compostos convencionais de controle bacteriano têm ganhado importância (PEIXOTO et al., 2021). Principalmente pelo fato de ser um organismo com alta prioridade no descobrimento de compostos antimicrobianos pela Organização Mundial de Saúde (DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI et al., 2018), tendo em vista o alto número de infecções alimentares geradas por esse organismo todos os anos (LU; CHEN; CHOU, 2005).

A análise da atividade antibacteriana das amostras provenientes do Guarujá (A) revela que as própolis de *S. xanthotricha* (AX) apresentaram uma ligeira redução do crescimento de *S. aureus*, afetando o final da fase *log* e da estacionária (Fig. 43—A).

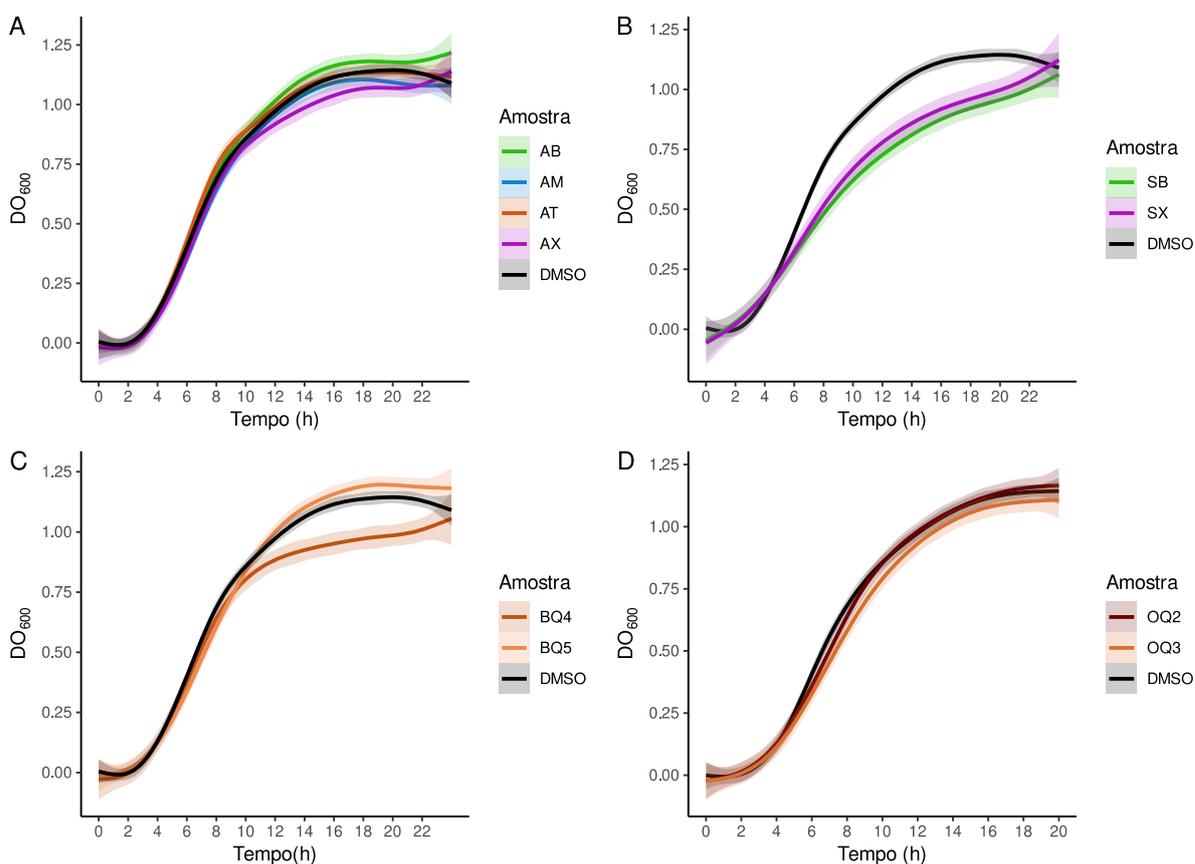


Figura 43: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO_{600}) de *Staphylococcus aureus* ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos de própolis de Meliponini. **A** – Amostras do Guarujá (Produtor A). **B** – Amostras de Jacuí (Produtor S). **C** – Amostras de São Paulo (Produtor B). **D** – Amostras de Cotia (Produtor O). A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

As amostras de Jacuí (S) apresentaram um formato de curva similar ao obtido para o produtor do Guarujá (Fig. 43–A), com alteração da fase *log* do desenvolvimento bacteriano (Fig. 43–B). Dentre as amostras de *S. bipunctata* e *S. xanthotricha*, as amostras de Jacuí apresentaram um efeito mais intenso.

As amostras de *M. quadrifasciata* de São Paulo (B) variaram seus efeitos sobre a cultura bacteriana. Enquanto BQ4 promoveu um efeito mais acentuado, reduzindo o crescimento de *S. aureus* desde a décima hora do experimento, BQ5 pouco afetou o desenvolvimento da cultura (Fig. 43–C). As amostras dessa mesma espécie, provenientes de Cotia (O) apresentaram baixo efeito durante a maior parte do período estudado (Fig. 43–D). A inclusão de solo é mencionado como fator importante que impacta a composição e a atividade biológica da própolis de *M. quadrifasciata* (DOS SANTOS et al., 2017a). Neste estudo, as amostras com maiores teores de solo (item 2.4) foram as de *M. mondury* (OR2 e OR4) e *M. quadrifasciata* (em especial OQ3), ao observamos a atividade encontrada para as amostras de Cotia (Fig. 43–D) é possível que exista uma associação entre esses dois fatores dado que, embora haja uma quantidade relativamente alta de compostos fenólicos nas própolis de *M. quadrifasciata* (Fig. 30), a proporção final, devido ao acúmulo de terra, se torna baixa, prejudicando a atividade das amostras.

Alguns autores obtiveram que a própolis parece ter boa atividade sobre cepas isoladas de *S. aureus* (SANTANA et al., 2012; SANTOS et al., 2019), ou mesmo em testes *in vivo* como alternativa a métodos tradicionais para contenção do desenvolvimento de *S. aureus* em animais (SCHELLES et al., 2021). Entretanto, essas pesquisas foram conduzidas com amostras de própolis de *Apis*, enquanto resultados associados com própolis de Meliponini ainda são mais raros. Até o momento, alguns autores comentam que a própolis de *Apis* foi mais efetiva contra *S. aureus* quando comparada com as própolis de *Melipona* e de *Scaptotrigona* (FARNESI et al., 2009). Os resultados aqui apresentados corroboram que nem todas as própolis de Meliponini são capazes de inibir o desenvolvimento de *S. aureus*.

Alguns autores comentam que as amostras de própolis com maior conteúdo fenólico pareceu ter uma ação mais abrangente contra maiores números de cepas de *S. aureus* (REIS et al., 2021). Isso é verificado com os dados apresentados, tendo em vista que os valores obtidos para as amostras de *S. postica* (Fig. 44–A) e *M. fla-*

vonlineata (Fig. 44–B) foram quase correspondentes ao do controle negativo (DMSO), indicando baixa atividade.

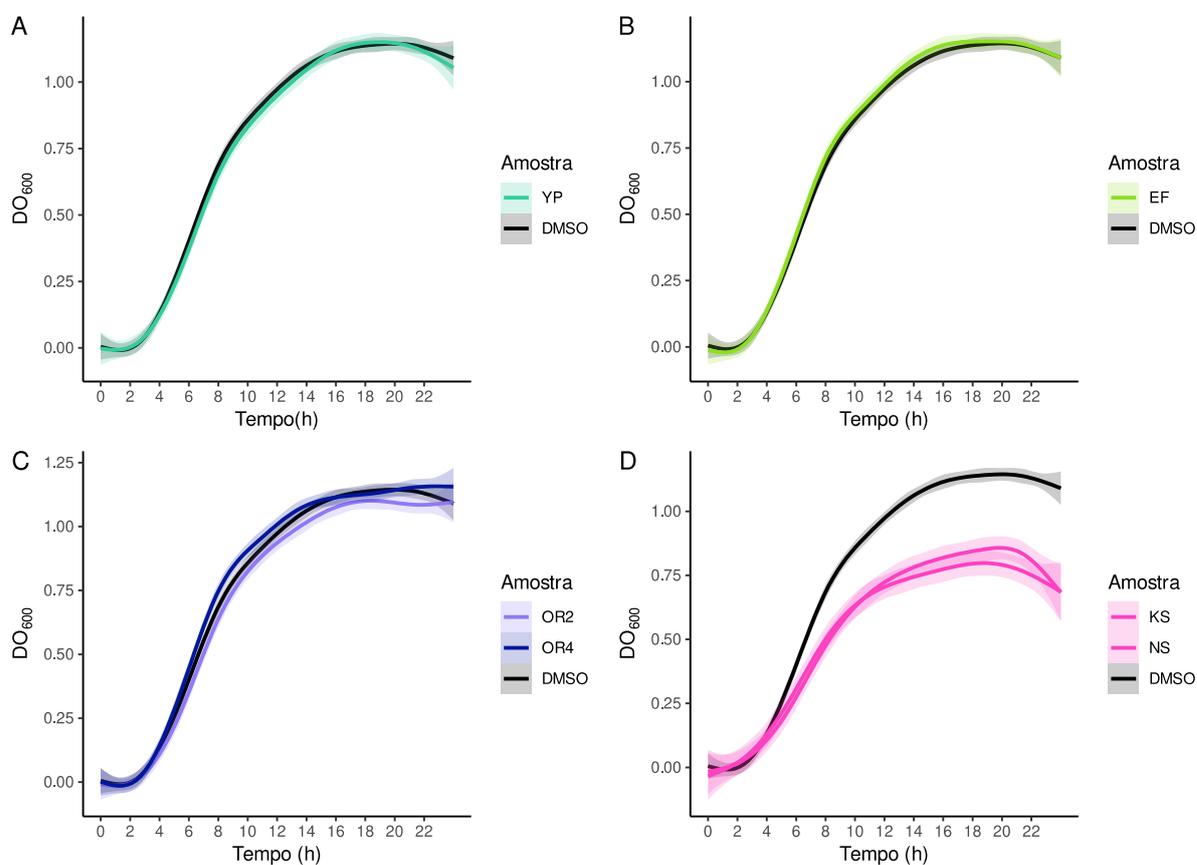


Figura 44: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO₆₀₀) de *Staphylococcus aureus* ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos de própolis de Meliponini. **A** – Amostra de *S. postica* (Produtor Y). **B** – Amostras de *M. flavolineata* (Produtor E). **C** – Amostra de *M. subnitida* (Produtor N). **D** – Amostra de *M. subnitida* (Produtor K). A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Comparando-se as amostras de *M. mondury* de Cotia (Fig. 44–C), os resultados variaram entre as própolis, de modo que OR2 tem um efeito ligeiramente mais intenso sobre o crescimento da cultura, entretanto, de maneira não significativa.

As duas amostras de *M. subnitida* (NS e KS) apresentaram efeitos muito similares sobre o desenvolvimento bacteriano (Fig. 44–D). Reduzindo o tempo de duração da fase *log*, além de atingir cerca de metade do número de células na fase estacionária quando comparada ao controle. Como discutido anteriormente, essa es-

pécie é rica em compostos fenólicos, que podem ser os responsáveis por sua atividade.

Os efeitos bactericidas e bacteriostáticos da própolis podem ser obtidos controlando-se a concentração aplicada (ALMUHAYAWI, 2020). Porém, alguns autores ainda mencionam que a diferença de concentração do efeito bacteriostático para o bactericida pode ser muito grande (GRECKA et al., 2019). No presente estudo, a concentração do extrato de própolis empregada (0,5 %) pode ser considerada baixa, tendo em vista os valores de concentração inibitória mínima que outros estudos apresentam.

A concentração inibitória mínima do crescimento de *S. aureus* quando exposto a extratos de própolis de *Tetragonisca angustula* é cerca de 20 %, variando das concentrações de 0,5 mg/mL até 2,0 mg/mL (MIORIN et al., 2003). Contudo, os valores de concentração inibitória mínima da própolis sobre *S. aureus* é muito variante entre os trabalhos na literatura, assim como o tempo necessário para interrupção do crescimento bacteriano, que pode levar até 5 dias de contato com os extratos de própolis para se encerrar (REIS et al., 2021).

Melhores resultados antibacterianos são obtidos por extratos etanólicos quando comparados com extratos produzidos com proporções de água (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020). Para *Apis* as propostas de padronização experimental, recomendam a extração em etanol (ESCRICHE; JUAN-BORRÁS, 2018; BANKOVA et al., 2019), para Meliponini essas propostas ainda são incipientes, e a adoção de diferentes abordagens pode ser um dos motivos pelos quais há tanta variação entre os resultados obtidos entre os estudos.

Os potentes efeitos bacteriostáticos e bactericidas observados da própolis sobre culturas dessa espécie de bactéria podem ser associado com redução da síntese de proteínas bacterianas, divisão celular (WOJTYCZKA et al., 2013), como também se relacionar com interações intermoleculares de base eletrostática (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020). Os flavonoides parecem ter alguma atividade sobre a permeabilidade da membrana plasmática de algumas bactérias (WOJTYCZKA et al., 2013). Desses compostos quando isolados, os flavonoides dihidrocampferídeo, 3-O-metilquercetina, pinocembrina, 3-O-metilcampferol e di-O-metilquercetina apresentaram boa correlação com a atividade antibacteriana sobre culturas de *S. aureus* (DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI et al., 2018).

Pela complexidade e a multidirecionalidade de mecanismos de ação que as diferentes própolis podem apresentar, o desenvolvimento de resistência a esse produto pode ser complicado e improvável de acontecer (WOJTYCZKA et al., 2013). Isso faz os tratamentos que envolvem própolis uma alternativa muito mais atrativa, do que a continuidade dos tratamentos somente com os antibióticos tradicionais (BRYAN; REDDEN; TRABA, 2015). Em alguns casos a própolis tem tido atividade até mesmo sobre cepas resistentes de *S. aureus* (NGALIMAT et al., 2020).

O gênero *Staphylococcus* compreendem bactérias não esporuladas com maior resistência no meio ambiente, principalmente por suportar altas concentrações salinas e aumento de temperatura (BRASIL, 2014). Especificamente a espécie *S. aureus* é uma bactéria de ampla circulação no ambiente (WOJTYCZKA et al., 2013). Apresentando maior suscetibilidade, em comparação com *P. aeruginosa*, as outras própolis que não a verde (DA CRUZ ALMEIDA et al., 2017).

O efeito da própolis parece variar entre as outras espécies do gênero *Staphylococcus* (KHLEIFAT et al., 2021). Mesmo assim, esse grupo ocorre raramente em amostras de outros produtos das abelhas sem ferrão, como o mel, por exemplo (DIVYA et al., 2020). Contudo, alguns autores propõem usos conjuntos de própolis com os tratamentos convencionais, nos quais a própolis pode facilitar ou potencializar os efeitos de compostos antibióticos corrigindo as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desses tratamentos, atingindo resultados satisfatórios (WOJTYCZKA et al., 2013).

Existe um impacto da própolis tanto em bactérias Gram-positivas quanto negativas, entretanto, parece ter efeito menor em Gram-negativas porque a própolis apresenta predominância de grupos catiônicos, e na membrana externa dessas bactérias predominam compostos aniônicos (CAMPOS; ASSIS; BERNARDES-FILHO, 2020). Além disso, a capacidade de amostras de própolis afetarem mais bactérias Gram-positivas do que negativas, pode residir nas enzimas hidrolíticas presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, que podem ser capazes de comprometer a função que determinados componentes da própolis (ALMUHAYAWI, 2020).

Alguns autores relatam que a própolis promoveu o aumento da fase *lag* em *S. aureus* (SANTANA et al., 2012), o que não foi obtido para as amostras em estudo (Fig. 44). Contudo, as condições do teste com *S. aureus* afetam muito os resultados,

principalmente a composição do meio de cultura (SANTANA et al., 2012), e em algumas condições, o pH (BRATKO et al., 2020). Considerando que os autores utilizaram outros parâmetros para o teste, inclusive outro meio de cultura, essas variações seriam esperadas.

3.17.3 Crescimento de *Escherichia coli*

Com a cultura de *E. coli* a maioria dos extratos brutos etanólicos das amostras estudadas não apresentaram uma redução consistente do crescimento bacteriano ao ser comparado ao controle de DMSO (Fig. 45).

