

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NAMUHELL OLIVEIRA DA SILVA

**Caracterização química e determinação da atividade antimicrobiana,
antioxidante e anti-inflamatória do extrato etanólico de geoprópolis de
Melipona quadrifasciata por ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de *Galleria
mellonella***

ALFENAS/MG

2023

Namuhell Oliveira da Silva

Caracterização química e determinação da atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* por ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof^o. Dr. Masaharu Ikegaki

Coorientador: Prof^o. Dr. Pedro Luiz Rosalen

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silva, Namuhell Oliveira da .

Caracterização química e determinação da atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* por ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*. / Namuhell Oliveira da Silva. - Alfenas, MG, 2023.

71 f. : il. -

Orientador(a): Masaharu Ikegaki.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Própolis. 2. Produtos naturais. 3. Atividades biológicas. 4. Extrato etanólico. 5. Abelhas sem ferrão. I. Ikegaki, Masaharu, orient. II. Título.

NAMUHELL OLIVEIRA DA SILVA

Caracterização química e determinação da atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* e a determinação da toxicidade e da atividade antimicrobiana *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella* do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata*

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 16 de junho de 2023.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira

Instituição: Universidade de Brasília - UNB

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Masaharu Ikegaki, Presidente**, em 16/06/2023, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1015611** e o código CRC **C97305AB**.

Dedico este trabalho a minha Avó Nadir (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e me conduzido até aqui, preparando tudo de uma forma sútil e cuidadora.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Masaharu Ikegaki por toda ajuda e orientação, pela sua calma e paciência, me orientando e aconselhando, não medindo esforços para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigado!

Aos meus pais, David e Ediney, que mesmo não podendo me ajudar financeiramente, acreditaram em mim até quando eu não acreditei e por estarem comigo durante toda essa jornada, me apoiando e dando todo o auxílio psicológico necessário para que esse sonho se concretizasse. Muito obrigado! Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos colaboradores Rafaela Bruzadelli, Leonardo Araújo e Gustavo Aparecido, por terem me ajudado em quase todas as etapas desse trabalho, ao Técnico de Laboratório Dr. Gustavo Silveira, que me auxiliou nas etapas de análises químicas. Muito obrigada por todos os conselhos e conversas durante esse tempo, a amizade de vocês foi de extrema importância para que eu conseguisse chegar até aqui.

Agradeço ao professor Dr. Pedro Luiz Rosalen pelo auxílio e orientações para a realização dos ensaios de atividade antioxidante e em especial com a ajuda da implementação do modelo de estudos *in vivo* de *Galleria mellonella* na UNIFAL-MG.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar e a doutorandas Ana Sofia e Anna Paula da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, por colaborarem com as análises químicas, e auxiliado nas análises de atividade antioxidante e toxicidade em *G. mellonella*. Obrigado pela paciência por cada conselho e orientação que me guiaram nessa trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PPGCB, e a Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL por todo o suporte e estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Não estou apto a seguir cegamente o exemplo de outros homens."

(Charles Darwin, 1831).

RESUMO

A geoprópolis é um tipo de própolis produzida por espécies de abelhas sem ferrão, que consiste na mistura de resina, cera e solo. Apesar das propriedades farmacológicas deste produto serem conhecidas desde os tempos remotos, os estudos disponíveis na literatura ainda são escassos. As abelhas nativas sem ferrão são de grande importância na manutenção de ecossistemas e fonte de renda para comunidades locais de meliponicultores. Este trabalho tem como objetivo principal analisar a composição química e a atividade biológica da geoprópolis produzida pela abelha nativa sem ferrão da espécie *Melipona quadrifasciata*, bem como, implementar na UNIFAL-MG o modelo *in vivo* de *Galleria mellonella* para determinação da toxicidade e atividade antimicrobiana da geoprópolis. Para a avaliação da composição química e atividades biológicas da geoprópolis, a amostra foi coletada no município de Morretes-PR e, posteriormente, extraída em etanol 80% (v/v) para obtenção do extrato etanólico de geoprópolis- EEGP. Foram realizadas análises químicas para investigar a composição do extrato por , determinação quantitativa dos compostos fenólicos e determinação das atividades biológicas. A amostra foi submetida às análises de toxicidade sistêmica com o modelo de *G. mellonella* visando definir as concentrações seguras a se utilizar. Posteriormente foram realizados ensaios *in vitro* para a determinação das atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, avaliando-se as concentrações inibitórias mínimas, concentrações microbicidas mínimas e atividade antioxidante pelos métodos do sequestro de radicais livres DPPH, potencial redutor férrico FRAP e capacidade de redução do radical oxigênio ORAC. Como resultados verificou-se que o teor de compostos fenólicos totais do EEGP foi de 23,60±0,22 mg GAE/g de extrato. A capacidade antioxidante da geoprópolis na redução do radical DPPH foi de 54,79± 1,64 µmol TEAC/g de extrato, o teste FRAP mostrou um resultado de 2467,33±223,45 µmol SF/g extrato, e no ORAC a capacidade do EEGP foi de 0,57±0,03 µmol TEAC/g. O EEGP apresentou capacidade antioxidante de compostos isolados quanto à redução do radical ABTS·+ *on-line*. O ensaio de atividade antimicrobiana mostrou que o extrato apresenta uma maior atividade contra bactérias gram-positivas. O extrato não apresentou toxicidade no modelo *in vivo* utilizado. Além dos resultados científicos que poderão impactar na no conhecimento dessa área, pudemos estruturar a produção de larvas de *G. mellonella*, e a implementação de metodologias para a determinação de toxicidade e da atividade

antimicrobiana *in vivo* que permitirá assim, vislumbrar a possibilidade de publicações em periódicos de maior impacto, bem como estabelecer parcerias com outros grupos de pesquisa dentro e fora da instituição, otimizando recursos públicos, aumentando a produtividade científica e a visibilidade da instituição.

Palavras-chave: Própolis; Produtos naturais; Atividades biológicas Extrato etanólico;
Abelhas sem ferrão.

ABSTRACT

Geopropolis is a type of propolis produced by species of stingless bees, which consists of a mixture of resin, wax and soil. Although the pharmacological properties of this product have been known since ancient times, studies available in the literature are still scarce. Native stingless bees are of great importance in the maintenance of ecosystems and source of income for local communities of beekeepers. The main objective of this work is to contribute with relevant information about the chemical composition and biological activity of geopropolis produced by the native stingless bee of the species *Melipona quadrifasciata*, as well as to implement in UNIFAL-MG the model for determining *in vivo* toxicity and antimicrobial activity using larvae of moths of the species *Galleria mellonella*. For the evaluation of the chemical composition and biological activities of geopropolis, the sample was collected in the municipality of Morretes-PR and later extracted in ethanol 80% (v/v) to obtain the EEGP. Chemical analyzes were carried out to investigate the composition of the extract, quantitative determination of phenolic compounds and for the determination of biological activities, the sample was submitted to the systemic toxicity test with the *G. mellonella* model to evaluate the safe concentrations to be used. Subsequently, *in vitro* assays were carried out to determine the antimicrobial activities, evaluating the minimum inhibitory concentrations, minimum microbicidal concentrations and antioxidant activity by the methods of scavenging free radicals DPPH, ferric reducing potential FRAP and reducing capacity of the oxygen radical ORAC. As a result, it was verified that the content of total phenolic compounds in the EEGP was 23.60 ± 0.22 mg GAE/g of extract. The antioxidant capacity of geopropolis in reducing the DPPH radical was 54.79 ± 1.64 $\mu\text{mol TEAC/g}$ of extract, the FRAP test showed a result of 2467.33 ± 223.45 $\mu\text{mol SF/g}$ extract, and in the ORAC the EEGP capacity was 0.57 ± 0.03 $\mu\text{mol TEAC/g}$. The EEGP showed antioxidant capacity of isolated compounds regarding the reduction of the ABTS+ radical online. The antimicrobial activity assay showed that the extract has greater activity against gram-positive bacteria. The extract did not show toxicity in the *in vivo* model used. In addition to the scientific results that could impact the production of knowledge in the area, we were able to structure the production of *G. mellonella* larvae, and the implementation of methodologies for the determination of toxicity and antimicrobial activity *in vivo*, which will thus allow us to envision the possibility of publications in higher impact journals, as well as establishing partnerships with other

research groups inside and outside the institution, optimizing public resources, increasing scientific productivity and the institution's visibility.

Keywords: Propolis; Natural products; Biological activities; Ethanol extract; Stingless bees.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma dos procedimentos de extração e análises de geoprópolis	32
Figura 2 – Cromatogramas do EEGP de <i>M. quadrifasciata</i> obtido em HPLC-DAD com ABTS on-line acoplado (picos negativos)	50
Figura 3 – Efeito da geoprópolis na viabilidade celular de macrófagos tratados com diferentes concentrações do EEGP e estimulados com LPS na presença do EEGP	52
Figura 4 – Toxicidade sistêmica do EEGP em modelo de larvas de <i>G. mellonella</i>	56
Figura 5 – Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> em modelo de <i>G. mellonella</i> do EEGP em diferentes doses	57

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 – Abelha <i>Melipona quadrifasciata</i> (Mandaçaia)	24
Fotografia 2 – Amostra de geoprópolis de <i>M. quadrifasciata</i>	27
Fotografia 3 – Larvas de <i>Galleria mellonella</i> (mariposa-do-favo-de-mel) em seu estado natural	29
Fotografia 4 – Método de injeção na hemocele em larva de <i>G. mellonella</i>	38
Fotografia 5 – Larvas de <i>G. mellonella</i> para indicação de toxicidade <i>in vivo</i>	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Classificação atual das abelhas sem ferrão	23
Tabela 1 – Gradiente de eluição utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa	37
Tabela 2 – Teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/g da geoprópolis) do Extrato Etanólico de Geoprópolis (EEGP) produzido por <i>M. quadrifasciata</i>	44
Tabela 3 – Compostos identificados por LC-ESI-QTOF-MS do EEGP de <i>M. quadrifasciata</i> - modo positivo	46
Tabela 4 – Compostos identificados por LC-ESI-QTOF-MS do EEGP de <i>M. quadrifasciata</i> - modo negativo	46
Tabela 5 – Resultados de atividade antioxidante do Extrato Etanólico de Geoprópolis (EEGP) produzida por <i>M. quadrifasciata</i>	48
Tabela 6 – Atividade antimicrobiana e antimicrobicida <i>in vitro</i> do EEGP de <i>M. quadrifasciata</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis (3 -etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EEGP-	Extrato Etanólico de Geoprópolis
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio
m/V	Massa/Volume
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol/L	Micromol/Litro
nm	Nanômetro
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.1.1	Objetivos Específicos.....	20
3	DESENVOLVIMENTO	21
3.1	Produtos Naturais	21
3.2	Abelhas sem Ferrão.....	22
3.3	Própolis e Geoprópolis.....	25
3.4	<i>Galleria mellonella</i>	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Coleta das amostras	31
4.2	Obtenção dos extratos etanólicos concentrados da geoprópolis de <i>M. quadrifasciata</i> (EEGP)	31
4.3	Determinação de fenólicos totais	32
4.4	Análises químicas do Extrato Etanólico de Geoprópolis (EEGP)	33
4.4.1	Determinação do perfil químico por LC-ESI-QTOF-MS.....	33
4.4.2	Análise Estatística e Anotação de Compostos.....	34
4.5	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	35
4.5.1	Atividade antioxidante pela desativação do radical livre DPPH.....	35
4.5.2	Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP.....	35
4.5.3	Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) em microplaca.....	36
4.5.4	Atividade antioxidante online por CLAE - FR com o radical ABTS•+.....	36
4.6	Toxicidade em modelo sistêmico de <i>G. mellonella in vivo</i>	38
4.7	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	39
4.7.1	Cultura de macrófagos.....	39
4.7.2	Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	39
4.7.3	Quantificação de TNF- α	39
4.8	Determinação da atividade antimicrobiana do EEGP contra diferentes microrganismos	39
4.8.1	Determinação da CIM.....	40
4.8.2	Determinação da CMM.....	41
4.8.3	Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	41
4.9	Análise Estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Rendimento da extração da amostra com etanol puro (P.A.)	43
5.2	Compostos fenólicos totais	43
5.3	Composição química do EEGP	45
5.4	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	47
5.5	Atividade antioxidante online por CLAE - FR com o radical ABTS•	50
5.6	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	51
5.7	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EEGP de <i>M. quadrifasciata</i> contra diferentes linhagens microbianas	53
5.8	Toxicidade aguda <i>in vivo</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	55
5.9	Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> em modelo de <i>G. mellonella</i> do EEGP	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Inúmeros produtos naturais têm sido amplamente utilizados na medicina popular como agentes terapêuticos desde os primórdios da humanidade. Quase todas as civilizações antigas conheciam e usavam produtos naturais como recursos valiosos em sua medicina (TIVERON *et al.*, 2016). As contribuições dos diferentes grupos étnicos ajudaram no desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais, contribuindo para com o avanço sobre conhecimentos associando a estrutura química de um determinado composto com suas propriedades biológicas, bem como, a inter-relação com animais/plantas (VIEGAS *et al.*, 2006).

Entre os produtos naturais utilizados pelo homem, destaca-se a própolis. Própolis é o nome genérico de substâncias resinosas produzidas em qualquer época do ano por abelhas a partir de uma mistura de substâncias coletadas de várias partes das plantas às quais esses invertebrados adicionam secreções salivares, ceras e pólen, sendo utilizadas para preencher buracos, proteger a entrada da colmeia contra agentes invasores e na reparação dos favos de mel (TIVERON *et al.*, 2016).

Apresenta composição química complexa e diversificada, dependente da fonte vegetal visitada pela abelha e época de coleta da resina. Possui propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, hepatoprotetora, gastroprotetora, anestésica, imunoestimulatória, anticancerígena, anti-inflamatória e antimutagênica e já foi usado, inclusive, como adjuvante no tratamento de pacientes hospitalizados com COVID-19 (BANKOVA *et al.*, 1998; DA CUNHA *et al.*, 2020; PARK, ALENCAR, AGUIAR, 2002; SALGUEIRO & CASTRO, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2021).

Além das abelhas do gênero *Apis*, mais conhecidas como africanizadas (*Apis mellifera*), no Brasil são também encontradas as abelhas nativas sem ferrão (meliponíneos). Os insetos da tribo Meliponinae, que conta com mais de 200 espécies conhecidas no Brasil, produzem outros tipos de própolis conhecidas também como geoprópolis. Diferentemente da própolis, para a elaboração da geoprópolis, além do material vegetal, secreções mandibulares, cera e pólen, estas abelhas adicionam terra ou barro à sua composição, e esta é uma característica marcante deste produto (FRANCHIN *et al.*, 2012, 2013).

Uma das espécies da tribo Meliponinae, amplamente distribuídas é a *Melipona quadrifasciata*, que juntamente com outras espécies de abelhas nativas, produzem produtos bastante valorizados como o mel, o pólen e a geoprópolis, cujas

propriedades biológicas tais como, antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, e a composição química despertam cada vez mais interesse (AL-HATAMLEH, *et al.*, 2020; BARBOZA *et al.*, 2020; CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006; DA CUNHA *et al.*, 2013a; DA CUNHA *et al.*, 2016a; DA CUNHA *et al.*, 2013b; DA CUNHA *et al.*, 2016b; DA CUNHA *et al.*, 2020; FRANCHIN *et al.*, 2012; FRANCHIN *et al.*, 2013; FRANCHIN *et al.*, 2016; POPOVA *et al.*, 2019; RUBINHO *et al.*, 2019 e SILVA *et al.*, 2012).

Entre as atividades biológicas propostas, a atividade antimicrobiana apresenta-se como uma das mais relevantes pois, os micro-organismos causadores de doenças estão sendo selecionados devido ao mal uso dos antibióticos, tornando-se resistentes aos medicamentos encontrados no mercado. Com isso, a busca por novos candidatos que possuam essa atividade é fundamental para a manutenção da saúde humana, dos animais domésticos e do desenvolvimento da agropecuária. Da mesma forma, as doenças crônicas mais comuns que acometem a população humana como diabetes, obesidade, hipertensão, câncer, entre outros, estão relacionadas com processos inflamatórios e/ou estresse oxidativos e assim, como no caso anterior, a bioprospecção de compostos que apresentam atividades para estas patologias é fundamental.

Concomitante à busca de soluções para os problemas referidos acima, este trabalho pretendeu implementar na UNIFAL-MG uma metodologia mais sofisticada para a determinação da atividade antimicrobiana e dos ensaios de toxicidade. Este método trata-se do uso de larvas de uma mariposa da espécie *Galleria mellonella* (mariposa da cera ou traça do favo de mel) (MAGUIRE, *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2016). O uso desse modelo *in vivo* é consagrado na comunidade científica e amplamente utilizado para estudar a patogênese, a eficácia de novos compostos antimicrobianos e a respostas imunológicas, uma vez que o sistema imunológico desta larva é estrutural e funcionalmente semelhante à resposta imune inata de mamíferos (PEREIRA *et al.*, 2018).

Cabe ressaltar que, como um modelo de infecção e toxicidade, a *G. mellonella* oferece uma série de vantagens técnicas sobre os modelos de infecção de mamíferos como por exemplo, alto rendimento, facilidade de manuseio, requisitos simples de alojamento, a possibilidade de produzir muitos indivíduos a um preço relativamente baixo, a não implicação de questões legais e éticas, entre outros.

Além disso, o planeta passa por enormes problemas relacionados às questões

ambientais e sociais. Vivemos em um mundo onde o momento histórico é caótico, um mundo onde milhões de pessoas perdem a vida acometidas por doenças infecciosas ou crônicas todos os anos. Na luta para buscar soluções para esses problemas, o estudo da composição química e das atividades biológicas de produtos naturais, como a geoprópolis, principalmente em um país com as características do Brasil, onde se concentra uma enorme biodiversidade, faz todo o sentido pois, possibilita a descoberta de novos candidatos a fármacos que possam combater doenças infecciosas e crônicas por meio de um possível medicamento ou melhorar as condições de saúde através do consumo na forma de um alimento funcional.