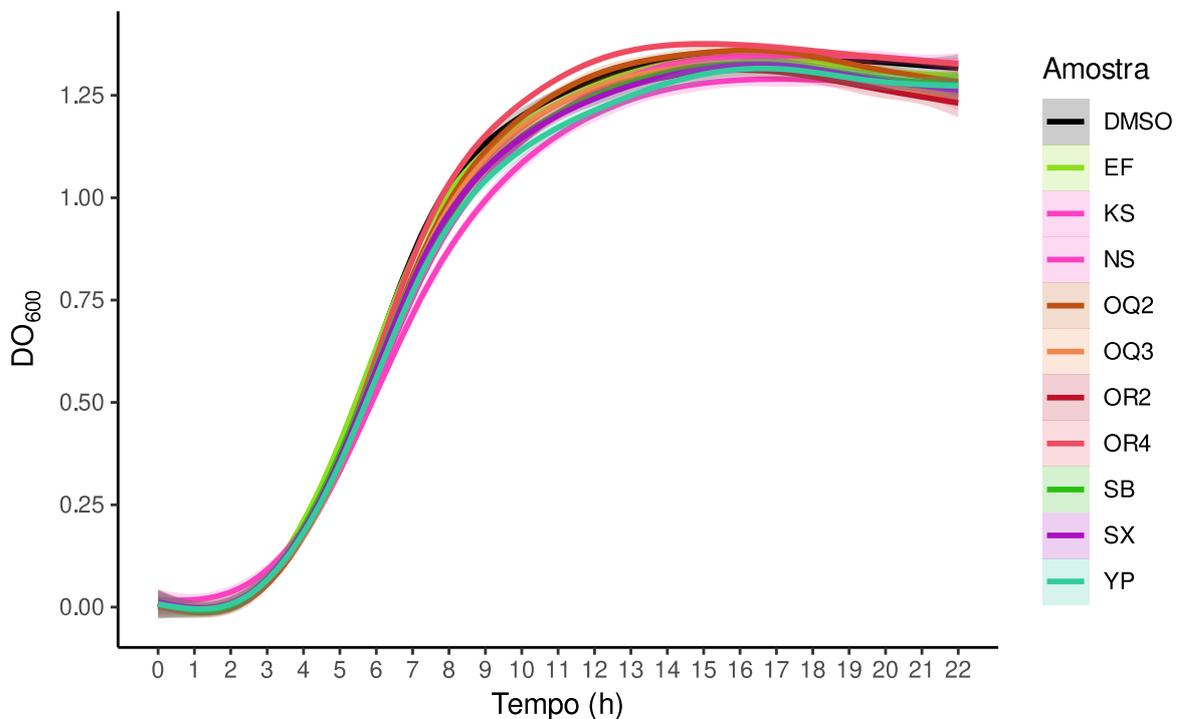


Figura 45: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO_{600}) da cultura de *Escherichia coli* ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos das amostras ressuspendidos em DMSO. A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Apesar de compor a microbiota intestinal, *E. coli*, assim como *S. aureus*, pode apresentar comportamento infeccioso, além de produzir toxinas contaminantes de água e alimentos (KHLEIFAT et al., 2021). É, portanto, uma bactéria de importância médica com ampla dispersão ambiental. Testes das amostras de Meliponini com *Escherichia coli* é importante principalmente para a amostras que incluem solo na

elaboração de suas própolis, por ser um local que pode conter essa espécie de bactéria. Neste estudo, foram utilizados para essa abordagem extratos etanólicos brutos das amostras.

Para algumas das amostras do Guarujá (A) observamos uma redução significativa, como exibido pela amostra de *M. marginata* (Fig. 46–AM), na qual o efeito foi mais proeminente de redução da capacidade de suporte e da duração da fase estacionária, atingindo a fase de declínio mais rapidamente.

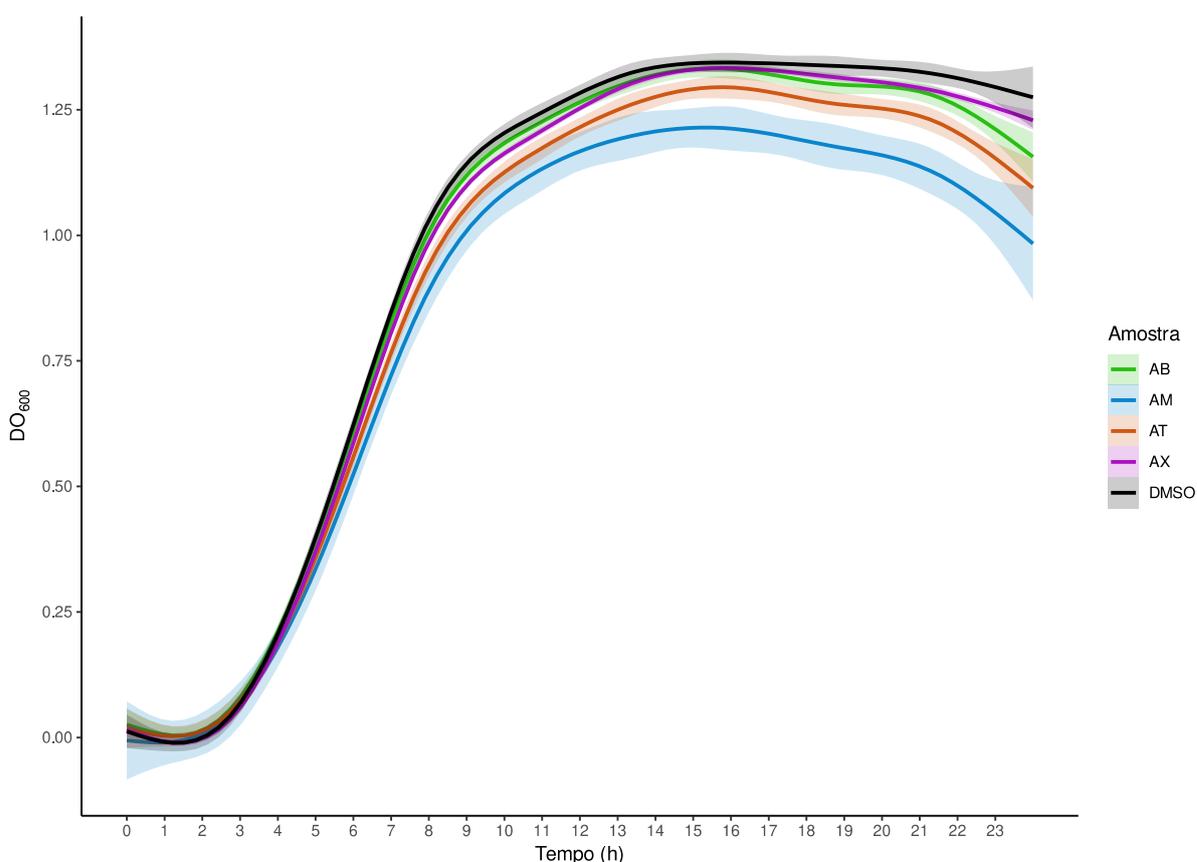


Figura 46: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO_{600}) da cultura de *Escherichia coli* ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos das amostras provenientes do produtor α res-suspendidos em DMSO. A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Os materiais de *M. quadrifasciata* vindos de São Paulo (B), também apresentaram, principalmente, reduções da capacidade de suporte (Fig. 47), assim como redução do número de indivíduos na fase *log*. O efeito foi ainda mais intenso para as

colmeias BQ4 do que BQ5. Esses resultados contrastam com os obtidos para a mesma espécie proveniente de Cotia (OQ) (Fig. 45).

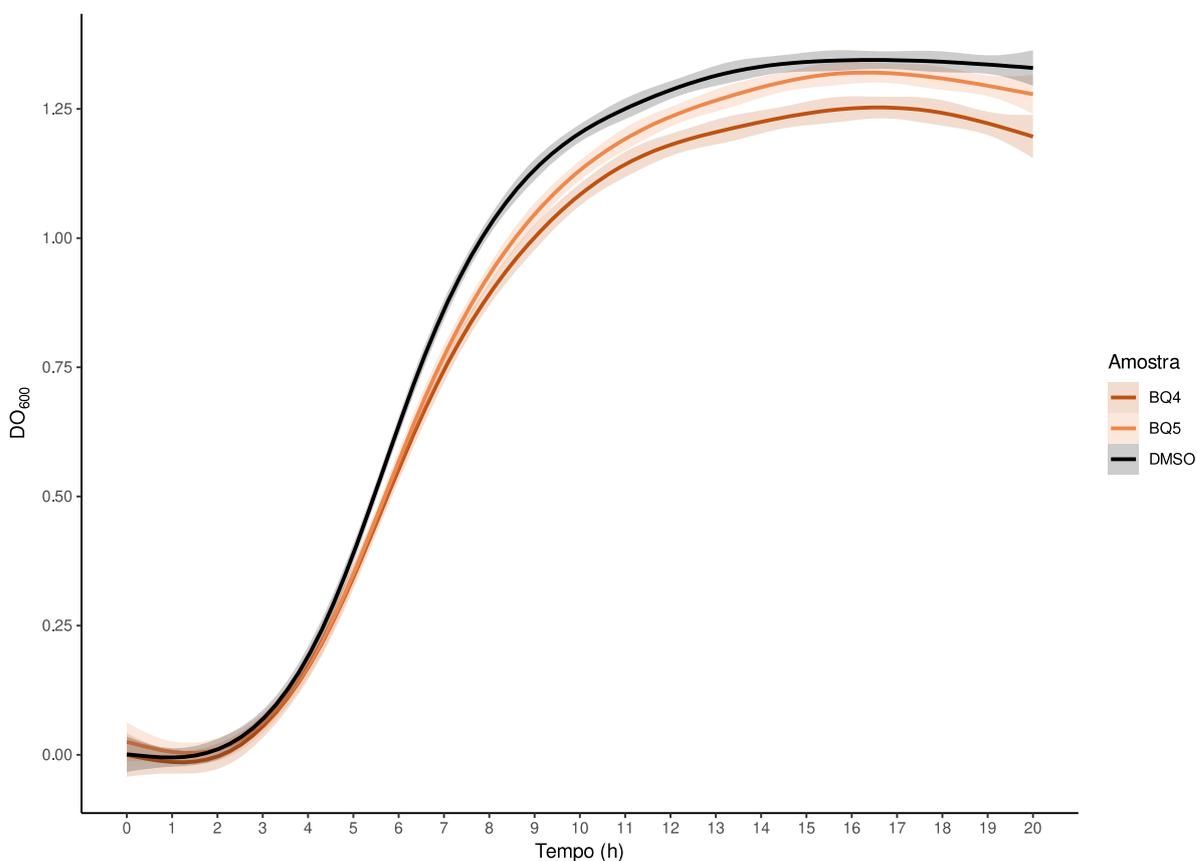


Figura 47: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO_{600}) da cultura de *Escherichia coli* ao ser exposta aos extratos brutos etanólicos das amostras provenientes do produtor α res-suspendidos em DMSO. A região sombreada das linhas representa o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

E. coli é uma espécie de bactéria considerada pouco vulnerável à própolis, (BOUZAHOUANE et al., 2021), o que é condizente com a maioria das amostras estudadas. Os mecanismos de resistência dessa espécie à ação da própolis ainda não é conhecido (ANIBIJUWON et al., 2017). Os resultados da literatura ainda indicam que contra culturas de *E. coli* somente algumas amostras da própolis de *Apis* e de *Scaptotrigona* tiveram atividade inibitória (FARNESI et al., 2009). Possivelmente, devido ao fato das própolis de *Scaptotrigona* apresentarem mais compostos inibidores de

E. coli além de uma maior solubilidade em solventes de polaridade mais alta (FARNESI et al., 2009).

De maneira geral, com os dados obtidos, as amostras de Melipona, principalmente *M. marginata* (Fig. 46—AM), foram mais ativas do que as de *Scaptotrigona* para a redução do crescimento de *E. coli*. Sendo esse efeito principalmente observado para as etapas tardias do crescimento bacteriano. Apresentando principalmente uma redução da duração do ciclo, como observado para *M. marginata* (Fig. 46) ou ainda a diminuição do crescimento da fase *log* e estacionária observada para a exposição ao extrato de *M. quadrifasciata* (Fig. 47). Essa atividade é condizente com o documentado para a própolis de *M. fasciculata*, que apresentou efeito principalmente após 24 horas de exposição (ARAÚJO et al., 2015).

3.18 Ensaio de dispersão de biofilme

Biofilmes são formados por um conjunto de bactérias sobre uma superfície com matriz extracelular produzida pelo conjunto de bactérias, beneficiando-as de predação, ação de compostos antimicrobianos, variáveis ambientais, além de um metabolismo compartilhado (RANIERI; WHITCHURCH; BURROWS, 2018).

Em biofilmes maduros, as células bacterianas ficam protegidas por compostos poliméricos secretados pelas próprias bactérias (BRYAN; REDDEN; TRABA, 2015). Criando um ambiente protegido do exterior, e possibilitando a sobrevivência celular mesmo em condições desfavoráveis. Poucos estudos têm observado o efeito da própolis em biofilmes maduros (BRYAN; REDDEN; TRABA, 2015).

A secreção de compostos e toxinas por *P. aeruginosa* possibilita a formação de biofilmes em infecções crônicas, o que também indica o estágio de progressão do quadro clínico infeccioso (SANTOS, 2018). A descoberta de compostos que atuam sobre essa forma de resistência bacteriana seria importante, principalmente tendo em vista que essa bactéria é comumente isolada em infecções crônicas (ANIBIJUWON et al., 2017), como também pode ser encontrada na mucosa oral, onde já é reconhecida pela formação de biofilmes, que podem causar doença periodontal e infecções endodônticas (SANTOS, 2018).

Para o ensaio de biofilme não foram observadas diferenças significativas entre as amostras estudadas e o controle com DMSO (Fig. 48).

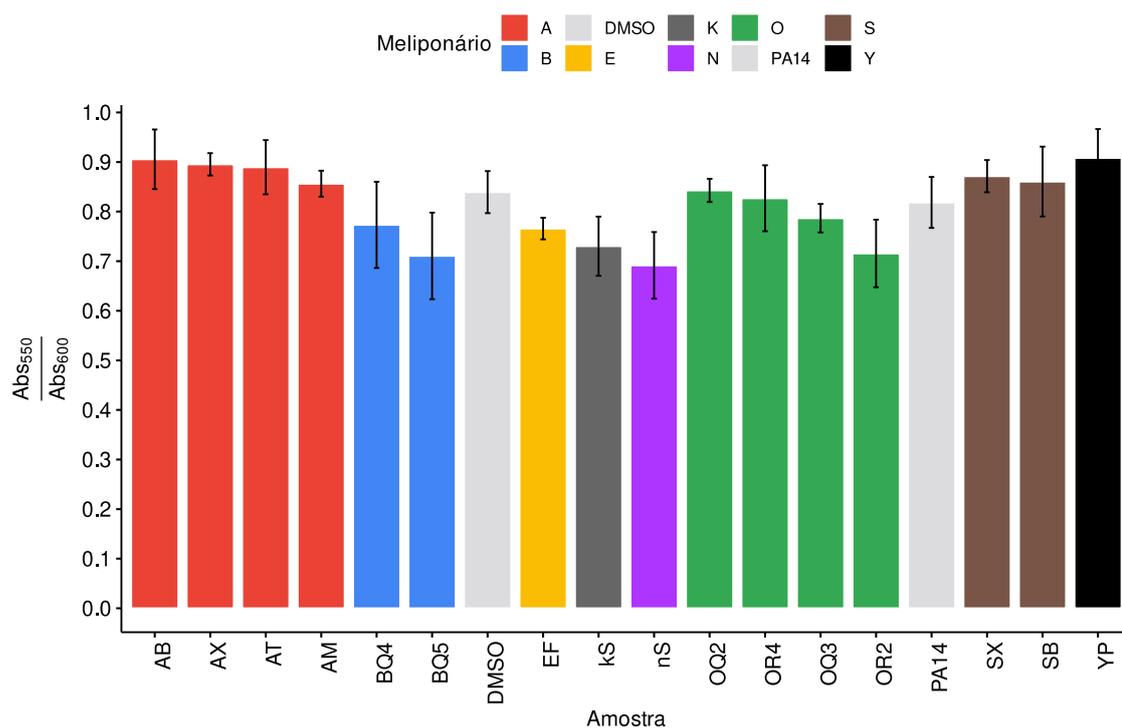


Figura 48: Proporção de biofilme formado ao ser exposto aos extratos brutos etanólicos ressuspensos em DMSO das amostras de própolis de Meliponini em cultura de *Pseudomonas aeruginosa*. As barras de erro representam o erro padrão. A presença de asterisco indica a diferença significativa com relação ao controle de DMSO. DMSO corresponde ao controle experimental, e PA14 corresponde ao controle negativo. As siglas e cores utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Em outros estudos, um dos principais efeitos positivos da própolis de *Apis* é sua capacidade antibiofilme sobre algumas cepas (GRECKA et al., 2019). Principalmente por ser um efeito que requer diversas formas de ação sobre as células-alvo, em comparação com compostos antibióticos, que afetam componentes específicos da estrutura bacteriana (GRECKA et al., 2019). Entretanto, os resultados não indicam uma redução efetiva da proporção de biofilme formado (Fig. 48).