Sendo assim, trabalhos como este, envolvendo produtos meliponícolas, podem trazer resultados que agregam valores a esses produtos, despertando um maior interesse no cultivo e manutenção desses insetos. Com isso, além da possibilidade de gerar novos conhecimentos científicos, estes dados podem contribuir para a preservação do meio ambiente e o desenvolvimento socioeconômico da população local, fechando um círculo virtuoso fazendo valer o investimento em ciência e tecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição química e atividades biológicas do extrato etanólico de geoprópolis produzido por *Melipona quadrifasciata*.

2.1.1 Objetivos Específicos

- a) Determinar a composição química do extrato da geoprópolis de *M. quadrifasciata* por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-ESI-QTOF-MS);
- b) Analisar a atividade antioxidante do extrato etanólico de geoprópolis através de métodos espectrométricos;
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* em modelo de *G. mellonella* do extrato etanólico de geoprópolis contra diferentes microrganismos;
- d) Implementar e padronizar a metodologia para avaliar a toxicidade e a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de geoprópolis *in vivo* contra diferentes microrganismos usando o modelo de *G. mellonella*.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 PRODUTOS NATURAIS

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos há milênios, ao longo dos tempos, os seres humanos confiaram na Natureza para atender às suas necessidades básicas, entre as quais os medicamentos para o tratamento de um amplo espectro de doenças (CRAGG & NEWMAN, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2020).

Os gregos e romanos contribuíram substancialmente para o desenvolvimento racional do uso de fitoterápicos no mundo ocidental antigo. Dioscórides, um médico grego (100 d.C.), registrou com precisão a coleta, armazenamento e uso de ervas medicinais durante suas viagens com os exércitos romanos por todo o então “mundo conhecido”, enquanto Galeno (130-200 d.C.), um praticante e professor de farmácia e medicina em Roma, é bem conhecido por suas receitas complexas e fórmulas usadas na manipulação de medicamentos (CRAGG & NEWMAN, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2020).

Os sistemas à base de plantas continuam a desempenhar um papel essencial na saúde, e seu uso por diferentes culturas tem sido amplamente documentado (CRAGG & NEWMAN, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2020). Até a primeira metade do século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal, tanto nativa quanto introduzida. Hoje, a medicina popular do país é reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos autóctones que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados de geração em geração (LORENZI & MATOS, 2002).

Segundo a OMS, as práticas da medicina tradicional expandiram-se globalmente na última década do século passado e ganharam popularidade. Além disso, as plantas medicinais, as preparações fitofarmacêuticas e os produtos naturais isolados representam um mercado que movimenta bilhões de dólares, tanto em países industrializados como em desenvolvimento (BRASIL, 2006).

Os produtos naturais têm desempenhado um papel importante como fonte alternativa de fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças graves. Está claro que a Natureza continuará a ser uma importante fonte de novas pistas estruturais, e o desenvolvimento eficaz de medicamentos depende de colaborações multidisciplinares. Deve ser lembrado que a Natureza teve três bilhões de anos para refinar sua química e só agora estamos arranhando a superfície explorando a sua diversidade molecular (CRAGG & NEWMAN, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2020).

3.2 ABELHAS SEM FERRÃO

Os insetos estão entre os mais diversos e bem-sucedidos animais do planeta Terra, ocorrendo em praticamente todos os tipos de ambientes, tendo sido catalogadas cerca de um milhão de espécies de insetos descritas, o que corresponde a quase $\frac{3}{4}$ de todas as espécies animais conhecidas, com estimativa de que existam cerca de cinco milhões de espécies de insetos em todo mundo (GRIMALDI & ENGEL, 2005).

A ordem Hymenoptera tem sido considerada por diversos autores como a mais útil de todas as ordens de insetos, do ponto de vista da espécie humana. Isto por reunir as formigas, vespas (conhecidas na região amazônica como cabas) e, principalmente, as abelhas. Estas últimas com grande capacidade de geração de renda, devido à produção de mel, cera e própolis, além de seus serviços ambientais, que as posiciona no ranque como elementos chaves para conservação ambiental, especialmente, pelos serviços prestados na polinização de plantas nativas e cultivadas (ISBM, 2013).

As abelhas são insetos polinizadores, altamente sociais, que se organizam em colônias permanentes e são extremamente importantes para a manutenção dos ecossistemas locais. Estima-se que um terço da alimentação humana depende direta ou indiretamente da polinização realizada por abelhas (TOLEDO, 2018).

A apicultura é o manejo da espécie *Apis mellifera*, popularmente conhecida como “europeia” ou “africana” que, como o próprio nome diz, não é nativa do território brasileiro. Sua prática é muito difundida no país, dispõe de tecnologia desenvolvida, padrões de produção definidos e seus produtos regulamentados, é ela que fornece o mel disponível no mercado brasileiro. Já a Meliponicultura é a atividade de criação das abelhas sem ferrão, ou meliponíneos, nativas do Brasil e de outras regiões

tropicais e subtropicais da Terra (ISPN, 2018).

Os meliponíneos são um grupo que merece destaque, são conhecidos popularmente como abelhas indígenas “sem ferrão”, por possuírem o ferrão atrofiado (vestigial), perdendo a capacidade de ferocar. Seu tamanho varia de aproximadamente 2 mm até 15 mm. Morfologicamente, os meliponíneos podem ser facilmente distinguidos dentre as outras abelhas pela redução da venação da asa, a redução do ferrão (apenas vestigial), a ausência de esporão nas tíbias posteriores e a presença do lobo jugal nas asas posteriores (ISBM, 2013).

As abelhas sem ferrão (Meliponini), compreendem mais de 500 espécies classificadas em 48-61 gêneros. O maior número de gêneros e espécies ocorre na região Neotropical, com 32 gêneros e 417 espécies reconhecidas, e estudos recentes de genética populacional indicam que o número de espécies provavelmente será ainda maior. As abelhas sem ferrão não são apenas um clado monofilético rico em espécies, elas também são filogeneticamente muito mais antigas que as abelhas do gênero *Apis*, com origens que datam de 75 a 80 milhões de anos atrás (FREITAS et al., 2020).

Quadro 1 - Classificação atual das abelhas sem ferrão.

Classificação mais atual (Michener, 2007)	
Classe	<i>Insecta</i>
Ordem	<i>Hymenoptera</i>
Superfamília	<i>Apoidea</i>
Família	<i>Apidae</i>
Subfamília	<i>Apinae</i>
Tribo	<i>Meliponini</i>

Fonte: Adaptado ISPN (2018).

De maneira geral, as Meliponini, espécies unicamente do gênero *Melipona*, são as uruçus, jandaíras, tiúbas, mandaiaias e equivalentes. Já as Trigonini, espécies de

todos os outros gêneros que não são *Melipona*, são as jataís, irais, mirins, canudos e outras tantas (ISPN, 2018).

Nas Américas tropicais e subtropicais, as abelhas sem ferrão foram os principais polinizadores até a introdução da abelha *Apis mellifera*, no século XVIII (FREITAS et al., 2020). Elas estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Terra: com exceção do Chile, ocupam todos os países da América Latina; as florestas tropicais e savanas africanas; o extremo sul da Ásia, inclusive as ilhas do Pacífico; e norte da Oceania, incluindo o nordeste australiano. Entretanto, é nas Américas que grande parte da diversidade de espécies ocorre, são aproximadamente 350 tipos descritos, 250 só no Brasil em que a cultura de criação destes insetos se manifesta de forma mais abrangente (ISPN, 2018).

Dentre os meliponíneos, a espécie *Melipona quadrifasciata* (Figura 1), popularmente conhecida por Mandaçaia, que na linguagem indígena significa Vigia Bonito, devido ao enxame sempre ter um vigia que fica na entrada da colmeia, são as abelhas sem ferrão nativas brasileira da tribo Meliponini e gênero *Melipona*. Esta espécie mede de 10 mm a 12 mm de comprimento e tem o corpo preto com faixas amarelas no abdome. Na natureza ela constrói seus ninhos em ocos de árvores (ISBN, 2021).

Fotografia 1 - Abelha *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia)



Fonte: www.abelha.org.br (Editado).

No Brasil, *M. quadrifasciata* é uma espécie de abelha sem ferrão amplamente difundida que desempenha um papel importante como polinizador de habitats naturais

e culturas cultivadas (ANTONINI et al., 2006). A abelha sem ferrão *M. quadrifasciata* está entre as mais de 200 espécies de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, de regiões tropicais e subtropicais (GALGOWSKI et al., 2021).

Os meliponíneos constituem um grupo ecologicamente importante de abelhas pois atuam como polinizadores de plantas nativas das regiões tropicais, temperadas e subtropicais. Com a destruição da flora nativa, a redução de substrato para nidificação, a coleta predatória de ninhos e a introdução de espécies exóticas, essas abelhas vêm sendo dizimadas, com estimativas de que, no Brasil, aproximadamente 100 espécies de meliponíneos apresentam riscos potenciais de extinção. Desta forma, o interesse pela meliponicultura, que inclui o cultivo e a exploração racional dessas abelhas, pode contribuir para a preservação de espécies vegetais, além de agregar valor aos produtos meliponícolas, como o mel, a geoprópolis, a própolis, a cera e o pólen.

As abelhas nativas sem ferrão são as principais responsáveis pela polinização de plantas nativas das regiões tropicais, temperadas e subtropicais, além de contribuir na polinização de produtos agrícolas. A eficiência desses animais no processo de polinização está intimamente relacionada aos recursos naturais disponíveis na região. As ações antrópicas que acarretam a destruição da biodiversidade nativa, culminando na conseqüente redução de ninhos e diminuição da polinização, dificultam a restauração, recuperação e manutenção de matas e florestas.