Contudo, se faz importante comentar que existem abordagens diferentes com relação à aferição do impacto sobre biofilmes. Além disso, em alguns casos, os efeitos somente são observados quando utilizadas as concentrações de extrato iguais às concentrações inibitórias mínimas (MIC) (POPOVA et al., 2021). Assim como poucos estudos são conduzidos investigando a ação antibiofilme de extratos

não etanólicos de própolis sobre cepas clínicas multirresistentes das espécies *P. aeruginosa* (SANTOS, 2018).

3.19 Atividade leveduricida em culturas de *Saccharomyces bayanus*

3.19.1 Análise do crescimento

Em diferentes abordagens, são observados efeitos leveduricidas da própolis para espécies do gênero *Candida* (REIS et al., 2021), entretanto os autores pontuam que parece haver uma grande relação da composição de flavonoides e a atividade contra *C. albicans*. Contudo, análises mais amplas com outros fungos leveduriformes, inclusive outras espécies patogênicas de *Candida*, ainda não foram profundamente conduzidas (REIS et al., 2021). Assim, neste estudo a abordagem foi voltada para outra espécie de fungo leveduriforme visando identificar possíveis atividades biológicas para esses organismos.

Nesta análise nenhuma das amostras estudadas de *M. quadrifasciata* apresentaram redução significativa do crescimento da cultura (Fig. 49). Para esse cenário, a atividade leveduricida obtida para as amostras de São Paulo (Fig. 49–A) BQ5 foi maior, o oposto aos resultados observados para *P. aeruginosa* (item 3.17.1.1).

As leveduras compõem um grupo altamente disperso no ambiente, além de algumas espécies serem parte da comunidade microbiana das colmeias (ROSA et al., 2003). Um aspecto importante da abordagem utilizada é a compreensão das interações que os micro-organismos podem ter com a própolis. Neste caso, observamos que a maioria das amostras de própolis de *M. quadrifasciata* (OQ2, OQ3, BQ4, BQ5) tem pouco efeito sobre *S. bayanus* (Fig. 49). Entretanto, se faz importante ressaltar que possa haver variações dos resultados obtidos entre diferentes leveduras (REIS et al., 2021).

Para as amostras de *M. mondury* é observado um diferente resultado das respostas obtidas entre as colmeias. Há um baixo efeito sobre o crescimento da cultura para OR4, e um efeito bem mais intenso para OR2 (Fig. 50–A). Esse último grupo de colmeias apresentou uma atividade intermediária com os controles posi-

tivos, configurando uma atividade promissora, tendo em vista que os extratos estão em uma concentração baixa.

M. flavolineata (EF) e *M. marginata* (AM) iniciaram o experimento com uma redução do número de células na fase *log*, entretanto a densidade óptica ao final do período estudado foi equivalente ao controle negativo com DMSO, indicando a perda do efeito do extrato (Fig 50–B). Ao passo que *S. postica* (YP) apresentou uma redução intermediária aos controles positivos, principalmente após o final da fase *lag*, apresentando uma atividade inibitória mais proeminente.

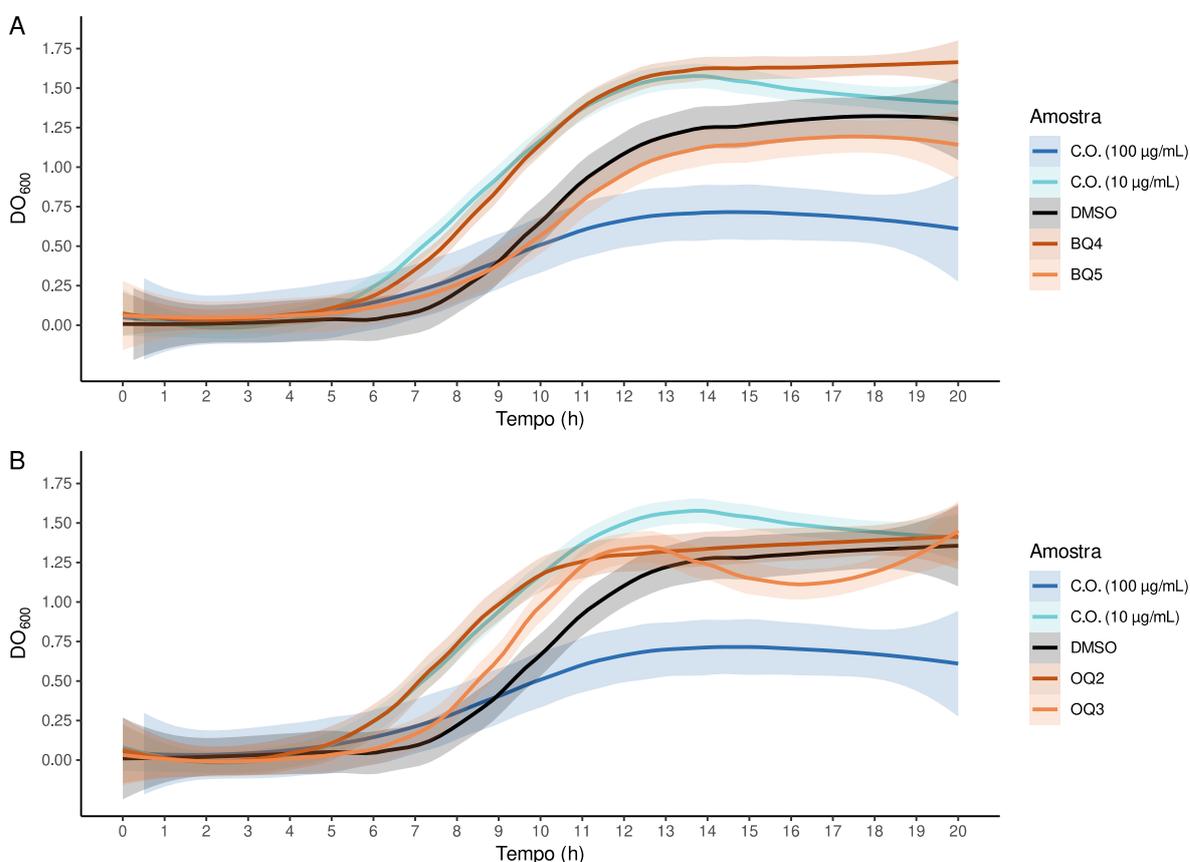


Figura 49: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO₆₀₀) de *Saccharomyces bayanus* ao ser exposta aos extratos Brutos etanólicos em DMSO de *Melipona quadrifasciata*. **A** – Amostras de São Paulo (B). **B** – Amostras de Cotia (Produtor O). Também estão representados o controle negativo (DMSO), e os controles positivos de ciclopirox olamina (C.O. 100 µg/mL e C.O. 10 µg/mL). As curvas foram obtidas pelo modelo aditivo generalizado (GAM) com a região sombreada representando o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Atualmente o papel de leveduras e bactérias vem sendo mais amplamente reconhecido para a sobrevivência da colmeia. Estudos recentes mostram que algumas espécies são essenciais na composição da microbiota para o desenvolvimento das abelhas (ECHEVERRIGARAY et al., 2021). Possivelmente *M. mondury* tenha uma importância das leveduras na microbiota da colmeia e/ou a escolha de fontes vegetais que apresentem compostos com baixa atividade sobre esse grupo de organismos.

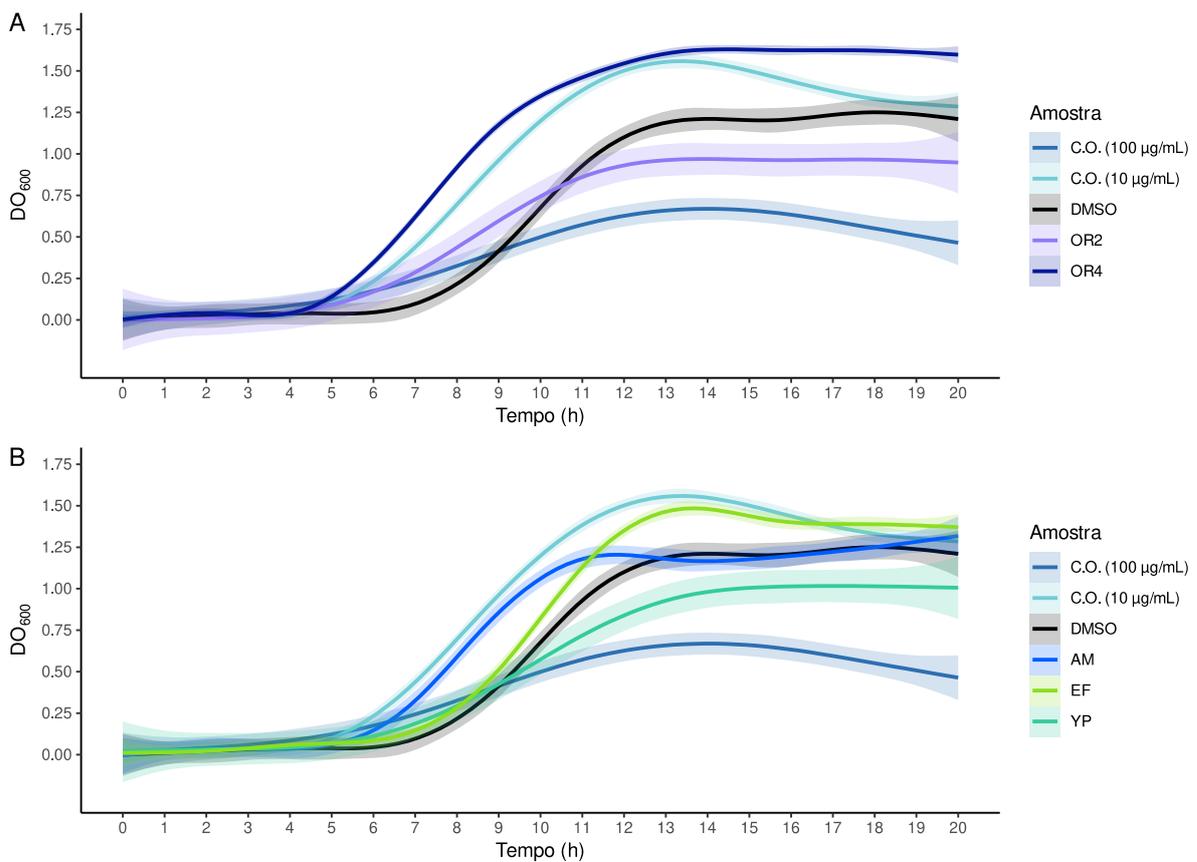


Figura 50: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO_{600}) de *Saccharomyces bayanus* ao ser exposta aos extratos Brutos etanólicos de Meliponini em DMSO. **A** – *M. mondury* de Cotia (O). **B** – Amostras de *M. marginata* (AM), *M. flavolineata* (EF) e *S. postica* (YP). Também estão representados o controle negativo (DMSO), e os controles positivos de ciclopiroxolamina (C.O. 100 µg/mL e C.O. 10 µg/mL). As curvas foram obtidas pelo modelo aditivo generalizado (GAM) com a região sombreada representando o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

As amostras de *M. subnitida* (NS e KS) apresentaram consistente variação de acordo com o produtor de origem (Fig. 51). A amostra do produtor rural apresentou uma atividade intermediária dos controles (KS), enquanto a proveniente do produtor de origem urbana (NS) apresentou um efeito ainda mais intenso do que o observado para o controle com ciclopirox olamina em concentração de 100 µg/mL (Fig. 51). Possuindo um crescimento alterado, sem fases de desenvolvimento microbiano sequer definidas.

M. subnitida é uma espécie reconhecidamente especialista na polinização, apresentando um comportamento seletivo de suas fontes alimentares (HRNCIR et al., 2019), contudo poucos dados sobre sua atividade de coleta de própolis são documentadas. Tendo em vista as diferenças observadas entre o cenário urbano e rural, possivelmente as fontes de resina exploradas podem ser mais diversas, ou ainda há uma exploração em diferentes proporções das mesmas espécies.

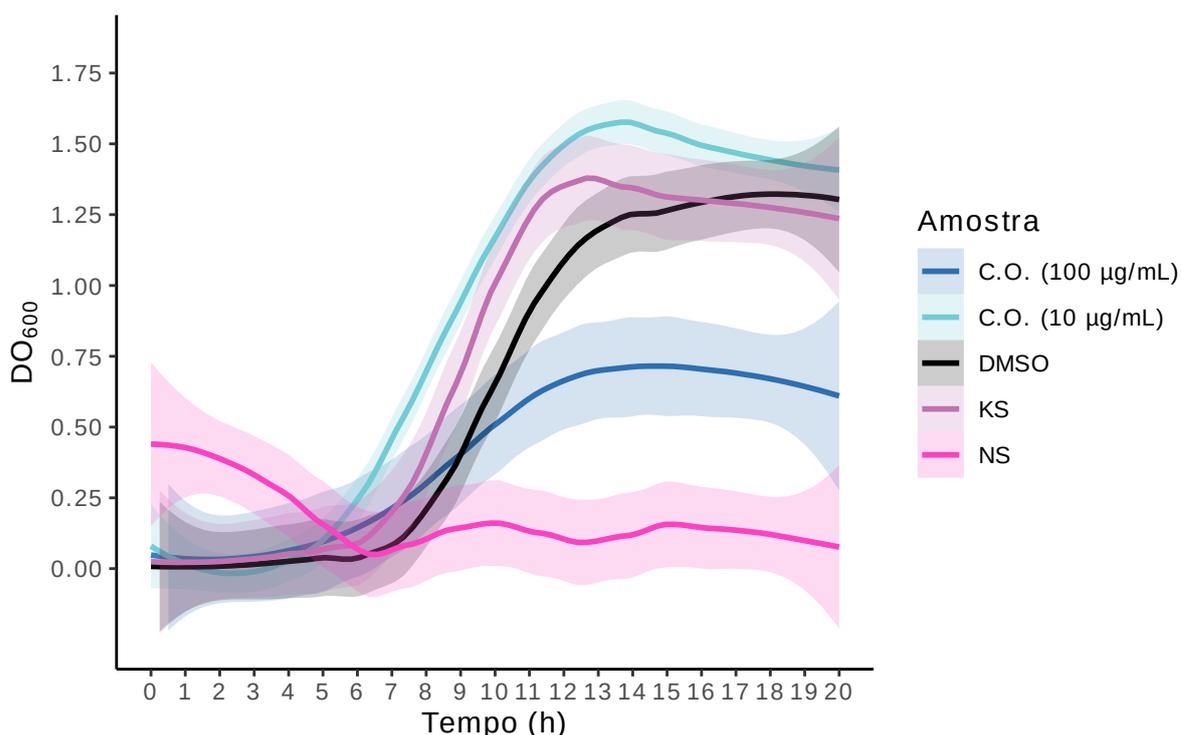


Figura 51: Análise do desenvolvimento pela densidade óptica (DO₆₀₀) de *Saccharomyces bayanus* ao ser exposta ao extrato Bruto etanólico em DMSO de *Melipona subnitida*. Também estão representados o controle negativo (DMSO), e os controles positivos de ciclopirox olamina (C.O. 100 µg/mL e C.O. 10 µg/mL). As curvas foram obtidas pelo modelo aditivo generalizado (GAM)

com a região sombreada representando o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

A atividade apresentada pelas amostras pode ser promissora para controles de leveduras. Principalmente pela visível redução do tamanho celular da cultura (Fig. 52–B) ao ser comparada ao controle negativo (Fig. 52–A). Devido a resultados similares, alguns autores até propõem testes preliminares de sua utilização em conjunto com os compostos atualmente empregados no tratamento regular de infecções de fungos leveduriformes (PIPPI et al., 2015).

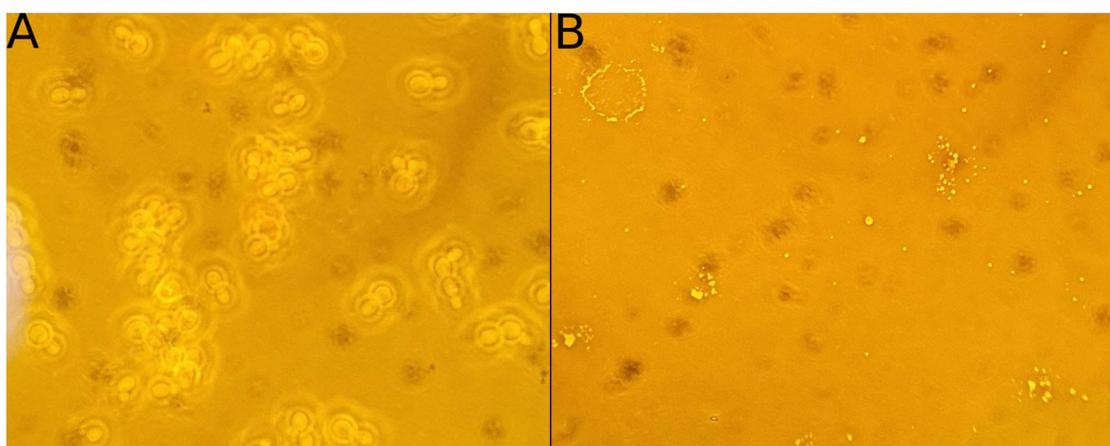


Figura 52: Observação ao microscópio da cultura de *S. bayanus*. **A** – Células da cultura de controle com DMSO $\varphi = 0.5$ %. **B** – Células após o tratamento com o extrato bruto etanólico de *M. subnitida* da região urbana de Mossoró (NS).

As amostras obtidas do gênero *Scaptotrigona* apresentaram variações entre as diferentes espécies e locais de origem (Fig. 53). É observada uma grande consistência para o efeito das amostras de *S. xanthotricha* (AX e SX), apresentando grande redução do crescimento, independentemente da origem.

Já para as amostras de *S. bipunctata* foram obtidas variações das diferentes regiões (Fig. 53). Em que as amostras provenientes do Guarujá (produtor A) apresentaram uma atividade intermediária do que foi observado para os controles, enquanto a amostra proveniente de Jacuí (S) apresentou baixa atividade. Na literatura,

é mencionado que a própolis parece não ter uma ação tão proeminente contra bactérias Gram-negativas e leveduras (PEIXOTO et al., 2021). Entretanto, quando observada, as maiores atividades leveduricida coincidem com amostras de maior teor de flavonoides ácidos fenólicos e terpenos (AFROUZAN et al., 2018). No caso das amostras de *Scaptotrigona* de jacuí, as duas apresentaram um perfil fenólico similar, entretanto os teores dos compostos variou entre elas (Fig. 30), o que poderia ser responsável pelas diferenças observadas (Fig. 53).

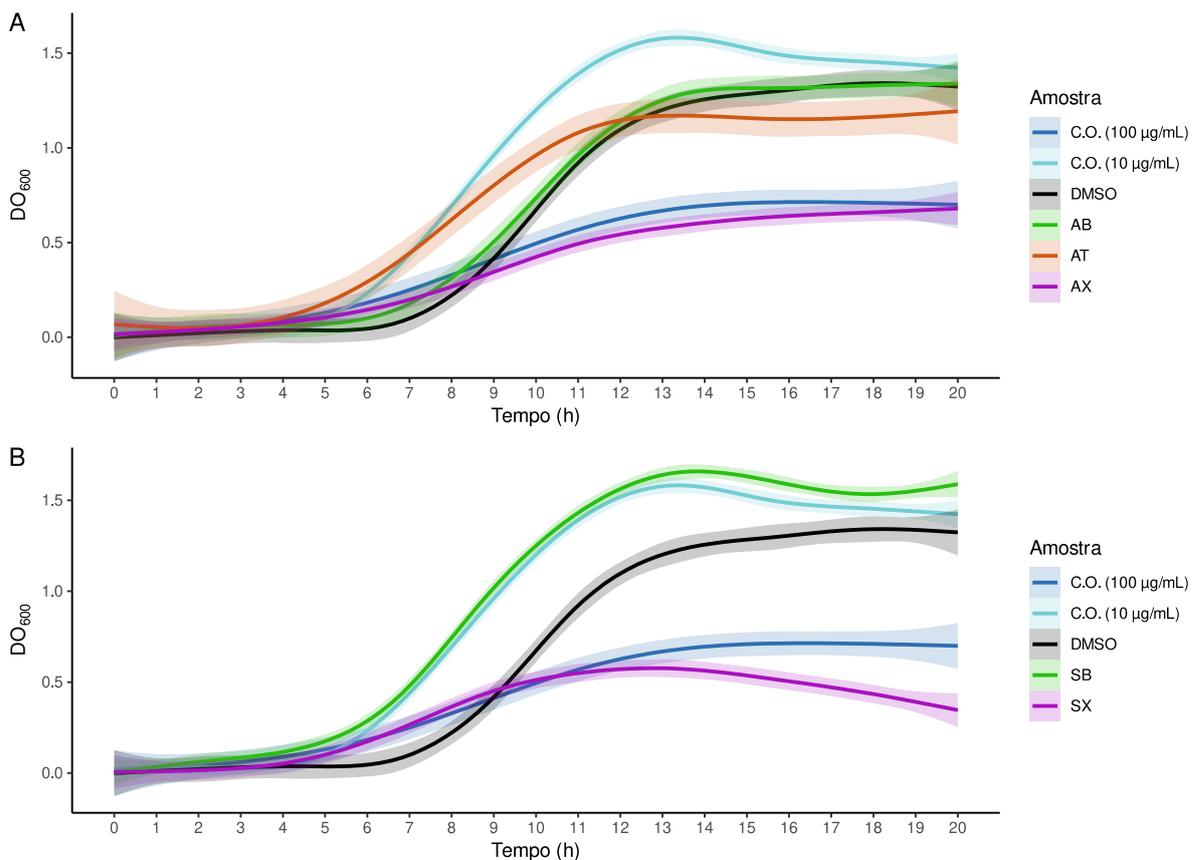


Figura 53: Curva de crescimento pela análise de densidade óptica (DO_{600}) de *Saccharomyces bayanus* ao ser exposta aos extratos Brutos etanólicos em DMSO. **A** – Amostras do Guarujá (A). **B** – Amostras de jacuí (Produtor S). Também estão representados o controle negativo (DMSO), e os controles positivos de ciclopirox olamina (C.O. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e C.O. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As curvas foram obtidas pelo modelo aditivo generalizado (GAM) com a região sombreada representando o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Existe também a possibilidade de interação entre algumas espécies com os microrganismos, já que alguns dos diferentes componentes da colmeia de *Scapto-*

trigona sp. provenientes de florestas tropicais secas, apresentaram espécies de fungos, incluindo exemplares do *Candida*, entretanto esse dado foi extremamente variante entre os táxons de Meliponini estudados (ECHEVERRIGARAY et al., 2021). Além disso, há a possibilidade de uma exploração diferencial das plantas, de modo a impactar a composição da própolis e alterar os microrganismos capazes de compor a microbiota da colmeia.

Ao mesmo tempo, alguns estudos apontam que pela atividade antifúngica o extrato de própolis também apresenta a possibilidade de conservar produtos madeiros com eficiência, apresentando a vantagem de ser sustentável e biodegradável (BRODA, 2020). Os resultados indicam que das própolis estudadas as com maior potencial para essa aplicação, e estudos voltados para esse fim, seriam utilizando amostras provenientes das espécies de *S. bipunctata* (AB e SB) (Fig. 53) e *M. subnitida* (NS e KS) (Fig. 51). Todavia, a intensidade e a forma como cada uma das amostras impacta a cultura, varia (Fig. 53). Isso é previamente documentado na literatura, nas quais foram obtidas grandes variações de atividades entre amostras com efeitos em diferentes etapas do crescimento da cultura (REIS et al., 2021).

S. bayanus é uma espécie de grande importância, principalmente para vinificação, em especial a produção de cidras, compondo o complexo de espécies do gênero *Saccharomyces* de maior importância para a indústria alimentícia (RAINIERI et al., 2006). Como o extrato de própolis também pode ser empregado como componente alimentar, os dados aqui obtidos indicam que para os produtos que dependam do crescimento de leveduras não seria vantajoso o acréscimo de extrato de própolis de algumas das espécies trabalhadas durante essa fase.

3.19.2 Ensaio de incorporação de vermelho neutro

A aferição da densidade óptica é um dos métodos mais amplamente utilizados e auxilia no monitoramento do crescimento da cultura, contudo, existem interferências nessa leitura (KRISHNAMURTHI et al., 2021). Para o caso dos experimentos empregados neste estudo, a principal forma de interferência ocorre pelos indivíduos mortos que mantêm a estrutura celular intacta. Além das alterações celulares que podem ocorrer durante o crescimento da cultura afetarem os resultados obtidos (SUTTON, 2011).

A metodologia do vermelho neutro é extensamente aplicada para determinação de citotoxicidade de compostos, por se basear na capacidade que células viáveis apresentam de reter moléculas de vermelho neutro (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; ABCAM, 2018). O vermelho neutro é um corante eurodina vital, capaz de atravessar as membranas celulares que na presença de compartimentos celulares com pH abaixo de 6,8 se ioniza, e acaba retido pelo compartimento. Em células eucarióticas o principal compartimento celular que retém o vermelho neutro são os lisossomos com transporte ativo funcional, desse modo o método somente contabiliza células viáveis (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; ABCAM, 2018; PROMOKINE; PROMOCCELL, 2019), reduzindo a principal interferência presente na aferição por densidade óptica.

Com relação ao método de vermelho neutro observamos dois padrões de resposta, em um deles, as amostras promovem uma redução significativa da quantidade de leveduras vivas nas primeiras 30 horas do experimento (Fig. 54–A), enquanto no outro, o efeito é observado por volta de 45 horas de exposição ao extrato (Fig. 54–B).

Existe uma boa congruência dos resultados obtidos por essa metodologia com a observação do crescimento pelo aumento da densidade óptica (tópico 3.19.1), principalmente porque todas as amostras em que foram observados efeitos nas primeiras horas, também são obtidos por esse método. Entretanto, existem amostras como OR2 e OR4 (Fig. 54–A) que não apresentaram atividade pela observação da densidade óptica, mas foram ativas pela técnica de vermelho neutro. Indicando que há uma atividade antimicrobiana na metodologia de vermelho neutro, que não é observada no crescimento microbiano por meio da densidade óptica, possivelmente pela morte de células sem que ocorra a lise celular.

Outra forma de atividade pôde ser observada para algumas amostras, de modo que uma pequena redução da viabilidade celular aconteceu em cerca de 40 horas de exposição aos extratos (Fig. 54–B). Mesmo não sendo estatisticamente significativa, essa diferença deve ser comentada, tendo em vista que alguns autores também obtiveram que para alguns organismos o efeito da própolis de *M. fasciculata* é observado após dois dias de exposição (ARAÚJO et al., 2015), enquanto outros obtiveram efeitos em períodos de exposição ainda mais longos (REIS et al., 2021). É notável também que o material proveniente de *S. xanthotricha* (AX e SX), que apre-

sentou alta atividade leveduricida durante as primeiras 20 horas, apresenta baixo efeito quando analisado a longo prazo.

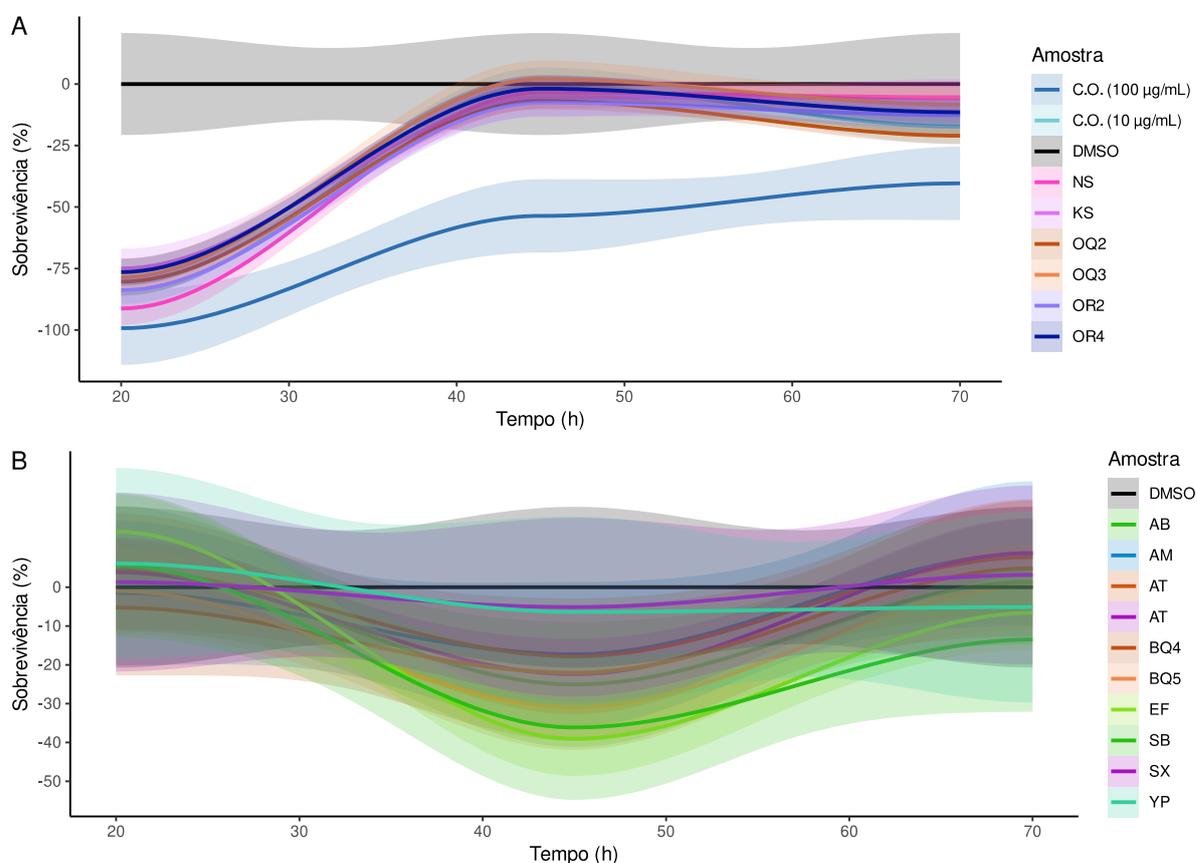


Figura 54: Análise do desenvolvimento da cultura pela retenção de vermelho-neutro de *Saccharomyces bayanus* ao ser exposta ao extrato Bruto etanólico em DMSO das amostras de Meliponini estudadas. **A** – Extratos com maior redução nas primeiras horas de contato. **B** – extratos com atividade intermediária do estudo. Também estão representados o controle negativo (DMSO), e os controles positivos de ciclopirox olamina (C.O 100 µg/mL e C.O 10 µg/mL). As curvas foram obtidas pelo método de regressão local (loess) com a região sombreada representando o intervalo de confiança de 95%. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

A atividade de alguns compostos vem sendo promissoras para o combate de fungos, ou mesmo fornecendo moléculas alternativas que reduzem a sobrevivência desse grupo de organismos (MENEGATTI et al., 2020). Neste trabalho, encontramos amostras com efeitos de curto e médio prazo, entretanto é importante ressaltar a importância do tempo de análise para atividades antimicrobianas de modo que

nem todos os compostos apresentam atividade rápida sobre o desenvolvimento microbiano.

3.20 Caracterização microbiológica

Assim como as análises químicas, controles de qualidade biológicos, principalmente antibacterianos deveriam ser incluídos nas análises de própolis (BOUZA-HOUANE et al., 2021). A diversidade microbiana das abelhas sem ferrão ainda é muito pouco conhecida, principalmente pelos estudos focarem na identificação e pouco nas interações entre os organismos (NGALIMAT et al., 2020). No caso da própolis, esse ainda é um aspecto pouco explorado. Desse modo, esta seção é dedicada a avaliar os constituintes da própolis baseados nas instruções de análise microbiológica dos alimentos (BRASIL, 2014; DA SILVA et al., 2017).

A contagem de unidades formadoras de colônia variou de maneira consistente entre as amostras, assim como a proporção dos grupos de micro-organismos que faziam parte da composição microbiana (Fig. 55). Foram obtidas variações entre as amostras provenientes de um mesmo produtor, tanto para o grupo de organismos, quanto para a quantidade de bactérias, não sendo possível determinar um padrão específico. A presença de bolores foi unânime em todas as amostras, enquanto a presença de diferentes grupos de bactérias foi muito variante.

A presença de coliformes foi obtida para as amostras de *M. marginata* (AM) e *S. xanthotricha* (AX) do Guarujá (A), *S. xanthotricha* de Jacuí (SX), e *M. quadrifasciata* e *M. mondury* de Cotia (O) (Fig. 55). Com exceção das amostras de *S. xanthotricha* (AX e SX), não parece haver uma relação da espécie ou mesmo da origem para a presença desses organismos.

A identificação de coliformes é importante, e presente nos parâmetros tanto nacionais quanto internacionais de análise microbiológica (BRASIL, 2014, 2019; FENG et al., 2020). Este grupo está amplamente disperso no ambiente, incluindo o solo, em vegetais e no trato digestório de animais (BRASIL, 2014; KITLABOR, 2018). Desse modo, esse grupo de bactérias é utilizado no contexto industrial como indicador de contaminação da cadeia produtiva, ou contaminações de manipulação (KITLABOR, 2018), principalmente tendo em vista que esses organismos são facil-

mente eliminados por compostos sanitizantes (DA SILVA et al., 2017; KITLABOR, 2018).