Dessa forma, a meliponicultura – cultivo de abelhas sem ferrão – surge como uma alternativa na manutenção das espécies de meliponíneos, além de ser caracterizada como uma atividade de benefício mútuo para o ambiente e as comunidades que a praticam.

3.3 PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

A própolis, um produto alimentício, é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de brotos e exsudatos de plantas em diferentes regiões do mundo. A própolis foi usada pelos egípcios como um dos componentes do embalsamamento devido às suas propriedades anti putrefação, pelos incas como agente antipirético, e do século XVII ao XX tornou-se muito popular na Europa por sua atividade antibacteriana (TIVERON et al., 2016).

As abelhas produzem própolis para fortalecer e tapar buracos e rachaduras nas

paredes das colmeias, proteger as colmeias contra o vento e a água, reduzir o crescimento microbiano e manter a temperatura interna. A própolis é composta principalmente por cera e resinas vegetais e há muito tempo é utilizada na medicina antiga devido aos seus efeitos na saúde, bem como ingrediente alimentar mais recentemente. As abelhas forrageadoras obtêm as resinas de gemas vegetativas e exsudatos vegetais próximos às colmeias (SARTORI *et al.*, 2021).

A composição química e as atividades biológicas da própolis variam de acordo com a região e a disponibilidade de espécies botânicas de onde é proveniente. Os compostos voláteis presentes na própolis contribuem para seu aroma característico e são substâncias biologicamente ativas das resinas, correspondendo a até 3% da composição da própolis (SARTORI *et al.*, 2021). A própolis geralmente contém uma variedade de compostos químicos, como polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenóides, esteróides e aminoácidos, depende da vegetação no local de coleta (KUMAZAWA *et al.*, 2004).

A própolis tem sido usada na medicina popular em muitas regiões do mundo (GHISALBERTI *et al.*, 1979) e tem sido relatada em possuir várias atividades biológicas como antibacteriana (KUJUMGIEV *et al.*, 1999), antiviral (AMOROS *et al.*, 1994), anti-inflamatório (WANG *et al.* 1993) e anticancerígeno (KIMOTO *et al.*, 2001 e MATSUNO, 1995). Por esta razão, a própolis é amplamente utilizada em alimentos e bebidas para melhorar a saúde e prevenir doenças como inflamações, doenças cardíacas, diabetes e câncer (BANSKOTA *et al.*, 2001b; BURDOCK, 1998).

Existem também, além da própolis produzida por abelhas do gênero *Apis*, algumas espécies de meliponina que misturam própolis com argila ou solo. O resultado dessa mistura é um material resinoso mais rígido que a própolis, que é denominado de geoprópolis (Figura 2). Apesar das diferenças na formação de ambos os produtos, a geoprópolis tem funções semelhantes às da própolis no que diz respeito à proteção da colmeia e atividades biológicas (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Fotografia 2 - Amostra de geoprópolis de *M. quadrifasciata*.



Fonte: Autor

A geoprópolis é uma própolis incomum coletada por abelhas nativas sem ferrão da tribo Meliponini e amplamente encontrada em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo (FRANCHIN *et al.*, 2013). Diferentes atividades biológicas da própolis e da geoprópolis têm sido investigadas em todo o mundo, incluindo antioxidante (FRANCHIN *et al.*, 2012; FRANCHIN *et al.*, 2013 e DOS SANTOS *et al.*, 2017), imunomoduladoras (LIBERIO *et al.*, 2011 e OLIVEIRA *et al.*, 2019), antimicrobiana (DOS SANTOS *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019 e SUREK *et al.*, 2021), antileishmanial (DUTRA *et al.*, 2019), antiviral (YOSRI *et al.*, 2021), anti-inflamatória (FRANCHIN *et al.*, 2012; FRANCHIN *et al.*, 2013; e CAMPOS *et al.*, 2015) e ação antitumoral (BORGES *et al.*, 2011; CINEGAGLIA *et al.*, 2013; DA CUNHA *et al.*, 2013; BARTOLOMEU *et al.*, 2016) e (BARBOZA *et al.*, 2020).

Dentre as geoprópolis, a da espécie de abelha *Melipona quadrifasciata* tem sido alvo de interesse do nosso grupo de pesquisa, pois já foi descrito por (DA CUNHA, 2013), que estudos com geoprópolis observaram atividade antimicrobiana significativa contra *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos.

3.4 GALLERIA MELLONELLA

O estudo da virulência bacteriana muitas vezes requer um modelo animal

adequado, e modelos de infecção em mamíferos são caros e podem levantar questões éticas. O uso de insetos como modelos de infecção oferece uma alternativa valiosa. Em comparação com outros hospedeiros de modelos não vertebrados, como os nematoides, os insetos têm um sistema de defesa antimicrobiana relativamente avançado e, portanto, são mais propensos a produzir informações relevantes para o processo de infecção de mamíferos (RAMARAO *et al.* 2012).

Um dos modelos mais utilizados para estudar infecções microbianas é o modelo murino. No entanto, existem obstáculos éticos, orçamentários e logísticos associados ao uso de roedores como modelos de infecção. Em primeiro lugar, manter um número suficiente de animais necessários para obter dados estatisticamente relevantes é caro e muitas vezes considerado eticamente censurável. Em segundo lugar, os mamíferos têm longos períodos de reprodução, o que retarda o progresso da experimentação (TSAI *et al.* 2016).

Mais recentemente, a *Galleria mellonella* (mariposa-da-cera-maior ou mariposa-do-favo-de-mel) foi introduzida como um modelo alternativo para estudar infecções microbianas. *G. mellonella* é um inseto da ordem Lepidoptera e da família Pyralidae. Na verdade, são as larvas da lagarta, e não a mariposa adulta que é usada como modelo animal. Quando comparadas com os hospedeiros tradicionais de mamíferos, as larvas de *G. mellonella* são mais baratas de estabelecer e mais fáceis de manter, pois não requerem equipamentos de laboratório especiais (TSAI *et al.* 2016).

As larvas de *G. mellonella* apresentam várias vantagens técnicas: são relativamente grandes (as larvas de último instar antes da pupação têm cerca de 2 cm de comprimento e peso de 250 mg), permitindo a injeção de doses definidas de bactérias; eles podem ser criados em várias temperaturas (20°C a 30°C) e estudos de infecção podem ser realizados entre 15°C e acima de 37°C, permitindo experimentos que mimetizam um ambiente mamífero. A infecção das larvas permite monitorar a virulência bacteriana por diversos meios, incluindo cálculo da DL 50, medida da sobrevivência bacteriana e exame do processo de infecção (RAMARAO *et al.* 2012).

Fotografia 3 - Larvas de *Galleria mellonella* (mariposa-do-favo-de-mel) em seu estado natural.



Fonte: Autor

Nota: Larvas de *G. mellonella* vivas utilizadas nos experimentos.

A *G. mellonella* é um modelo cada vez mais popular para avaliar a virulência de patógenos bacterianos e a eficácia de agentes antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 2020). Nos últimos 20 anos, mais de 2.000 artigos científicos foram publicados no PubMed sobre *G. mellonella*, dos quais mais de 1000 foram publicados apenas em nos últimos três anos, demonstrando a crescente popularidade desse modelo de infecção. Em particular, houve uma expansão na diversidade de patógenos bacterianos estudados, contribuindo de forma inestimável para a pesquisa com microrganismos patogênicos humanos e veterinários (TSAI *et al.*, 2016).

A utilização das larvas de *G. mellonella* demonstraram fornecer uma visão útil sobre a patogênese de uma ampla gama de infecções microbianas, incluindo fungos de mamíferos como *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* e patógenos bacterianos, como *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* ou *Enterococcus faecalis*. Independentemente da espécie bacteriana, os resultados utilizando esse modelo correlacionam-se consistentemente com os de estudos semelhantes em mamíferos, em que cepas bacterianas que apresentam infecção atenuada em modelos de mamíferos demonstram menor virulência em *Galleria*, e cepas que causam infecções humanas graves também são altamente virulentas no modelo de

Galleria. (RAMARAO *et al.*, 2012). Assim, o diferencial deste trabalho também foi implementar na UNIFAL-MG, essa metodologia sofisticada para a determinação da atividade antimicrobiana e dos ensaios de toxicidade. Este método pode contribuir com várias pesquisas desenvolvidas na instituição, e o melhor, de forma rápida, eficaz, de baixo custo e ainda assim, são aceitas pela comunidade científica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir será apresentada a metodologia utilizada no desenvolvimento do presente trabalho, as quais estão descritas em detalhes.

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de geoprópolis produzidas por *M. quadrifasciata* foram coletadas no dia 20/12/2019 na estação verão, no meliponário localizado no município de Morretes-PR, (25°36'46''S 48°48'01''W). Os materiais foram coletados sob a supervisão do Sr. Jefferson Belenda, meliponicultor responsável pelo local.

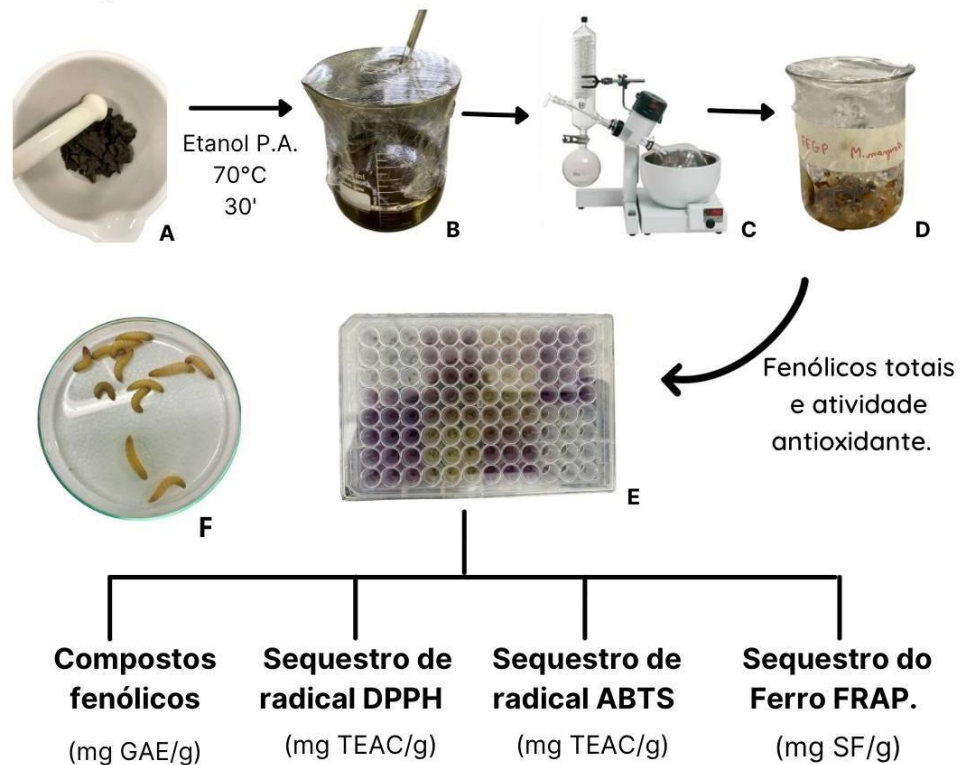
A coleta das amostras foi realizada raspando a geoprópolis produzida nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colmeia. Após a raspagem, o material foi devidamente embalado, etiquetado e armazenado em freezer (-8° C) até o preparo dos extratos e ensaios químicos e biológicos.

O projeto está cadastrado na plataforma SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o número A5F3CCB, para a regularização junto ao MMA (Ministério do Meio Ambiente) como atividade de acesso ao patrimônio genético (ANEXO 1).

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS CONCENTRADOS DA GEOPRÓPOLIS DE *M. QUADRIFASCIATA* (EEGP)

Para a obtenção do extrato etanólico de geoprópolis (EEGP), primeiramente foi feita uma limpeza, retirando-se eventuais impurezas como pedaços de madeira e insetos mortos, posteriormente, a amostra foi pulverizada com o auxílio de gral e pistilo. Foram pesados 70,3 g da amostra em um béquer e adicionados 525 mL de etanol absoluto. A suspensão foi aquecida em banho de água termostaticado a 70°C durante 30 minutos sob agitação constante. Após a extração, a mistura foi submetida à filtração a vácuo e concentrada em evaporador rotativo (Figura 1), para a obtenção do EEGP (FRANCHIN *et al.*, 2012).

Figura 1 - Fluxograma dos procedimentos de extração e análises da geoprópolis.



Fonte: Autor

Nota: **a-** maceração e limpeza do extrato bruto; **b-** suspensão e aquecimento em banho de água termostaticado; **c-** filtração a vácuo e concentração em evaporador rotativo; **d-** extrato etanólico concentrado; **e-** análises de fenólicos totais e antioxidantes em placa de 96 poços e **f:** ensaios de toxicidade e ação antimicrobiana em modelo sistêmico de *G. mellonella*.

4.3 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por Folin-Ciocalteu, conforme descrito por AL-DUAIS et al., (2009), adaptado para micro volumes. Cerca de 20 μL das amostras (EEGP ou padrão) foram adicionadas à microplaca de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu 10% e, após 5 minutos, 75 μL da solução de carbonato de potássio a 7,5%. A reação ocorreu por 40 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz, a absorbância foi determinada em um leitor de microplacas a 740 nm. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE), calculado com base em uma calibração curva de 20 a 120 $\mu\text{g/mL}$. O branco foi composto por 20 μL de água destilada no local da amostra. As amostras foram analisadas em triplicata e expressas em mg de GAE/g de extrato de própolis.

4.4 ANÁLISES QUÍMICAS DO EXTRATO ETANÓLICO DE GEOPRÓPOLIS (EEGP)

O ensaio de determinação do perfil químico por LC-ESI-QTOF-MS foi realizado em parceria com a Prof^a Patrícia de Oliveira Carvalho, da Universidade São Francisco – USF, em Bragança Paulista (SP).

4.4.1 Determinação do perfil químico por LC-ESI-QTOF-MS

A própolis seca (1 mg) foi reconstituída em 1 mL de etanol antes da análise por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS). A água foi purificada em um sistema Milli-Q da Millipore (Medford, MA, EUA). O acetonitrilo de grau HPLC (ACN) foi da Honeywell (Morristown, NJ, EUA). Os dados foram adquiridos usando um cromatógrafo líquido ACQUITY FTN acoplado a um espectrômetro de massa XEVO-G2XSQTOF (Waters, Milford, MA, EUA) usando o software MassLynx 4.1. Foi utilizado um ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters, 50 × 2,1 mm, 1,8 µm). A fase móvel consistiu de: (A) Água 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila a uma vazão de 0,20 mL.min⁻¹ com gradiente linear (em % B): 0–8,0 min: 25%; 8,0–9,0 min: 100%; 9,0–9,1 min: diminua para 25% (com mais 0,8 min para reequilibrar a coluna), resultando em uma análise de 10 min. O volume de injeção foi de 2 e 3 µL para os modos positivo e negativo, respectivamente. Para a fonte de ionização por eletrospray, os parâmetros foram definidos da seguinte forma: modo positivo com tensão capilar de 3,0 kV, cone de amostragem de 40.000, temperatura da fonte de 140°C, temperatura de dessolvatação de 300°C, fluxo de gás do cone de 50 L/h, e vazão de gás de dessolvatação de 1000 L/h; modo negativo com tensão capilar de 2,0 kV, cone de amostragem de 40.000, temperatura da fonte de 140°C, temperatura de dessolvatação de 550°C, fluxo de gás do cone de 50 L/h e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L/h. A faixa de varredura de aquisição foi de 50 a 1200 Da. Leucina encefalina (peso molecular = 555,62; 200 pg/µL em 1:1 ACN:H₂O) foi usada como uma massa de bloqueio para medições precisas de massa, e uma solução de formato de sódio 0,5 mM foi usada para calibração do instrumento. Cada amostra foi analisada três vezes.

Para monitorar a estabilidade do sistema, amostras de controle de qualidade

(QC) foram inseridas antes do lote e inseridas entre as injeções. Uma alíquota de 1 mg do EEGP foi reconstituída em 1 mL de solução de metanol / água (1:1, v/v) antes da análise por cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS). A fase móvel consistiu em: (A) Água 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila a uma taxa de fluxo de 0,20 mL/min com gradiente linear (em % B): 0–8,0 min: 25%; 8,0–9,0 min: 100%; 9,0–9,1 min: diminuir para 25% (com mais 0,8 min para o reequilíbrio da coluna), resultando em uma análise de 10 min. O volume de injeção foi de 1 µL.

Para a fonte de ionização por eletropulverização, os parâmetros foram definidos da seguinte forma: modo positivo com uma tensão capilar de 3,0 kV, cone de amostragem de 40.000, temperatura da fonte de 140°C, temperatura de dessolvatação de 300°C, fluxo de gás do cone de 50 L/h, e fluxo de gás de dessolvatação de 1000 L/h; modo negativo com tensão capilar de 2,0 kV, cone de amostragem de 40.000, temperatura da fonte de 140°C, temperatura de dessolvatação de 550°C, fluxo de gás de cone de 50 L/h e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L/h. A faixa de aquisição da varredura será de 50 a 1200 Da. Leucina encefalina (peso molecular = 555,62; 200 pg/µL em 1:1 ACN: H₂O) foi usada como uma massa de bloqueio para medições de massa precisas e uma solução de formiato de sódio 0,5 mM foi usada para calibração do instrumento.