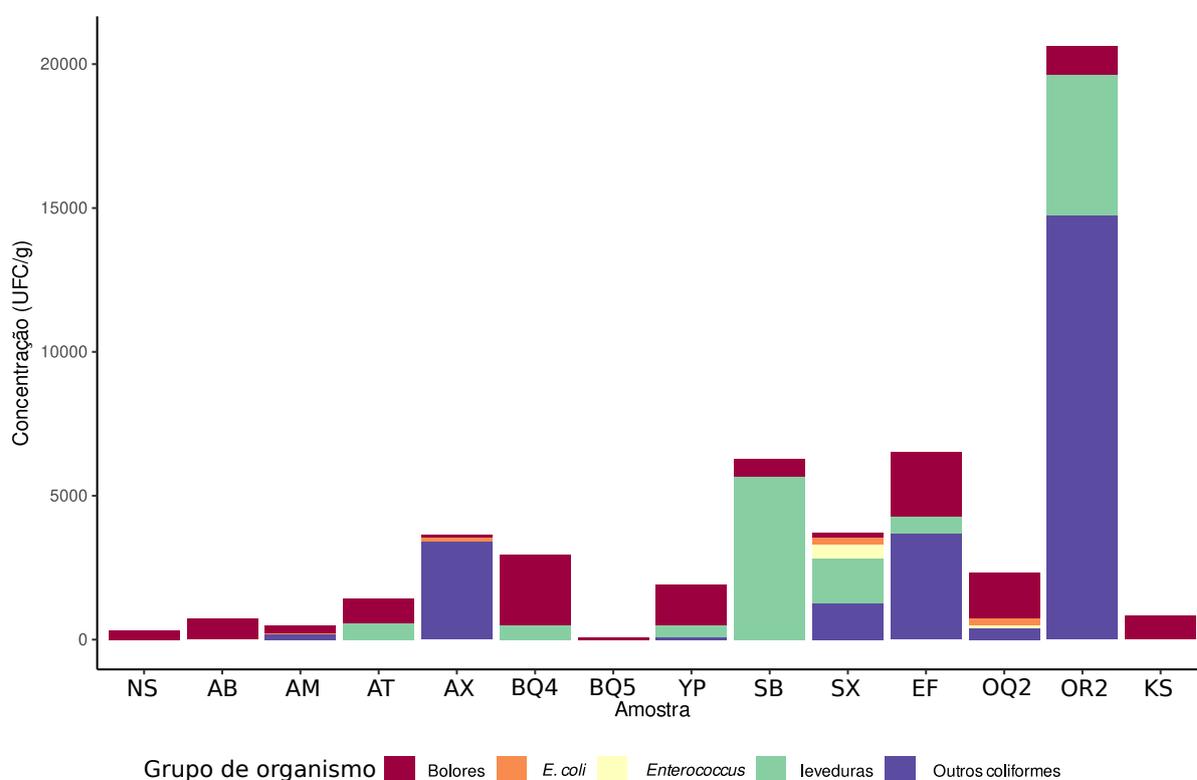


Figura 55: Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) em cada amostra de própolis de acordo com o grande grupo de micro-organismo. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Poderia ser esperado que as amostras que possuem solo apresentariam maiores contaminações por esse organismo, tendo em vista sua grande dispersão no ambiente, além da presença marcante no solo de ambientes naturais. Entretanto, o que se opõe a essa inferência é a presença desse grupo bacteriano nas amostras de *S. xanthotricha* do produtor A, na qual não há inclusão de material edáfico (item 3.2), assim como a ausência dessa espécie de bactéria em amostras que apresentam altos teores de solo como *M. quadrifasciata* de São Paulo (produtor B), e amostra OQ2 de Cotia (O). Portanto, não parece existir uma associação próxima entre a inclusão de solo e a presença de coliformes.

Inicialmente, a presença de *E. coli* era utilizada como indicador da presença de material de origem fecal nas amostras. Essa forma de interpretação

está em desuso com as novas descobertas da presença dessa bactéria em ambientes naturais, e em instalações com condições inadequadas de sanitização, além de sua capacidade de sobreviverem mesmo sob refrigeração (SILVA et al., 2019). Assim, a presença de *E. coli* nas amostras pode indicar que essa espécie está presente no ambiente, e sua contaminação foi fruto da manipulação humana durante a coleta e armazenamento do material. Também não pode ser descartada a hipótese das abelhas inocularem a própolis durante sua manipulação, podendo ainda essa bactéria ser um componente do microbioma da colmeia.

Poucos aspectos com relação ao microbioma das abelhas sem ferrão tem sido completamente esclarecidos, e ainda menos estudos se concentram especificamente na presença de bactérias na própolis. A composição do microbioma pode ter origem do ar, das flores e outros recursos vegetais visitados, ou mesmo pelo próprio trato digestório das abelhas (NGALIMAT et al., 2020). Além disso, não pode ser descartada a possibilidade de contaminação humana ao extrair os produtos das colmeias, principalmente quando não há um cuidado específico para esterilidade das amostras (NGALIMAT et al., 2020).

Os avanços mais recentes, vem apresentando que os gêneros de bactérias mais comuns associados aos produtos como mel de abelhas sem ferrão são *Bacillus*, *Streptomyces*, e *Lactobacillus* (NGALIMAT et al., 2020). Outros gêneros comumente encontrados são *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, e *Salmonella* que foram previamente observados no mel de *Tetragonistica angustula* (NGALIMAT et al., 2020). Como componentes da microbiota da colmeia, os membros das famílias Enterobacteriaceae e Acetobacteraceae foram as principais isoladas dos gêneros *Melipona* e *Tetragonula* (NGALIMAT et al., 2020). Contudo, a compreensão do possível papel ou atuação dessas bactérias na composição da própolis ainda são pouco discutidas (NGALIMAT et al., 2020).

Enterobacteriaceae é a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância médica (BRASIL, 2014). A maioria das espécies dessa família pode ser encontrada no trato gastrointestinal de humanos, no reino animal, na água, solo e vegetais (KITLABOR, 2018). As enterobactérias representam 80 % ou mais de todos os organismos Gram negativos de importância clínica que são isolados na rotina microbiológica (BRASIL, 2014). Sendo responsáveis por de cerca de 70 % das infecções urinárias e 50 % das septicemias (BRASIL, 2014).

Dentro de Enterobacteriaceae, o gênero *Enterococcus* é mais usualmente encontrado no trato intestinal de animais e em alguns casos, no sistema genital feminino (ANVISA, 2007). Compreendendo espécies bacterianas de importância clínica e hospitalar pelo aumento recente de casos gerados por esse grupo, além de novas cepas resistentes a antibióticos estarem surgindo (ANVISA, 2007; BRASIL, 2014). Ademais, *E. faecalis* pode formar biofilmes, sendo capaz de criar lesões após procedimentos odontológicos de canal radicular (MOODUTO et al., 2021).

Como esse gênero apresenta baixa resistência às variáveis ambientais, não resistindo muito tempo em ambientes desfavoráveis, ele não ocorre em águas e solos de áreas não poluídas, sendo que as raras incidências são relacionadas diretamente à contaminação por animais homeotérmicos de vida selvagem, através de contaminação fecal recente, ou ainda à drenagem dos solos por enxurradas (NGALIMAT et al., 2020).

A análise com relação à presença desse gênero de bactérias se deu principalmente porque muitos meliponicultores também possuíam criações de animais, ou a região de produção eram locais próximos a recursos hídricos poluídos, o que possivelmente representariam um risco de contaminação da própolis caso as abelhas utilizassem solo ou qualquer material dessa área. Contudo, somente *S. xanthotricha* de Jacuí (SX) e *M. quadrifasciata* de Cotia (OQ2) apresentaram, e em baixas quantidades, unidades formadoras de colônia desse grupo (Fig. 55).

Existem duas principais hipóteses para compreensão dos resultados obtidos. A primeira seria que as abelhas são pouco criteriosas e utilizam o material contaminado da região, contudo, a maioria das amostras de própolis apresentam atividade antibacteriana, ou comunidades microbianas pouco suscetíveis ao seu estabelecimento, e as bactérias mesmo sendo inoculadas constantemente, não são capazes de sobreviver sobre a própolis (MARCUCCI et al., 2021). A segunda hipótese seria que as abelhas são criteriosas com relação ao material escolhido para compor a própolis, e a contaminação do material se deu de maneira acidental, por isso é encontrado em baixa frequência (Fig. 56).

O conjunto de dados obtidos indica uma possível associação das duas hipóteses. Os resultados da análise das cinzas indica que as abelhas parecem ter um certo grau de seleção dos componentes de solo que irão compor a própolis (tópico 3.3), apontando que possivelmente as abelhas podem ser criteriosas.

Até certo grau de contaminação existe a possibilidade do consumo de produtos das abelhas sem ferrão (DIVYA et al., 2020). Para os grupos mais comuns de bactérias, o consumo de produtos derivados com níveis muito baixos pode ser seguro. A quantidade bacteriana mínima necessária para gerar sintomas patogênicos em adultos saudáveis é de 10^5 UFC/g (DIVYA et al., 2020).

Não existem parâmetros microbiológicos estabelecidos para a própolis, tendo em vista que seu consumo *in natura* é difícil por seu sabor amargo, e baixa solubilidade (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019) assim, sua principal aplicação alimentar se dá essencialmente através de extratos ou de preparados mistos com o mel (LIAUDANSKAS et al., 2021). Entretanto, pode ser traçado um paralelo com a legislação atual, considerando que a própolis seria destinada ao consumo *in natura*, isso levaria à possibilidade de se classificar esse produto na categoria de “alimento pronto para consumo e/ou suplemento em gel não comercialmente estéril”, presentes na legislação atual em vigor (BRASIL; BRASIL; BRASIL, 2019).

Para os parâmetros atualmente estabelecidos, as amostras de *S. xanthotricha*, *M. quadrifasciata* e *M. mondury* de Cotia (O) e *M. flavolineata* (EF) são inadequadas para consumo *in natura* pelos conteúdos de unidades formadoras de colônias de enterobacteriaceae (aqui avaliados separadamente como *E. coli* e outros coliformes) estando muito acima dos valores máximos permitidos.

Com relação a bolores e leveduras somente as amostras *M. marginata* (AM) e *S. xanthotricha* (AX) do Guarujá (A), *M. quadrifasciata* (BQ5) de São Paulo e *M. subnitida* (NS) apresentam quantidades aceitáveis. Desse modo, é possível notar que um número baixo dos materiais amostrados e analisados neste estudo seriam qualificadas para o consumo *in natura*.

Neste estudo também foi possível observar que os bolores e leveduras estão abundantemente presentes em maior parte das amostras (Fig. 55). Para *S. tubiba* (AT) e *S. bipunctata* (AB) do Guarujá (A), as amostras de *M. quadrifasciata* de São Paulo (BQ4 e BQ5) além das amostras de *M. subnitida* (NS e KS) esses organismos, dentre os grupos estudados, compõem a totalidade das unidades formadoras de colônia contabilizadas (Fig. 56).

As leveduras são um diverso grupo presente no solo e no próprio ar, enquanto os bolores são versáteis e podem assimilar carbono de quase qualquer fon-

te (DA SILVA et al., 2017). Apresentando esse conjunto de características, esses dois grupos são quase universalmente dispersos.

No caso dos produtos de abelhas sem ferrão, como o mel, algumas espécies apresentaram colônias de *Streptomyces* sp. e essas espécies parecem ser responsáveis pelo controle de outros micro-organismos patogênicos de abelhas (MENEGATTI et al., 2020). Também foi descoberto que para alguns dos organismos componentes da microbiota da colmeia parecem ser regionalmente associados, como *Starmerella meliponinor* uma das espécies de levedura mais prevalentes. Estando associada com diversas espécies de abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, e *Trigona fulviventris*) da região subtropical do Brasil, mais especificamente do Estado de Minas Gerais (ECHEVERRIGARAY et al., 2021). Entretanto, nesse caso, a prevalência de *Starmerella meliponinor* depende da região geográfica além de variar com relação á espécie de abelha (ECHEVERRIGARAY et al., 2021).

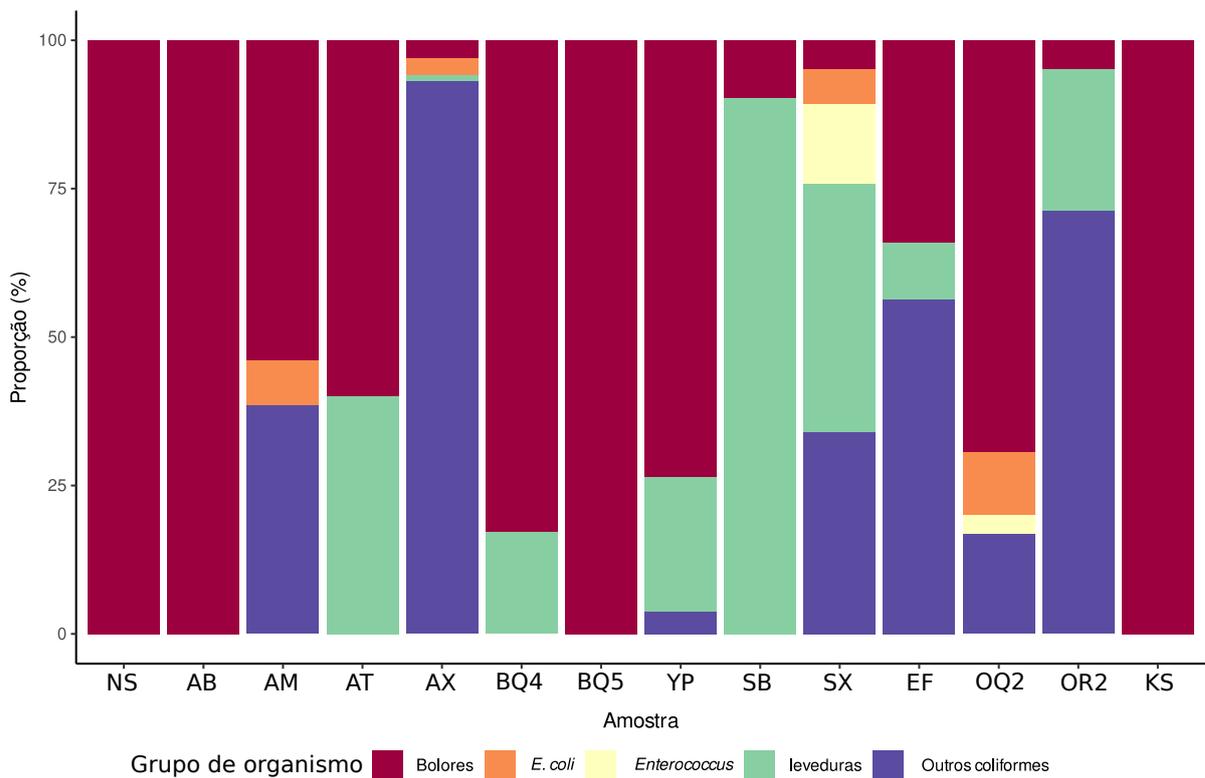


Figura 56: Proporção de unidades formadoras de colônia de acordo com o grande grupo de micro-organismo. As siglas utilizadas correspondem ao indicado pela Tabela 1.

Nas amostras que obtivemos, os bolores e leveduras parecem compor a maior parte dos microrganismos componentes da própolis. Entretanto, alguns estudos demonstraram que as leveduras costumam ser pouco abundantes na microbiota das operárias de alguns membros de Meliponini provenientes da região do Jalapão (NETO; MORAIS, 2020), e que no mel não compõem mais que 10% das unidades formadoras de colônia (ECHEVERRIGARAY et al., 2021). Neste estudo, os bolores e leveduras representam grande parte dos microrganismos presentes na maioria das amostras de própolis estudadas, sendo bem diferente do que o relatado para os outros produtos da meliponicultura.

A origem da microbiota e o estabelecimento do microbioma são temas ainda pouco conhecidos, mas os indícios mais recentes indicam que as inoculações têm como origem o pólen, o néctar, e as próprias abelhas (ECHEVERRIGARAY et al., 2021). Como as operárias não apresentam abundantes quantidades de leveduras compondo sua microbiota, seria esperado que a fonte desses organismos na própolis seria o material resinoso ou mesmo, quando presente, o solo. Além disso, dependendo da composição do material também seria esperado que não haveria sobrevivência desses organismos, pela atividade que a própria resina componente da própolis pode apresentar.

4 Conclusão

Neste trabalho foi observado uma grande influência regional na composição da própolis, principalmente para o teor de umidade das amostras, possivelmente devido às variações ambientais.

A inclusão de solo parece estar intimamente ligada à espécie, não ocorrendo de maneira universal nas abelhas sem ferrão.

A inclusão de ceras é um fator inversamente relacionado com a presença de solo, e indica que esses compostos podem exercer o mesmo papel em Meliponini. Também foi obtida uma boa correlação inversa entre o teor de cinzas e a solubilidade em etanol para as espécies que incluem solo na composição da própolis. Não foi obtida uma associação consistente entre o teor de cera e o teor de compostos fenólicos.

A composição geral varia entre as regiões e espécies diferentes, indicando uma possível exploração ou disponibilidade diferente das fontes vegetais até mesmo por colmeias da mesma espécie em ambientes distintos. Contudo, há uma semelhança muito grande da composição geral com relação ao gênero de abelhas do qual a própolis é proveniente.