4.4.2 Análise Estatística e Anotação de Compostos

Os dados brutos foram processados com o software Progenesis QI 2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido) para detecção de pico, alinhamento, integração, deconvolução e identificação putativa baseada em MSE (anotação) de compostos. Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), Vaniya-Fiehn Natural Product Library, banco de dados ReSpect e RIKEN Plant Metabolome MetaDatabase foram usados para esta anotação com os parâmetros de pesquisa de erro de massa do precursor ≤ 5 ppm e tolerância de fragmento ≤ 10 ppm. Pontuação de fragmentação, precisão de massa e similaridade de isótopos foram considerados para a identificação putativa das moléculas. A análise estatística foi realizada usando a plataforma web MetaboAnalyst 4.0 (McGill University, Montreal, QC, Canadá). Os dados foram normalizados de forma bruta usando a Normalização do Quociente Probabilístico e amostras de CQs como referência. Os dados foram cúbicos e log₁₀ transformados para modo positivo e negativo, respectivamente, e dimensionados

automaticamente antes de realizar a análise estatística. A análise de variância (ANOVA) não pareada foi usada como uma análise estatística univariada e a correção HSD de Tukey foi aplicada. Apenas as características (isto é, um íon com m/z único e tempo de retenção) que preencheram os critérios de taxa de falsa descoberta de valor p (FDR) ajustada $< 0,05$ foram consideradas.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

A atividade antioxidante foi testada por diferentes métodos descritos a seguir.

4.5.1 Atividade antioxidante pela desativação do radical livre DPPH

A determinação da atividade sequestrante de radicais livres de DPPH seguiu o método descrito por Moraes-de-Souza *et al.* (2008) com algumas modificações. Alíquotas de 66 μL do padrão, controle ou EEGP e 134 μL de solução de etanol 150 μM de DPPH foram transferidos para poços de microplacas. Após 45 min no escuro, a absorbância foi medida em 517 nm em um leitor de microplacas. O etanol foi usado como branco e uma curva de calibração foi construída com Trolox como padrão, em concentrações variando de 20 a 140 μM . A atividade antiradical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), calculada por meio da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH após 45 minutos de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol). A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em μmol Trolox equivalentes por mg de amostra ($\mu\text{mol TE/mg}$).

4.5.2 Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro – FRAP

O teste foi realizado a partir da metodologia descrita por Muller *et al.* (2010), com modificações. Foram preparados pontos da curva analítica do padrão sulfato ferroso em diferentes concentrações para gerar uma equação de reta. As amostras foram solubilizadas em etanol 80% e posteriormente diluídas também em etanol 80%, partindo-se de uma concentração de 10 mg/mL. Para o controle negativo, o extrato foi substituído pelo solvente etanol 80%. Foi utilizado água destilada para o branco. Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 20 μL da amostra, do padrão

ou do controle, 30 μL de água destilada e 200 μL do reagente FRAP preparado anteriormente utilizando-se 10 partes de solução tampão de acetato de potássio, 1 parte de cloreto férrico a 20 mM e 1 parte de solução de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina a 10 mM. A placa foi agitada e incubada a 37°C durante 8 minutos, e a leitura foi realizada a 595 nm na leitora SpectraMax - M3, Molecular Devices. Os resultados serão expressos em equivalente de sulfato ferroso ($\mu\text{M Fe } 2^+ / \text{mg de extrato}$).

4.5.3 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) em microplaca

O ensaio ORAC foi realizado de acordo com o método descrito por Chisté *et al.* (2011), com modificações. Em placas de 96 poços, o EEGP foi misturado com solução de fluoresceína (FL) e solução de dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH). Amostra foi solubilizada em etanol 80% e diluído em tampão fosfato em diferentes concentrações. A microplaca foi incubada a 37°C por 2 horas, com leitura a cada minuto em uma microplaca leitor SpectraMax® M3 em λ_{exc} 485 nm e λ_{em} 528 nm. O tampão fosfato foi usado como branco, e o etanol 80% foi usado como controle negativo. Soluções de Trolox (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 μM) foram usadas para construir uma curva de calibração. Os valores finais do ORAC foram calculados usando uma equação de regressão entre a concentração de Trolox e a área líquida sob a curva de decaimento FL e foram expressos como μmol de equivalentes de Trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol TEAC/g extrato}$).

4.5.4 Atividade antioxidante online por CLAE - FR com o radical ABTS•⁺

O ensaio foi desenvolvido em parceria com a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ da Universidade de São Paulo - USP. A análise foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Koleva *et al.* (2001), com algumas modificações. O método consiste em analisar de forma online e momentânea os compostos separados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE - FR) quanto as suas capacidades de sequestrar o radical livre ABTS•⁺. Para a realização da análise, foi utilizado o radical ABTS•⁺ 7mM previamente preparado e diluído em metanol 100% para ajuste de absorbância de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. O radical reagiu com os compostos presentes na amostra analisada, separados pós-coluna cromatográfica durante aproximadamente 1 minuto. A amostra submetida à

essa análise foi filtrada em filtro de 0,22 µm antes da injeção de alíquotas de 40 µL no cromatógrafo.

A reação ocorreu da seguinte forma: os compostos separados por cromatografia líquida de alta eficiência foram primeiramente detectados pelo detector de arranjo de fotiodo (DAD–SPD -M10AVp, Shimadzu Co). Após a eluição desses compostos da coluna cromatográfica ODS – A (Fase Reversa - 18, de 4,6 x 250mm, com partículas no tamanho de 5 µm) a reação com o radical ABTS•+ ocorreu no coil (15m x 0. 25mm i.d. PEEK tubing).

A análise da perda da coloração azul do radical, em consequência da intensidade do sequestro destes pelos compostos, foi detectada por um detector de UV - Vis (SPD - 20 AV, Shimadzu Co) à 734 nm, resultando na formação de picos negativos. O método utilizado para realização do perfil cromatográfico foi proposto por Tiveron (2015) e consistiu no uso da fase móvel A: água/ácido acético (95,5%/0,5% v/v) e fase móvel B: metanol 100%. A corrida teve o total de 120 min e o gradiente de eluição aumentou gradativamente conforme a Tabela 1:

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa

Gradiente Fase A	Gradiente Fase B	Tempo inicial	Tempo final
70%	30%	0 min	15 min
60%	40%	15 min	30 min
50%	50%	30 min	45 min
40%	60%	45 min	65 min
25%	75%	65 min	95 min
10%	90%	95 min	105 min
70%	30%	105 min	120 min

Fonte: (SALIBA, A.S.M.C, 2021), pag.32.¹

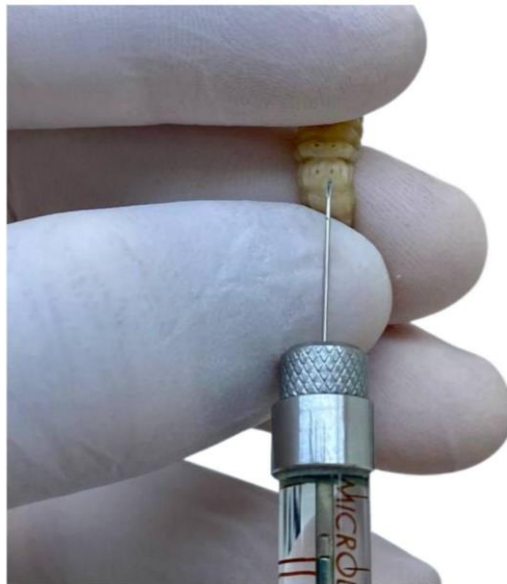
Os resultados obtidos foram analisados pelo software Class - VP e expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox, por meio da utilização de uma curva de calibração com concentrações entre 12,5 e 200 µM.

¹ Saliba , Ana Sofia Martelli Chaib. Digestão in vitro e transporte de polifenóis da própolis orgânica do Sul do Brasil por meio de células humanas Caco - 2 / Dissertação (Mestrado) - USP / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 71 p. 2021.

4.6 TOXICIDADE EM MODELO SISTÊMICO DE *G. MELLONELLA IN VIVO*

Os efeitos de toxicidade aguda do EEGP foram avaliados *in vivo* usando o modelo de larvas de *G. mellonella*, como anteriormente descrito com modificações por SARDI et al (2017). Três doses crescentes de extratos foram testadas a fim de determinar seu LD₅₀ (mínima dose capaz de matar 50% das larvas ao longo do tempo). Um total de 15 larvas foram selecionadas aleatoriamente para cada grupo (total n = 45 / extrato) pesando entre 0,2 e 0,3 g, sem sinais de melanização. Dez microlitros dos extratos ou controle (H₂O_d) foram injetados na hemocele de cada larva através do último *proleg* esquerdo usando uma Seringa Hamilton de 25µL.

Fotografia 4 - Método de injeção na hemocele em larva de *G. mellonella*.



Fonte: Autor

As larvas foram incubadas a 30°C e sua sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados de 24h, 48h e 72h. Apenas as larvas que não exibiram movimentos ao toque e com altos níveis de melanização foram contados como mortas.

4.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

4.7.1 Cultura de macrófagos

Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 2 mM de glutamina a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ /95%.

4.7.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT

Os macrófagos RAW 264.7 (BCRJ code: 0212; Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados em placas de 96 poços (2 x 10⁵ células/poço) por 24 horas, a 37°C com 5% de CO₂. Passado o período de adesão, as células foram tratadas com DMSO em concentrações de 0,1; 1; 10 e 25 µg/ml. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido, e o RPMI com MTT (0,3 mg/ml) foi adicionado e a placa incubada por 3h. Posterior, o sobrenadante foi removido novamente e as células foram ressuspensas em 200 µL de DMSO a 5%. A absorbância foi medida a 540nm usando um leitor de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.7.3 Quantificação de TNF-α

Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços (2 x 10⁵ células/poço) por 24 horas, a 37°C com 5% de CO₂. Passado o período de adesão, as células foram tratadas com DMSO em concentrações de 10 µg/ml por 30 minutos e foram estimuladas com LPS 10 mg/mL por 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e a citocina TNF-α foram quantificadas pelo método de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EEGP CONTRA DIFERENTES MICRORGANISMOS

Para os testes de determinação da atividade antimicrobiana foram utilizados microrganismos cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) que foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Microbiologia Básica da Unifal-MG.