Os componentes da fração de hidrocarbonetos indica uma relação grande entre as amostras de mesma espécie. Contribuindo para a hipótese de que essa fração de compostos recebem maior contribuição de componentes da cera das abelhas do que da resina vegetal.

O método de ABTS foi o mais sensível para a atividade antioxidante como um todo, entretanto ORAC foi mais efetivo para determinação de atividade antioxidante em frações apolares da própolis.

Poucas amostras apresentaram efeitos sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, e *E. coli*, enquanto os resultados contra *S. aureus* e *S. bayanus* foram mais promissores.

As amostras afetaram as culturas de leveduras de duas maneiras principais, uma de curto e outra de médio prazo. Esses efeitos foram mais predominantemente associados com amostras da mesma espécie em um mesmo produtor.

As amostras estudadas apresentavam altos teores de bolores e leveduras, sendo rara a presença de *Enterococcus* sp. e *E. coli*.

Como também concluído por outros autores, se considerados de maneira isolada, a espécie ou a localização das amostras por si só não é suficiente para determinar todos os aspectos composicionais da própolis (EROĞLU; ACAR; KEKEÇOĞLU, 2021).

Resumo

A própolis é um produto de composição complexa, composto pela cera de abelhas e resinas de plantas. É um importante produto para a humanidade desde a antiguidade. Atualmente, faz parte da composição de cosméticos, produtos de higiene, bebidas, medicamentos e alimentos. Ao incorporar solo à própolis, as abelhas nativas (abelhas sem ferrão) produzem o que é chamado de geoprópolis. Pouco se sabe da constituição das própolis dessas com relação à produção de cera, substâncias fenólicas, substâncias voláteis e quantidade de terra incorporada à própolis, dentre outras características. Desse modo, este estudo visou analisar os teores desses metabólitos, além de determinar sua composição química e avaliar a atividade antioxidante e biológica de amostras de própolis de espécies nativas brasileiras, compreendendo amostras de própolis de seis espécies de *Melipona* e quatro de *Scaptotrigona*, provenientes de meliponários dos estados do Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. A partir de ensaios como o teor de cinzas, de umidade, de ceras, compostos voláteis, fenóis totais, flavonoides, flavonas e dihidroflanóis, foram avaliadas diferenças entre as amostras, tanto dos locais de coleta, quanto às diferentes espécies de abelhas produtoras das própolis. Por extrações fracionadas com solventes de polaridades crescentes, foram feitas análises por CG-EM e CLAE-EM. Além da aferição do potencial antimicrobiano. A presença de solo não é universal em Meliponini. Existindo uma relação inversa entre a proporção de cera e solo. O teor de compostos fenólicos variou muito entre os métodos colorimétricos, com a cromatografia confirmando a presença de compostos usualmente indicados como comuns para a própolis de outras espécies do grupo. As frações polares das amostras apresentaram intensa atividade antioxidante em sua maioria. Ainda que tenha sido observada atividade em frações apolares. Não são obtidas atividades intensas contra o crescimento das bactérias Gram-negativas estudadas. O impacto mais consistente se deu contra o crescimento de leveduras. O microbioma das amostras era predominantemente de bolores e leveduras, em detrimento de bactérias de importância médica.

Palavras-chave: Meliponini, *Scaptotrigona*, *Melipona*, Geoprópolis, Controle de qualidade.

Abstract

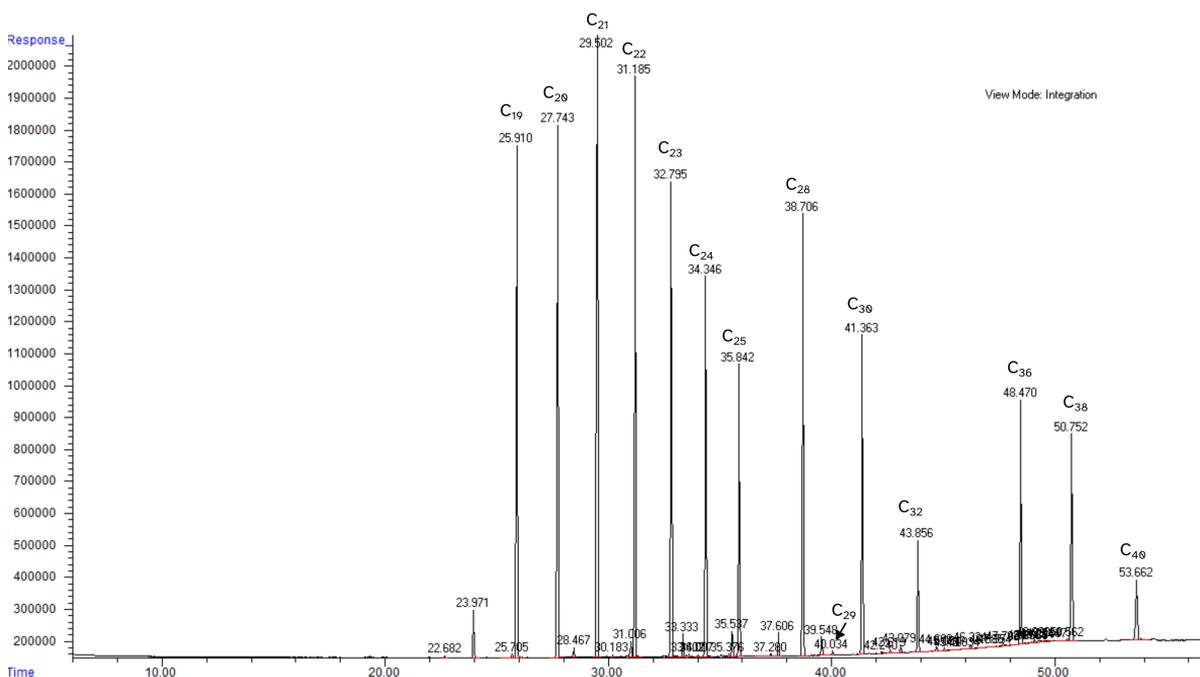
Propolis is a product of complex composition, made up chiefly of beeswax and plant resins. It has been a relevant product for humanity since antiquity. Currently, it is part of the composition of cosmetics, hygiene products, beverages, medicines, and foods. By incorporating soil into propolis, native bees (stingless bees) produce what is called geopropolis. Little is known about its constitution concerning the production of wax, phenolics, volatile substances, and the proportion of soil incorporated into the propolis, among others. Thus, this study aimed to analyze quantitatively and qualitatively their chemical composition, as well as to evaluate the antioxidant and biological activity of native Brazilian species samples from two genera, composed of six samples of propolis of *Melipona* and four of *Scaptotrigona*, stemming from meliponaries in the states of Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Bahia, Minas Gerais and São Paulo. Analyses of evaluation of the contents of moisture, wax, volatile substances, total phenols, flavonols and flavones, flavonones and dihydroflavonols differences were noted between samples, due to the collection sites and the species. Mineralogical analyses were carried out with the residue left after calcination of samples of geopropolis. By fractionated extractions with increasing polarity solvents, analyses were performed by GC-EM and HPLC-EM in addition to the evaluation of the antimicrobial and the antioxidant potential. The presence of soil is not universal in Meliponini. An inverse relationship between the proportion of wax and soil was detected in the analyses of the present work. The content of phenolic compounds varied widely between the colorimetric methods, with chromatography confirming the presence of compounds usually indicated as common in propolis of other bee species. Most polar fractions showed intense antioxidant activity. Lower activity was noticed regarding less polar fractions. Pronounced inhibitory activity was noticed against Gram-positive, but not against Gram-negative bacteria. Highly promising results were obtained with assays against the growth of yeasts. The microbiome of the analyzed samples was predominantly characterized by molds and yeasts, instead of harmful bacteria.

Key words: Meliponini, *Scaptotrigona*, *Melipona*, Geopropolis, Quality control

5 Apêndices

5.1 Apêndice A

Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos utilizado para identificação do tamanho das cadeias carbônicas.



5.2 Apêndice B

Matriz de composição dos óleos voláteis das amostras estudadas.

ID Compostos	AM	AX	AT	AB	BQ4	BQ5	EF	OQ2	OQ3	OR2	SB	SX	YP
1 α -Pineno	0	0	0	1.14	1.2	0	0	0	0	0	0	0	1.23
2 R- α -Pineno	0	0	0	0	0	1.13	1.36	1.03	21.23	30.64	0	0	0
3 β -Pineno	0	0	1.26	0	0	0	0	0	0	10.69	0	0	0
4 L-B-Pineno	0	0	0	0	1.09	0	0	0	8.52	0	0	0	0
5 4-Etilfenol	0	0	0	0	0	0	0	2.13	0	0	0	0	0
6 α -cubeno	1.71	0	2.46	0.43	0	0	0	1.19	0	0	1.07	0	0
7 Paracimeno	0	0	0	0	0	1.2	0	0	0	0	0	0	0
8 β -Cimeno	0	0	0	0	1.28	0	0	0	0	0	0	0	0

9 Copaeno	4.38	2.36	15.41	0	0	0	0	0	0	0	0	3.65	0	0
10 Canfeno	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11 α -gurjuneno	0	1.27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Limoneno	0	0	0	0	2	1.54	0	0	0	0	0	0	0	0
13 L-4-Terpineol	0	1.49	0	0	8.1	3.36	0	2.95	0	0	0	0	0	0
14 Fenchol	0	0	0	0.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 Pinocarpona	0	0	0	0.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 Borneol	0	0	0	0.46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17 Terpeneol	0	0	0	0	6.15	3.32	0	3.96	0	0	0	0	0	0
18 Mirtenal	0	0	0	0.52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 Mirtenol	0	0	0	0	1.27	0	0	2.81	0	0	0	0	0	0
Acetato de														
20 terpinilo	0	0	0	0	0	1.27	0	0	0	0	0	0	0	0
21 Verbenona	0	0	0	0.35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P-menta-6,8-														
22 dien-2-ois	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetato de														
23 bornil	0	0	0	0.49	1	0	0	1.15	0	0	0	0	0	0
24 δ -Elemeno	0	0	0	0	1.63	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 Cariofileno	4.2	6.96	4.61	2.22	0	3.63	1.17	5.23	0	0	1.92	3.41	1.43	
26 α -cariofileno	0	1.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.08	1.1	
27 β -Ferneseno	0	0	0	0	0	0	0	1.14	0	0	0	0	0	
α -bergamote-														
28 no	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.22	0	
29 δ -Cadineno	0	0	0	0	0	1.12	0	0	0	0	2.24	3.63	0	
30 γ -Muuroleno	1.85	2.49	1.63	1.93	0	0	1.26	2.27	0	0	1.47	1.41	0	
31 β -selineno	0	2.45	3.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32 α -curcumeno	3.13	0	0	4.38	0	0	7.86	0	0	0	0	1.51	0	
33 Cubenol	1.04	0	1.68	1.78	0	0	2.67	0	0	0	2.16	0	0	
34 Eremofileno	0	2.23	2.34	1.15	0	0	0	1.3	0	0	0	2.29	1.59	

35 α -Muuroleno	1.31	2.43	2.01	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36 β -bisabolol	2.37	0	3.07	3.48	0	0	3.91	0	0	0	0	0	0
2,6-Di-tert-													
37 butilfenol	0	0	0	0	0	0	3.13	0	0	0	0	0	0
38 γ -Cadieno	1.61	1.59	0	1.13	0	0	0	2.89	0	0	0	0	0
39 Cardineno	0	0	6.81	0	0	0	0	5.95	0	0	0	0	0
												0.6	
40 Cadinene	0	6.77	1.57	0	1.97	0	2.09	0	0	0	0	0	5
Óxido de aro-													
madendreno-													
41 (1)	0	0	0	0	0	0	1.18	0	0	0	0	0	0
42 δ -cadieno	3.71	0	0	3.07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(\pm)Transnero-													
43 lidol	5.2	0	0	0	1.22	0	0	0	0	0	2.82	2.16	0
44 Nerolidol	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
													40.3
45 Nerolidol 2	5	0	2.09	0	0	1.18	0	0	0	0	0	0	0
46 Elemol	0	1	0	6.57	2.44	2.63	6.63	0	0	0	0	0	0
												13.7	6.0
47 Espatuleno	0	0	5.06	0	1.08	0	2.05	2.32	0	0	6	17.67	5
Ent-espátule-													
48 nol	0	0	0	4.14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epoxicariofy-													
49 leno	5.44	12.02	7.32	5.24	1.18	1.22	5.48	3.92	0	0	0	1.28	3.15
50 Cedrol	0	0	0	1.31	2.65	0	1.64	1.75	0	0	0	0	0
51 β -Myrceno	6.46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Óxido de aro-													
madendreno-													
52 (2)	0	0	5.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53 Guaiol	0	0	0	0	0	1.52	0	0	0	0	0	0	0

54 γ -Eudesmol	0	3.26	0	1.56	5.17	8.86	0	1.12	0	0	0	0	0
55 β -Eudesmol	0	0	0	0	7.32	12.13	0	0	0	0	0	0	0
56 α -eudesmol	0	6.35	0	0	7.75	0	0	0	0	0	0	0	0
57 β -pnasinseno	0	0	1.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58 Caur-16-eno	0	0	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3
59 α -cadinol	0	0	0	1.35	0	0	4.12	3.27	0	0	4.95	2.9	2.34
60 τ -cadinol	0	2.02	0	0	0	0	2.86	0	0	0	2.6	0	0
61 β -selinenol	0	4.48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
													2.0
62 β -Eudesmene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.19	1.8	5
63 Guaiene	0	0	0	0	0	9.69	0	0	0	0	0	0	0
64 β -Guaiene	0	0	0	0	0	0	1.02	0	0	0	1.43	1.2	0
65 Bifomene	0	0	0	0	1.19	3.23	0	0	0	0	0	0	0
66 Esclareol	0	0	0	1.48	0	1.01	0	1.52	0	0	0	0	0
Pregnano-													
67 18,20-diol	0	0	0	0	1.23	0	0	0	0	0	0	0	0
													10.9
68 Manool	0	4.13	0	0	8.67	0	7	2.88	0	0	0	0	0
													12.2
69 Epimanool	0	0	0	4.42	0	7	0	0	0	0	0	0	0
70 Pimaral	0	0	0	0	0	1.16	0	0	0	0	0	0	0
71 α -bisabolol	0	2.1	0	0	0	0	0	4.16	0	0	3.66	0	0
Androst-2,6-													
72 dieno	0	0	0	0	0	0	1.9	0	0	0	0	0	0
73 α -Cubebeno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.26	6.72	0
74 β -Cubebeno	0	0	0	0	0	0	0	3.96	0	0	1.26	1.48	0
75 τ -muurolol	0	0	0	0	0	0	0	2.43	0	0	0	0	0
													24.2
76 Totarol	0	0	0	0	0	0	0	5.281	7	0	0	0	1.52
77	0	0	0	0	0	0	0	0	8.8	9.62	0	0	0
4,5-Dimetil-													

nonano														
2,5-Dimeti-														
78 lheptano	0	0	0	0	0	0	0	0	7.62	0	0	0	0	
3,4,5-Trimeti-														
79 heptano	0	0	0	0	0	0	0	0	1.98	0	0	0	0	
3,4-Dimeti-														
80 lheptano	0	0	0	0	0	0	0	0	9.13	15.63	0	0	0	
4,14-Retro re-														
81 tinol	0	0	0	0	0	0	0	0	5.16	0	0	0	0	
82 Retinol	0	0	0	0	0	0	0	0	11.5	0	0	0	0	
83 α -Tujeno	0	0	0	0	0	0	0	0	1.79	0	0	0	0	
84 Heptacosanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.97	0	0	0	
2,4-Dimetilhe-														
85 xano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.9	0	0	0	
(+)-Epi-bici-														
closesquife-														
86 landreno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.18	1.02	0	
Germacreno-														
87 D-4-ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.82	3.03	0	
88 Calameneno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.67	0	0	
Alloaroma-														
89 dendreno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.37	0	
Ácido 3-2,5-														
dimetilben-														
zoi)-Propi-														
90 ônico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.05	0	
													18.9	
91 Ferruginol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	

5.3 Apêndice C

Valores de IC₅₀ em µg/mL obtidos para os extratos bruto etanólico e as frações das amostras.

Produ- tor	Espécie	Bruto etanóli- co	Fração			
			Etanol	Acetato de etila	Dicloromet- ano	Hexano
A	<i>M. marginata</i>	578.486	12.877	14.277	871.196	70.659
	<i>S. xanthotricha</i>	91.621	86.527	24.304	3384.341	37927.17
	<i>S. tubiba</i>	166.261	61.227	46.348	557.202	557.202
	<i>S. bipunctata</i>	763.167	858.159	119.691	26534.81	39678.09
B	<i>M. quadrifasci- ata</i>	0.986	7.882	0.018	455.283	39592.38
	<i>M. quadrifasci- ata</i>	18.489	0.864	0.864	26692.77	657.548
Y	<i>S. postica</i>	242.839	445.211	187.077	451.322	1.1
S	<i>S. bipunctata</i>	96.273	168.571	41.685	136083.7	0.73
	<i>S. xanthotricha</i>	203.82	319.711	61.068	49.08	18068.85
E	<i>M. flavolineata</i>	270.946	346.227	60.477	259.472	17.245
O	<i>M. quadrifasci- ata</i>	25.921	33.355	33.657	32950.44	6765.578
	<i>M. quadrifasci- ata</i>	328.432	6.987	14.161	153640.8	59629.45
	<i>M. mondury</i>	12.76	8.522	73.449	60956.62	78643.13 0
	<i>M. mondury</i>	3.334	0.041	46.434	95401.070	589204
N	<i>M. subnitida</i>	7.320	0.388	2.491	91.914	24101.75
K	<i>M. subnitida</i>	0.013	22.813	8.039	69.71	1394.689

6 Referências

AAT BIOQUEST, INC. **Quest Graph™ IC₅₀ Calculator.** Disponível em: <<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>>. Acesso em: 8 out. 2019.

ABCAM. **Neutral Red Assay Kit - Cell Viability / Cytotoxicity.** [s.l: s.n.].

ABDALLA, F. C. et al. **Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens.** Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol2-2/gmr0051_full_text.htm>. Acesso em: 23 mar. 2021.

AFROUZAN, H. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. **Iranian Biomedical Journal**, v. 22, n. 1, p. 50–65, 10 jan. 2018.

AGUIAR, C. L. DE et al. Enzyme Transformation of Flavonoids. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 1, 30 jul. 2007.

AGUIAR, H. J. V. Quantificação da Produção de Mel da Abelha sem Ferrão *Scaptotrigona xanthotricha* Moure, 1950 (Hymenoptera: Apidae: Meliponina) na Comunidade São Francisco, Careiro da Várzea, Amazonas. 31 jul. 2012.

AKATSU, I. P.; SOARES, A. E. E. **Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade atimicrobiana**. PhD Thesis—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2009.

AKHIR, R. A. M.; BAKAR, M. F. A.; SANUSI, S. B. Antioxidant and antimicrobial potential of stingless bee (*Heterotrigona itama*) by-products. **Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences**, v. 42, n. 1, p. 72–79, 2018.

ALANAZI, S. et al. Chemical characterization of Saudi propolis and its antiparasitic and anticancer properties. v. 11, n. 5390, 2021.

ALDANA-MEJÍA, J. A. et al. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 114029, 10 maio 2021.

ALDRICH, S. **Microbial Growth Protocols**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/microbial-cell-culture/microbial-growth>>. Acesso em: 25 ago. 2021.

ALENCAR, S. M. **Pesquisa confirma ação farmacológica da própolis orgânica brasileira**. [s.l.: s.n.].

ALMUHAYAWI, M. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, p. 3079–3086, 1 nov. 2020.

ALVAREZ, P. L. J. et al. Spectroscopic Discrimination and Characterization of Bee Propolis from the Philippines. v. 150, n. 3, p. 8, 2021.

ANIBIJUWON, I. I. et al. Antibacterial Activity of Stingless Bee (*Dactylurina studingeri*) Propolis on Bacteria Isolated from Wound. **SMU Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 43–52, 2017.

ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018.

ANVISA, MI. DA S. **Módulo 3: Resistência Microbiana - Mecanismos e Impacto Clínico**. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_entero.htm>. Acesso em: 4 maio. 2021.

APAK, R. et al. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 10 fev. 2016.

ARAÚJO, E. D. et al. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3B, p. 563–568, ago. 2004.

ARAÚJO, M. et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12, 2015.

ARAÚJO, M. J. A. M. et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 580–587, 2009.

ARAÚJO, M. J. A. M. **Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith: ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica**. PhD Thesis—[s.l.] Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2013.

ARBOITTE, M. Z. et al. Produtos das abelhas para a difusão de conhecimento da criação de abelhas do gênero *Apis* e *Melipona*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, 24 mar. 2021.

ÁVILA, S. et al. Influence of stingless bee genus (*Scaptotrigona* and *Melipona*) on the mineral content, physicochemical and microbiological properties of honey. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. October, p. 4742–4748, 2019a.

ÁVILA, S. et al. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, n. January, p. 1–10, 2019b.

BACHEVSKI, D. et al. Back to the basics: Propolis and COVID-19. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 4, p. e13780, 2020.

BANKOVA, V. et al. Volatile Constituents of Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 49, p. 6–10, 1 fev. 1994.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 51, n. 5–6, p. 277–280, 1 jun. 1996.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005.

BANKOVA, V. et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1–49, 15 mar. 2019.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 28, p. 1–8, 2014.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. The phytochemistry of the honeybee. **Phytochemistry**, v. 155, p. 1–11, 1 nov. 2018.

BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis extraction methods: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 6 abr. 2021.

BARBIERI JUNIOR, C. **Caracterização da meliponicultura e do perfil do meliponicultor no estado de São Paulo: ameaças e estratégias de conservação de abelhas sem ferrão**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 20 jul. 2018.

BARBOSA, V. et al. Qualidade do geoprópolis de *Scaptotrigona bipunctata*. In: **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. 1. ed. Belo Horizonte - MG: Organização Editora Poisson, 2019. v. 3p. 111–122.

BARTH, O. M.; FREITAS, A. DA S. DE; VANDERBORGHT, B. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1005–1010, 19 out. 2020.

- BETANCES-SALCEDO, E. et al. Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1647, jul. 2017.
- BIGARELLA, J. J.; BECKER, R. D.; SANTOS, G. F. Rochas sedimentares. In: **Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2007. p. 425.
- BISBY, R. H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1002–1007, 2008.
- BISUI, S.; LAYEK, U.; KARMAKAR, P. Comparing the pollen forage pattern of stingless bee (*Trigona iridipennis* Smith) between rural and semi-urban areas of West Bengal, India. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n. 3, p. 714–722, 2019.
- BITTENCOURT, M. L. F. 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, 1 out. 2015.
- BLOMQUIST, G. J.; ROUBIK, D. W.; BUCHMANN, S. L. Wax chemistry of two stingless bees of the *Trigonisca* group (Apidae: Meliponinae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 137–142, 1 jan. 1985.
- BOGDANOV, S. Beeswax: quality issues today. **Bee World**, v. 85, n. 3, p. 46–50, 2004.
- BONAMIGO, T. 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, p. 12, 2017a.
- BONAMIGO, T. 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, 2017b.
- BORGES, F. VON B.; BLOCHTEIN, B. Atividades externas de *Melipona marginata obscurior* Moure (Hymenoptera, Apidae), em distintas épocas do ano, em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 680–686, set. 2005.
- BOUZAHOUANE, H. et al. Propolis: antimicrobial activity and chemical composition analysis. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, p. e3211–e3211, 1 abr. 2021.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. A formação dos solos. In: **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. 3. ed. [s.l.] Bookman, 2013. p. 716.
- BRASIL, A. N. DE V. S. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. [s.l.] ANVISA, 2014.
- BRASIL, M. DA A. S. DE D. A. **Instrução Normativa N° 11, de 20 de Outubro de 2000**, 2000.
- BRASIL, M. DA A. S. DE D. A. **Instrução normativa n°3, de 19 de janeiro de 2001**, 2001. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-mel-e-produtos-apicolas>>
- BRASIL, M. DA S. A. **Resolução - RDC N° 331, DE 2019: Padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação** **Direito UNIFACS – Debate Virtual**, 2019.

BRASIL, M. DA S.; BRASIL, A. N. DE V. S.; BRASIL, D. C. **Instrução Normativa N° 60, de 23 de Dezembro de 2019: Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos**, 26 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou>>. Acesso em: 4 maio. 2021

BRATKO, F. et al. The Polyphenol Content and Antimicrobial Activity of Selected Propolis' Extracts. **Journal of Agriculture Science & Technology**, v. 10, p. 350–364, 26 mar. 2020.

BREAZEALE, E. L.; MCGEORG, W. T.; BREAZEALE, J. F. **Moisture Absorption by Plants from an Atmosphere of High Humidity**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC437449/pdf/plntphys00261-0049.pdf>>.

BREWSTER, R. **Paint.NET**. [s.l.: s.n.].

BRODA, M. Natural Compounds for Wood Protection against Fungi—A Review. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3538, jan. 2020.

BRYAN, J.; REDDEN, P.; TRABA, C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria - Bryan - 2016 - Letters in Applied Microbiology - Wiley Online Library. **Original Article**, v. 62, p. 192–198, 2015.

BUDÓIA, M. G. **Estudo da composição química de extratos de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) por métodos espectrofotométricos e espectrometria de massas, e avaliação de sua atividade antioxidante**. PhD Thesis—Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2019.

BUENO-SILVA, B. et al. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

CALABRESE, M. G.; FERRANTI, P. Novel Foods: New Food Sources. In: FERRANTI, P.; BERRY, E. M.; ANDERSON, J. R. (Eds.). . **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**. Oxford: Elsevier, 2019. p. 271–275.

CAMPOS, J. V. DE; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES-FILHO, R. Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 55–61, mar. 2020.

CARRECK, N. What future for stingless bees? **The Appliance Of Science, Bee World**, v. 88, n. 3, p. 62–63, 1 jan. 2011.

ÇELEMLI, Ö. G. Chemical Properties of Propolis Collected by Stingless Bees. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (Eds.). . **Pot-Honey**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 525–537.

CHAM, K. O. et al. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36–48, 2019.

CHANG, C.-C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CLARK, N. A. et al. GRcalculator: an online tool for calculating and mining dose–response data. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 698, 24 out. 2017.

CLARKE, G. et al. High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All

Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the M. **Antioxidants**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2013.

COELHO, G. R. et al. **Antiviral effects of *Scaptotrigona postica* propolis and their fractions**. BMC Proceedings. **Anais...**2014.

COELHO, G. R. et al. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

COELHO, G. R. et al. Antiviral Activity of Geopropolis Extract from *Scaptotrigona* Aff. *postica* against Rubella Virus. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 6, p. p91, 13 out. 2018.

CÖMERT, E. D.; VURAL, G. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76–93, 1 mar. 2018.

COSTA, E. P. M. V. et al. Efeitos da própolis sobre as bactérias encontradas em lesões cutâneas crônicas. **Biológicas & Saúde**, v. 11, n. 36, p. 41–54, 2 mar. 2021.

COTTICA, S. M. et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 929–935, maio 2011.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 964–970, 2004.

CUNHA, M. S. et al. Robertsonian rearrangements in Neotropical Meliponini karyotype evolution (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Insect Molecular Biology**, v. n/a, n. n/a, p. 1–11, 2021.

DA CRUZ ALMEIDA, E. T. et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 280–287, 2017.

DA SILVA, C. C. F. et al. Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis from Ceará state. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 3, p. 309–318, 2019.

DA SILVA, E. C. C. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas. **Química nova**, v. 36, n. 5, p. 628–633, 2013.

DA SILVA, F. C. et al. Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, n. 2, p. 94–100, 2011.

DA SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. [s.l.] Blucher, 2017.

DAMODARAN, T. Chapter 46 - Propolis. In: GUPTA, R. C.; LALL, R.; SRIVASTAVA, A. (Eds.). . **Nutraceuticals (Second Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2021. p. 795–812.

DE CAMARGO, R. C. R.; DE OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

DE CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. DE M.; LOPES, M. T. DO R. Produção de mel. In: **Sistemas de Produção**. 1. ed. Teresina: (Embrapa Meio-Norte, 2002. p. 138.

DE LIMA, M. V. D. **Geopropolis Produzida Por Diferentes Espécies De Abelhas : Atividades Antimicrobiana E Antioxidante E Determinação Do Teor De Compostos Fenólicos**. Mestrado—[s.l.] Universidade Federal do Pará, 2015.

DE MENDIBURU, F. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. [s.l: s.n.].

DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI, D. S. et al. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. **Food Research International**, v. 111, n. February, p. 661–673, 2018.

DE OLIVEIRA, F. F. et al. Honey and bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology**, v. 2061, n. 3, p. 493–503, 2018.

DE PAULA, G. T. et al. Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41–47, 1 abr. 2021.

DE SOUZA, S. A. et al. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 549–558, 2018.

DINIZ, T. DE O. et al. Effects of combined fungicide in stingless bees *Scaptotrigona bipunctata*. **Research, Society and Development**, v. 10, 30 jan. 2021.

DIVYA, K. K. et al. Microbial Count in Stingless Bee Honey (*Tetragonula iridipennis* (Smith)). v. 5, n. 6, 14 set. 2020.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18293, 4 dez. 2019.

DOMOKOS, G. et al. How river rocks round: Resolving the shape-size paradox. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014.

DOS SANTOS, C. M. et al. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017a.

DOS SANTOS, T. L. A. et al. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 3, p. 2247–2259, 2017b.

DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 2014.

DUTRA, R. P. et al. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. June, p. 287–293, 2019.

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, p. 109200, 15 abr. 2021.

ELBAZ, G. A.; ELSAYAD, I. I. **Comparison of the Antimicrobial Effect of Egyptian Propolis vs New Zealand Propolis on *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in Saliva**. Disponível em: <<https://www.quintessence-publishing.com/deu/en/article/841778>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

ELLISON, S. L. Carotenoids: Physiology. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Eds.). . **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 670–675.

EROĞLU, N.; ACAR, M. K.; KEKEÇOĞLU, M. The Investigation Propolis Foraging Preference of Different Honey Bee. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi**, v. 31, n. 1, p. 133–141, 30 mar. 2021.

ESCRICHE, I.; JUAN-BORRÁS, M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, v. 106, n. November 2017, p. 834–841, 2018.

FARNESI, A. P. et al. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635–640, 2009.

FENG, P. et al. BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. [s.l.] Food and Drugs Administration, 2020. p. 18.

FERNANDES, F. H. et al. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1482–1488, 2015.

FERREIRA, B. L. et al. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. **Food Research International**, v. 126, n. January, p. 108683, 2019.

FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil : chemical composition , antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. February, p. 3552–3558, 2017a.

FERREIRA, J. M. et al. Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 0–14, 2017b.

FERREIRA-CALIMAN, M. J. et al. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 7, p. 800–804, 2010.

FIKRI, A. M. et al. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Stingless Bee Propolis from Indonesia. **Journal of Apicultural Science**, v. 63, n. 1, p. 139–147, 1 jun. 2019.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 1 nov. 2011.

FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 122–132, 2016.

FREITAS, A.; VIT, P.; BARTH, O. Pollen analysis of geopropolis and propolis from stingless bees. In: [s.l.: s.n.].

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171–178, 2006.

- GALILI, T. dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3718–3720, 2015.
- GAMA, J. R. N. F. **Solos: Manejo e interpretação**. 1. ed. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004.
- GARNIER, S. **viridis: Default Color Maps from “matplotlib”**. [s.l: s.n.].
- GILLESPIE, K. M.; CHAE, J. M.; AINSWORTH, E. A. Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 867–870, abr. 2007.
- GOBIN, A. et al. Quantifying soil morphology in tropical environments: Methods and application in soil classification. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, n. 4, p. 1423–1433, 2000.
- GRANATO, D. et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471–475, 30 out. 2018.
- GRECKA, K. et al. The Anti-Staphylococcal Potential of Ethanolic Polish Propolis Extracts. 3 maio 2019.
- GROTZINGER, J. et al. Sedimentos e Rochas Sedimentares. In: **Para entender a terra**. 4. ed. [s.l.] Bookman, 2006. p. 656.
- GRÜETER, C. Evolution and Diversity of Stingless Bees. In: **Stingless Bees Their Behaviour, Ecology and Evolution**. Fascinating Life Sciences. Switzerland: Springer Nature, 2020. p. 43–86.
- HALIM, E. et al. Kajian Bioaktif Dan Zat Gizi Propolis Indonesia Dan Brasil. **Jurnal Gizi dan Pangan**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2012.
- HALL, M. A. et al. Temporal changes in the microbiome of stingless bee foragers following colony relocation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. fiae236, 8 jan. 2021.
- HERRERA-LÓPEZ, M. G. et al. Botanical origin of triterpenoids from Yucatecan propolis. **Phytochemistry Letters**, v. 29, n. May 2018, p. 25–29, 2019.
- HOCHHEIM, S. et al. A Bioguided Approach for the Screening of Antibacterial Compounds Isolated From the Hydroalcoholic Extract of the Native Brazilian Bee’s Propolis Using Mollicutes as a Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–7, 2020.
- HRNCIR, M. et al. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 205, p. 1–12, 1 jun. 2019.
- HRNCIR, M.; JARAU, S.; BARTH, F. G. Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 202, n. 9–10, p. 597–601, 2016.
- HUANG, S. et al. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, dez. 2014.
- INKSCAPE, D. et al. **Inkscape 1.1: Draw freely**. Boston- MA USA: [s.n.].
- INMETRO, B. **Sistema internacional de Unidades: SI**. 1. ed. Duque de Caxias, RJ: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)acional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), 2012.