4.8.1 Determinação da CIM

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada empregando placas de 96 poços pelo método de microdiluição em caldo, conforme os protocolos M07-A11 para bactérias (CSLI, 2018) e M27 para leveduras (CLSI, 2017), desenvolvidos pelo Clinical Laboratory Standardization Institute. Para a determinação da concentração inibitória mínima, o extrato foi testado nas concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL. Os experimentos foram realizados com cepas Gram-positivas padrão ATCC (exceto *Listeria innocua* (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monoeytogenes* ATCC 2035 e *Listeria innocua* CLIST 2050); cepas Gram-negativas padrão ATCC (exceto *Salmonella typhimurium*) (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella typhimurium*) e cepa de levedura padrão ATCC (*Candida albicans* ATCC 10231).

As cepas foram reativadas a partir das culturas estoque em meio BHI líquido (Brain Heart Infusion) por 24h a 35°C, e posteriormente, com auxílio de uma pipeta foram suspendidas em uma solução de NaCl 0,9% estéril. A turbidez desta suspensão foi avaliada mensurando-se a suspensão em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm, 75% de transmitância, o que equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Depois foi realizada uma diluição de modo a obter uma concentração microbiana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL.

Em microplacas de 96 poços, foram aplicados 180 µL de meio de cultura e 20 µL de extrato nos poços das colunas 1 a 9 da linha A, e 100 µL do caldo nos poços 1 a 9 das linhas B-H (análise de cada amostra em triplicata), com posterior diluição do extrato a partir do poço da linha A e adição de 80 µL de caldo e 20 µL da suspensão microbiana em todos os poços das colunas 1 a 9. Para a avaliação do antimicrobiano amoxicilina, foram aplicados 180 µL do meio de cultura e 20 µL do antimicrobiano no poço 10 da linha A, e 100 µL do caldo no poço 10 das linhas B-H, com posterior diluição a partir do poço da linha A e adição de 80 µL de meio e 20 µL da suspensão microbiana em todos os poços da coluna 10.

O controle negativo do solvente foi realizado substituindo-se o extrato por etanol absoluto na coluna 11. O controle do microrganismo foi realizado adicionando 180 µL do meio de cultura e 20 µL da suspensão microbiana nos poços E-H da coluna 12. Para o controle de esterilidade do meio de cultura, foram aplicados 200 µL do meio nos poços A-D da coluna 12. As microplacas foram incubadas em estufa a 35°C por

24 horas. Para a leitura foi adicionado 20 µL do indicador resazurina (Sigma Aldrich®) em cada poço da microplaca 02 h antes, e a leitura foi realizada a olho nu.

4.8.2 Determinação da CMM

A partir dos resultados obtidos no experimento para determinação da CIM, as suspensões provenientes dos poços em que não houve crescimento microbiano foram utilizadas para a determinação da atividade microbicida. Desta forma, após visualização do resultado da CIM, 10 µL dessas suspensões foram inoculadas em placas de ágar Mueller - Hinton, em triplicata, e incubadas a 35°C por 24 horas. As concentrações microbicidas mínimas (CMM) foram consideradas como a menor concentração das amostras testadas que não permitiram crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

4.8.3 Determinação da atividade antimicrobiana *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

A atividade antimicrobiana *in vivo* foi testada frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), seguindo a metodologia proposta por Loh *et al.* (2013) com adaptações. A cepa foi reativada a partir das culturas estoque em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 h a 35°C, e posteriormente suspensa em solução de NaCl 0,9 % estéril. A turbidez desta suspensão foi padronizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm, a 25 % de transmitância, sendo este o IC50 para as larvas.

Um total de 10 larvas foram selecionadas aleatoriamente para cada grupo, pesando entre 0,2 e 0,3 g, sem sinais de melanização. Dez microlitros da suspensão microbiana foram injetadas na hemocele de cada larva através do último segmento esquerdo usando uma Seringa Hamilton de 25 µL (Hamilton, Reno, NV). Após uma hora da inoculação do microrganismo, foram injetados dez microlitros do EEGP e controles conforme descrito acima. O teste foi realizado usando as concentrações de 125, 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL, o que equivale as doses de 5,10, 20, 40 e 80 mg/kg, que apresentaram atividade no teste *in vitro* e etanol e água destilada estéril como controles. As placas de Petri contendo as larvas foram incubadas a 35°C, e sua

sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas pós infecção.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados de quantificação de compostos fenólicos e das atividades antioxidantes foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados por meio do software R - Studio com análises de variância (ANOVA) por meio do procedimento "GLM". Para a comparação das médias, foi aplicado o teste de Tukey a o nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na caracterização química e nos ensaios de atividades biológicas e antioxidantes do extrato etanólico da geoprópolis produzida por *M. quadrifasciata*, são expostos e discutidos nos itens a seguir.

5.1 RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DA AMOSTRA COM ETANOL PURO (P.A)

Como descrito no subitem 4.2, a amostra bruta antes dos processos de extração continha uma massa de 70,03 g, e para a determinação do rendimento do extrato, após a extração com etanol absoluto a amostra foi armazenada em béquer previamente pesado até atingir peso constante. Após esse processo o extrato concentrado apresentou uma massa de 29,5 g e o respectivo rendimento de 42,12%.

O rendimento do extrato da geoprópolis foi avaliado para identificar o poder de extração do solvente utilizado e o resultado demonstra que a geoprópolis de *M. quadrifasciata* extraída com etanol P.A como solvente, apresentou um rendimento geral superior ao valor encontrado por Rubinho *et al.* (2019), que foi de 14%, onde a geoprópolis produzida pela mesma espécie de abelha, porém coletada no Sul de Minas Gerais. Ferreira *et al.* (2020), ao analisar a geoprópolis também produzida pela mesma espécie de abelha, porém coletada no Sul de Santa Catarina, obteve o rendimento de 6%, também utilizando etanol absoluto como solvente. Essa disparidade pode ser explicada pela diferença no comportamento das abelhas ao produzirem a geoprópolis. Pelo fato deste produto ser constituído de uma mistura de solo, cera e resinas de plantas, caso a coleta de solo para a produção de geoprópolis seja maior, o rendimento da extração pode ser menor. Porém, caso o teor de cera e resina seja maior, o rendimento, nesses casos, pode ser maior. No entanto, cabe ressaltar que o maior rendimento não está diretamente relacionado com a qualidade da geoprópolis, uma vez que esta característica dependerá da qualidade dos constituintes existentes na produção da geoprópolis oriunda das resinas dos vegetais que circundam as colmeias.

5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O resultado do teor de compostos fenólicos totais do extrato etanólico de geoprópolis produzido pela abelha da espécie *M. quadrifasciata* estudada neste

trabalho é apresentado na Tabela 2:

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/g da geoprópolis) do Extrato Etanólico de Geoprópolis (EEGP) produzido por *M. quadrifasciata*.

EEGP	Fenólicos Totais mg GAE/mg
<i>M. quadrifasciata</i>	23,60± 0,22

Fonte: Autor

O teor de compostos fenólicos totais dessa geoprópolis foi próximo ao valor encontrado por DE SOUZA (2013) que foi de 27,0 ±0,4 mg GAE/g da geoprópolis de *Melipona subnitida*, coletada na Paraíba. Porém, foi inferior ao encontrado por Rubinho et al. (2019) que foi de 238,22 ± 11,89 mg GAE/g da geoprópolis da mesma espécie, coletada em outra região, no Sul de Minas Gerais. Ainda no Brasil, a própolis verde produzida no estado de Minas Gerais apresentou 120 mg GAE/g (KUMAZAWA et al., 2004), a própolis vermelha coletada no estado de Alagoas teve valor de 232 mg GAE/g (ALENCAR et al., 2007) enquanto a própolis orgânica coletada no Sul do Brasil foi de 17,59 mg GAE/g (TIVERON et al., 2016). Essas diferenças devem-se, principalmente, às espécies vegetais disponíveis para a produção de própolis nas regiões próximas às colmeias. Importante ressaltar ainda que, o teor de compostos fenólicos nem sempre está correlacionado com a qualidade da amostra uma vez que o teste de Folin-Ciocalteu tem suas limitações, entre as quais, sensibilidade seletiva, onde o teste não é seletivo apenas para compostos fenólicos, pois outros compostos, como ácidos orgânicos, podem reagir com o reagente de Folin e gerar um sinal positivo falso, podendo resultar em uma superestimação da quantidade de compostos fenólicos na amostra, e ainda, a variedade de compostos fenólicos com diferentes estruturas químicas que podem afetar a resposta no teste de Folin, levando a variações na precisão e na sensibilidade do método para diferentes tipos de compostos fenólicos. Apesar disso, o teste é preconizado pelas agências oficiais do Brasil para a análise desse tipo de produto.