- ISIDOROV, V. A. et al. Selective Behaviour of Honeybees in Acquiring European Propolis Plant Precursors. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 6, p. 475–485, 2016.
- JASPRICA, I. et al. Evaluation of Antioxidative Activity of Croatian Propolis Samples Using DPPH- and ABTS- Stable Free Radical Assays. **Molecules**, v. 12, n. 5, p. 1006–1021, maio 2007.
- KACÁNIOVÁ, M. et al. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 927–934, 2012.
- KAŠKONIENĚ, V. et al. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 736–746, 1 jun. 2014.
- KASSAMBARA, A. **ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots**. [s.l: s.n.].
- KASSAMBARA, ALBOUKADEL MUNDT, F. **factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses**. [s.l: s.n.].
- KHLEIFAT, K. et al. **Tropical Journal of Natural Product Research Original Research Article Antibacterial and Antioxidant Activities of Local Honey from Jordan**. [s.l: s.n.].
- KITLABOR, S. PARA A. M. **Manual de Microbiologia** Versão 3, , 5 set. 2018.
- KLEINERT, A. DE M. P.; SILVA, C. I. **Plantas e pólen em áreas urbanas : uso no paisagismo amigável aos polinizadores**. 1. ed. Rio Claro: CISE, 2020.
- KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Flight Activity and Responses to Climatic Conditions of two Subspecies of *Melipona Marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Journal of Apicultural Research**, v. 25, n. 1, p. 3–8, 1 jan. 1986.
- KOEDAM, D. et al. Production of wax by virgin queens of the stingless bee *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponinae). **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 3, p. 229–233, 1 ago. 2002.
- KOSALEC, I. et al. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 54, n. 1, p. 65–72, mar. 2004.
- KRISHNAMURTHI, V. R. et al. A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0245205, 1 dez. 2021.
- KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.
- KUMAZAWA, S. et al. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. **Naturwissenschaften**, v. 95, n. 8, p. 781, 22 abr. 2008.
- KUREK-GÓRECKA, A. et al. Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 78–101, jan. 2014.
- KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- LAVINAS, F. C. et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. April 2019, 2018.

LE, S. et al. FactoMineR: A Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1–18, 2008.

LEONHARDT, S. D. **Resin collection and use in stingless bees**. [s.l.] Universität Würzburg, 2010.

LIAUDANSKAS, M. et al. Comparison of Ethanolic and Aqueous-Polyethylenglycolic Propolis Extracts: Chemical Composition and Antioxidant Properties. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. e5557667, 18 mar. 2021.

LIBREOFFICE, T. C. **Libre Office: The Document Foundation**. [s.l.: s.n.].

LIRA, T. S. **Avaliação de dois métodos de produção de cera de abelhas na zona da mata Alagoana**. PhD Thesis—[s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

LIU, K. et al. Preparation of the CNC/Ag/beeswax composites for enhancing antibacterial and water resistance properties of paper. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 183–188, 2016.

LÓPEZ-VALVERDE, N. et al. Effectiveness of Propolis in the Treatment of Periodontal Disease: Updated Systematic Review with Meta-Analysis. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 269, fev. 2021.

LU, L.-C.; CHEN, Y.-W.; CHOU, C.-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 213–220, 15 jul. 2005.

LYON, T. L.; BUCKMAN, H. O. **The Nature and Properties of Soils. A College Text of Edaphology**. 4. ed. New York: The Macmillan company, 1943.

MACHADO, C. S. et al. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

MAGALHÃES, T. L.; VENTURIERI, G. C. **Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no nordeste paraense**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2010.

MARCUCCI, M. C. et al. Accessible Methodologies for Quantification of Flavonoids and Total Phenols in Propolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2021.

MAROTTA, E.; NETO, F. R. DE A.; AZEVEDO, D. DE A. Separação e determinação quantitativa dos alcanos lineares e dos cíclicos/ramificados em petróleos brasileiros por aduto de ureia e cromatografia gasosa: um estudo de caso revisitado. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1692–1698, 2014.

MARTINELLO, M.; MUTINELLI, F. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 71, jan. 2021.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns & Trauma**, v. 3, 22 jul. 2015.

MASSARO, F. C. et al. Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties. **Die Naturwissenschaften**, v. 98, n. 4, p. 329–337, abr. 2011.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. PhD Thesis—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

- MENEGATTI, C. et al. Meliponamycins: Antimicrobials from Stingless Bee-Associated *Streptomyces* sp. v. 83, p. 610–616, 2020.
- MICHENER, C. D. **The Bees Of The World**. 2. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.
- MICHENER, C. D. The Meliponini. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (Eds.). . **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. New York, NY: Springer, 2013. p. 3–17.
- MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in ladS. **PLOS ONE**, v. 6, n. 12, p. e29113, 22 dez. 2011.
- MILBORROW, B. V.; KENNEDY, J. M.; DOLLIN, A. Composition of Wax Made by the Australian Stingless Bee *Trigona australis*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 40, n. 1, p. 15, 1987.
- MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913–920, 2003.
- MOHD-YAZID, N. A. et al. Preliminary evaluation of antioxidant and cytotoxic activity of ethanolic extract of stingless bees propolis from different localities. **Journal of Agrobiotech**, v. 9, n. 1, p. 132–141, 2018.
- MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, v. 73, n. 1, p. 5–28, 1992.
- MOODUTO, L. et al. The Effectiveness of Propolis Extract against Extracellular Polymeric Substance (EPS) Biofilm *Enterococcus faecalis* Bacteria. v. 14, n. 1, p. 54–59, 2021.
- MORGAN, E. **Biosynthesis in Insects**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004.
- MULYATI, A. H. et al. Macro and Micronutrient Content of Raw Propolis Collected from Different Regions in Indonesia. v. 16, p. 109–114, fev. 2021.
- MUNSELL, A. H. **Munsell soil color charts**. 1975. ed. Baltimore: Munsell Color Company, 1975.
- NAVARRO, G. R. B. et al. Livro de referência de Minerais Comuns e Economicamente Relevantes: Óxidos. In: **Hematita (Hematite),” in Livro de referência de Minerais Comuns e Economicamente Relevantes**. Rio Claro: Museu Heinz Ebert, 2017. p. 4.
- NCATS, T. N. C. FOR A. T. S. **NCATS Insight: Drugs — CEDROL**. Disponível em: <<https://drugs.ncats.io/drug/63ZM9703BO>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- NEGRI, G. et al. Comb and propolis waxes from Brazil (states of São Paulo and Paraná). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 453–457, out. 2000.
- NETO, D. J. DA C.; MORAIS, P. B. DE. The vectoring of *Starmerella* species and other yeasts by stingless bees in a Neotropical savanna. **Fungal Ecology**, v. 47, p. 100973, 1 out. 2020.
- NETO, Í. et al. **Ácido desidroabiético: um agente natural antimicrobiano contra bactérias resistentes e biofilmes**. 24 set. 2015.

- NGALIMAT, M. S. et al. A Review on the Association of Bacteria with Stingless Bees. **Sains Malaysiana**, v. 49, p. 1853–1863, 31 ago. 2020.
- NOGUEIRA NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. São Paulo: Chacaras e Quintais, 1953.
- OKIŃCZYC, P. et al. Impact of Plant Origin on Eurasian Propolis on Phenolic Profile and Classical Antioxidant Activity. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 68, jan. 2021.
- OLEGÁRIO, L. S. et al. Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. **Food Research International**, v. 123, n. January, p. 481–502, 2019.
- OLIVEIRA, F. F. et al. **Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mami-rauá, Amazonas, Brasil**. [s.l.: s.n.].
- OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, p. 1728–1732, 2012.
- OSÓRIO, A. B. Do chão à refeição : estudo da produção de cerâmicas de S . Pedro de Arraiolos no Bronze Final. In: LOBO, R. M. (Ed.). **Jornadas do património : a arqueologia no concelho de Arraiolos**. [s.l.] Câmara Municipal de Arraiolos, 2017. p. 55–84.
- O'TOOLE, G. A. et al. Genetic Approaches to Study of Biofilms. **Mehtods in enzimology**, v. 310, n. 1996, p. 91–109, 1999.
- O'TOOLE, G.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449–461, 1998.
- PALACE, V. P. et al. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 5, p. 746–761, 1 mar. 1999.
- PARADIS, E.; SCHLIEP, K. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. **Bioinformatics**, v. 35, n. 3, p. 526–528, 2018.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.
- PASUPULETI, V. R. et al. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–21, 2017.
- PEDERSEN, T. L. **ggraph: An Implementation of Grammar of Graphics for Graphs and Networks**. [s.l.] R package version 2.0.0, 2019.
- PEIXOTO, M. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of blends of propolis samples collected in different years. **LWT**, v. 145, p. 111311, 1 jun. 2021.
- PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776–1782, 2014.
- PEREIRA, A. DOS S.; BICALHO, B.; NETO, F. R. DE A. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v. 34, n. 3, p. 291–298, 1 maio 2003.

PEREIRA, L. R. DE L.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Production of propolis and geopropolis by stingless bees. **2020**, v. 8, n. 1, p. 3, 2020.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, Propolis: Chemical and Pharmacological Aspects Naples, Italy, February 24, 2001. v. 73, p. S7–S20, 1 nov. 2002.

PIPPI, B. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. p. 839–850, 7 jan. 2015.

POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 53–62, 1 jan. 2019.

POIANI, S. B. et al. Separation of *Scaptotrigona postica* Workers into Defined Task Groups by the Chemical Profile on Their Epicuticle Wax Layer. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 4, p. 331–340, 2014.

POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 235–240, 2004.

POPOVA, M. et al. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from Taiwan. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 2, p. 186–191, 25 out. 2009.

POPOVA, M. et al. Omani propolis: Chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. **Chemistry Central journal**, v. 7, p. 158, 22 set. 2013.

POPOVA, M. 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, maio 2021.

POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V. Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. **Phytomedicine**, n. July, p. 153098, 2019.

PRAKASH, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals: Current status and future perspective. In: **Functional and Preservative Properties of Phytochemicals**. [s.l.] Elsevier, 2020.

PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

PROMOKINE; PROMOCCELL, G. **Neutral Red Cytotoxicity Assay Kit: For in vitro cell proliferation and cytotoxicity studies**, nov. 2019. Disponível em: <<https://promocell.com/wp-content/uploads/product-information/manual/PK-CA577-K447.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2021

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

RAINIERI, S. et al. Pure and Mixed Genetic Lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and Their Contribution to the Lager Brewing Strain Genome | Applied and Environmental Microbiology. v. 72, n. 6, p. 3968–3974, jun. 2006.

- RANIERI, M. R.; WHITCHURCH, C. B.; BURROWS, L. L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials * Microbial systems biology. v. 45, p. 164–169, 1 out. 2018.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1 maio 1999.
- REGNIER, L. DE L. P. *Tetragonisca angustula* resin gathering behaviour of *Schizolobium parahyba*. **bioRxiv**, 10 set. 2021.
- REIS, T. C. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de diferentes origens. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 4, n. 1, p. 630–645, 3 abr. 2021.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.
- RIGHI, A. A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. text—[s.l.] Universidade de São Paulo, 24 nov. 2008.
- RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.
- RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. **Lwt**, v. 95, n. April, p. 367–379, 2018.
- RITZ, C. et al. Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0146021, 30 dez. 2015.
- ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271–275, 1 dez. 2003.
- ROSA, GI. M. DA. **A potencialidade da produção de própolis como fonte de renda para o apicultor associado coapisul no município de Arroio dos ratos - RS**. Tecnólogo em Desenvolvimento Rural—Arroio dos ratos: Universidade Federal do Rio Grande do SUL, 2013.
- RUBINHO, M. P. et al. A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis and their antibacterial, antioxidant and anti-proliferative effects. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2019.
- SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33–38, 2005.
- SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 925–936, 2011.
- SALOMÃO, K. et al. Brazilian Propolis: Correlation between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 317–324, 2008.

- SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50–57, 2017.
- SANTANA, H. F. et al. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. v. 28, p. 485–491, 2012.
- SANTOS, F. A. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 1–7, 1 abr. 2002.
- SANTOS, H. C. D. et al. Antimicrobial activity of propolis extract fractions against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 954–960, dez. 2019.
- SANTOS, P. B. D. R. E. **Atividade antimicrobiana de extratos de própolis sobre cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes**. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal)—Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 17 dez. 2018.
- 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.
- SHELLES, J. L. et al. Uso de extrato de própolis como agente antisséptico para pré e pós dipping em vacas leiteiras. **Agrarian**, v. 14, n. 51, p. 95–101, 15 mar. 2021.
- SCHWARZ, H. F. The Wax of Stingless Bees (Meliponidæ) and the Uses to Which It Has Been Put. **Journal of the New York Entomological Society**, v. 53, n. 2, p. 137–144, 1945.
- SFORCIN, J. M. et al. ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Editora UNESP, 2012.
- SHAMSUDIN, S. et al. Influence of origins and bee species on physicochemical, antioxidant properties and botanical discrimination of stingless bee honey. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 238–263, 2019.
- SILVA, C. C. F. D. **Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim**. Mestrado—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- SILVA, N. DA et al. **Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual**. 2. ed. Leiden, Nederland: CRC Press/Balkema, 2019.
- SILVA, M. D. E.; RAMALHO, M.; ROSA, J. F. Annual survival rate of tropical stingless bee colonies (Meliponini): variation among habitats at the landscape scale in the Brazilian Atlantic Forest. **Sociobiology**, v. 68, n. 1, p. 5147, 22 fev. 2021.
- SILVA, F. et al. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 4, p. 321–325, abr. 2011.
- SILVA, W. R. T.; ARAÚJO, E. D.; SCHER, R. Caracterização do cariótipo de uma população de abelhas *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini), no município de Brejo Grande/Se. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3(a), p. 1–6, 2012.
- SOÓS, Á. et al. Mineral content of propolis tinctures in relation to the extraction time and the ethanol content of the extraction solvent. **Lwt**, v. 111, n. September 2018, p. 719–726, 2019.

SOUZA, M. L. DE. **Própolis orgânica brasileira na prevenção e tratamento da mucosite oral: estudo in silico de biomoléculas desta própolis com alvos da mucosite oral**. Alfenas- Minas Gerais: [s.n.].

SPINK, J. **Food Fraud Prevention: introduction, implementation and management**. 1. ed. [s.l: s.n.].

SPROUFFSKE, K. **growthcurver: Simple Metrics to Summarize Growth Curves**. [s.l: s.n.].

STREHLE, M. A. et al. Raman spectroscopic study of spatial distribution of propolis in comb of *Apis mellifera carnica* (Pollm.). **Biopolymers - Biospectroscopy Section**, v. 72, n. 4, p. 217–224, 2003.

SULAEMAN, A.; NUSA, C. P.; MARLIYATI, S. A. Antioxidant Activity and Total Phenolic of Encapsulated Stingless Bee Propolis by Spray Drying Method. v. 16, p. 65–72, fev. 2021.

SUN, C. 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.

SUREK, M. et al. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 6 abr. 2021.

SUTTON, S. **Measurement of Microbial Cells by Optical Density**. [s.l.] Journal of Validation Technology, 2011.

TEIXEIRA, É. W. et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85–92, mar. 2005.

TOSI, E. A. et al. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1025–1029, 1 jan. 2007.

TUNGMUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, 25 ago. 2018.

UMTHONG, S.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand: Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 37, n. 05, p. 855–865, 1 jan. 2009.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 785–789, 2000a.

VELIKOVA, M. et al. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fito-terapia**, v. 71, p. 693696, 2000b.

WAKINDIKI, I. I. C.; BEN-HUR, M. Soil Mineralogy and Texture Effects on Crust Micromorphology, Infiltration, and Erosion. **Soil Science Society of America Journal**, v. 66, n. 3, p. 897–905, 2002.

WARNES, G. R. et al. **gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data**. [s.l: s.n.].

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. New York: Springer-Verlag New York, 2016.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WOJTYCZKA, R. 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, ago. 2013.

WRIGHT, K. **pals: Color Palettes, Colormaps, and Tools to Evaluate Them**. [s.l: s.n.].

XU, F. et al. Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 198–203, 1 jul. 2018.

YANG, S. et al. Transformation functions of soil color and climate. **Science in China Series D: Earth Sciences**, v. 44, n. S1, p. 218–226, dez. 2001.

ZABAIU, N. et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 2017.

ZAINULLIN, R. A. et al. Flavanones and Flavones from Bashkir Propolis. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 54, n. 5, p. 975–977, 1 set. 2018.

ZHANG, K.; ZUO, Y. Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. **Analytica Chimica Acta**, v. 554, n. 1–2, p. 190–196, 2005.

ZHAO, L. et al. Rapid determination of major compounds in the ethanol extract of geopropolis from Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017.

ZHU, H. **kableExtra: Construct Complex Table with “kable” and Pipe Syntax**. [s.l: s.n.].

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 310–316, 1 maio 2009.