Compostos fenólicos são substâncias químicas que, em sua estrutura, possuem ao menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. O reagente Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a

partir de heteropoliácidos fosfomolibúdicos e fosfotungsticos (BASTOS *et al.*, 2011). Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo-os a um complexo azul Mo-W, juntamente com a adição de carbonato de sódio, podendo ser medido por espectrofotometria. O método de Folin-Ciocalteu é empregado com o objetivo de detectar todas as classes de compostos poli-hidroxifenólicos. Como o reagente de Folin-Ciocalteu reage com alguns compostos não fenólicos que também apresentam atividade antioxidante e apresenta elevada correlação com métodos usados para avaliar atividade antioxidante, alguns autores sugerem que este método seja empregado para determinar capacidade antioxidante total (EVERETTE *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos exibem uma ampla variedade de propriedades biológicas, como atividades anticancerígenas, anti alérgicas, anti aterogênicas, anti hepatotóxicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti trombóticas, cardioprotetoras, anti-replicação do HIV, vasodilatadoras e antioxidantes (DUTRA *et al.*, 2014). Os efeitos benéficos dos compostos fenólicos têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos têm sido foco de interesse devido às suas propriedades antioxidantes e quimiopreventivas. Particularmente, os polifenóis parecem ser responsáveis pelos benefícios para a saúde humana (FRACASSETTI *et al.*, 2013).

5.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EEGP

Pelo uso da técnica de LC-ESI-QTOF-MS, foram identificados 22 compostos fenólicos no extrato etanólico bruto da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata*, 11 na fase positiva e 11 na fase negativa (Tabelas 3 e 4).

Foi feita uma análise exploratória com anotação (*putative identification*) de compostos diferenciais. A anotação foi feita automaticamente pelo software Progenesis levando-se em consideração dados de massa exata (erros menores que 5 ppm) e comparação com padrões de fragmentação em bancos de espectros. Foram excluídas *features* com coeficiente de variação > 25% nas amostras QC, mesmo após a normalização.

Dentre os potenciais *features* de interesse, obteve-se 26 *features* diferenciais para o modo negativo e 19 para o modo positivo. Dentre estes, selecionou-se os 11 *features* mais diferenciais (com base no valor de p) em cada modo de ionização, cujos dados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 3 - Compostos identificados por LC-ESI-QTOF-MS do EEGP de *M. quadrifasciata* - Modo positivo.

Composto	Identificação	Tr (min)	[M-H] m/z	Erro de massa (ppm)	Fórmula molecular
1	Naringenin	1.10	273.0752	-2,183947196	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
2	Artemisinin	1.19	265.1443	3,074495376	C ₁₅ H ₂₂ O ₅
3	Caemferol 3-O-beta-soforosídeo	1.24	445.1139	2,058109815	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
4	Coumaric acid O-glucosídeo	1.30	349.0884	-3,0830008	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
5	D-(+)-Maltose monohydrate	1.30	365.1047	-2,095037291	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
6	1-O-trans-cinnamoyl-beta-D-glucopyranose	1.32	333.0935	-3,240114848	C ₁₅ H ₁₈ O ₇
7	4-Methylesculetin	5.32	193.0489	-3,225977436	C ₁₀ H ₈ O ₄
8	7,4'-Dimethoxyisoflavone	5.77	283.0958	-2,563356789	C ₁₇ H ₁₄ O ₄
9	(+)-Jasmonic acid	5.81	193.1215	-3,702742729	C ₁₂ H ₁₈ O ₃
10	Aracdonic acid	5.91	304.2399	-1,193408223	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
11	Kaurenic acid	6.34	285.2204	-2,976449902	C ₂₀ H ₃₀ O ₂

Nota: Tr- Tempo de retenção; m/z- relação massa carga.

Tabela 4 - Compostos identificados por LC-ESI-QTOF-MS do EEGP de *M. quadrifasciata* - modo negativo.

Composto	Identificação	Tr (min)	[M-H] m/z	Erro de massa (ppm)	Fórmula molecular
12	Isorhamnetin-3-O-galactosídeo	1.04	477.1036	-0,4416341226	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂
13	5-O-Methylgenistein	1.12	283.0610	-0,6031625379	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
14	Mycophenolic Acid	1.12	319.1187	0,08655711665	C ₁₇ H ₂₀ O ₆
15	Artemisinin	1.16	281.1382	-4,578070322	C ₁₅ H ₂₂ O ₅
16	Hydroxy Ferulic Acid	1.17	209.0456	0,1918556279	C ₁₀ H ₁₀ O ₅
17	Galloyl glucose	1.26	331.0654	-4,919467206	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀
18	Kaempherol-3-O-beta-sophorosídeo	1.30	461.1088	-0,2732454589	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
19	4-Coumaric acid	1.35	163.0396	-2,655376264	C ₉ H ₈ O ₃
20	Dihydrokaempferol	1.35	287.0553	-2,8263795	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
21	1-O-trans-cinnamoyl-beta-D-glucopyranose	1.37	291.0879	1,626898052	C ₁₅ H ₁₈ O ₇
22	2'-Hydroxyflavanone	5.70	239.0715	0,50231137	C ₁₅ H ₁₂ O ₃

Nota: Tr- tempo de Retenção; m/z- relação massa carga.

Entre os compostos presentes na amostra, o composto 01, foi identificado como Naringenina, que é uma flavanona amplamente utilizada nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica devido às suas diversas atividades fisiológicas, incluindo propriedades anti-inflamatória (1), antioxidante (2) e hiperlipidêmica (3). Estudos anteriores mostraram que a Naringenina pode ser usada para regular e tratar várias doenças fisiológicas em humanos, como obesidade, diabetes, hiperlipidemia e pressão arterial elevada (AYOUB *et al.* 2017; BAO *et al.*, 2016; BAUR & SINCLAIR, 2006 e VAN HUL *et al.*, 2018).

A artemisinina, composto 02, é uma lactona antimalárica derivada de *qing hao* (*Artemisia annua* ou absinto doce). O valor medicinal desta planta é conhecido pelos chineses há pelo menos 2.000 anos. Em 1596, Li Shizhen recomendou chá feito de *qing hao* especificamente para tratar os sintomas da malária (VINETZ *et al.*, 2011).

O ácido jasmônico, composto 09, é um composto orgânico pertencente à família dos ácidos carboxílicos. É um fito-hormônio que regula o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas tem sido objeto de estudos devido à sua potencial atividade farmacológica. Jarocka-Karpowicz *et al.*, (2021), relacionou diversas atividades biológicas associadas a este composto e seus derivados, entre as quais, anti-inflamatória, anticâncer e antienvelhecimento.

O composto 19, identificado como ácido cumárico, é um composto fenólico encontrado em muitas plantas e faz parte da via de biossíntese dos fenilpropanóides, que estão envolvidos na síntese de diversos metabólitos secundários. É uma molécula cuja atividade farmacológica é bastante conhecida, principalmente relacionada à atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e proteção contra radiação UV (Boz, 2015; Boo, 2019).

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Os resultados das análises de atividade antioxidante do EEGP estão apresentados na Tabela 5:

Tabela 5 - Resultados de atividade antioxidante do Extrato Etanólico de Geoprópolis (EEGP) produzida por *M. quadrifasciata*.

EEGP	DPPH μmol TEAC/mg de extrato	FRAP μmol SF/mg de extrato	ORAC μmol TEAC/mg de extrato
<i>Melipona quadrifasciata</i>	54,79±1,64	2467,33±223,45	0,57±0,03

Fonte: autor

O resultado da atividade de eliminação do radical livre DPPH do extrato foi de 54,79±1,64 μmol TEAC/mg, onde observou-se uma capacidade antioxidante considerável, em que o sequestro de radicais foi superior ao resultado apresentado por Tiveron (2016), onde o valor do DPPH da própolis orgânica coletada no Sul do Brasil exibiu uma atividade de 0,38 μmol TEAC/mg. A geoprópolis de *Melipona orbigny* coletada no Mato Grosso do Sul também obteve um valor menor, 18,3 ± 2,8 μmol TEAC/mg (DOS SANTOS *et al.*, 2017), o resultado foi menor comparado a Rubinho (2019), da geoprópolis de *M. quadrifasciata* coletada no Sul de Minas Gerais (1.650,99 ± 81,09 μmol TEAC/g). Como a composição química da própolis é dependente da localização geográfica, a relação entre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante está relacionada com a flora e região da coleta.

O método do sequestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), permite detectar a capacidade de uma substância antioxidante em transferir elétrons e reduzir o radical DPPH. Por não ser um método específico, é um ensaio comumente utilizado para avaliar o potencial antioxidante total de amostras (PIRES *et al.*, 2017). Essa metodologia do DPPH avalia a capacidade geral da amostra em sequestrar esses radicais livres e como ele é solubilizado em solventes orgânicos, favorece a ação de compostos lipofílicos, podendo subestimar a capacidade antioxidante total da amostra (ARNAO, 2001).

Quando analisada pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) a atividade antioxidante obteve o valor de 2.467,33± 223,45 μmol Fe²⁺/mg extrato, provavelmente devido ao mecanismo específico do teste, considerando que os princípios metodológicos dos testes são diferentes assim como o radical utilizado. O EEGP obteve valor equivalente ao encontrado por Rubinho (2019) que foi de

($2.228,08 \pm 64,27 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ extrato) da geoprópolis da mesma espécie de abelha, porém do sul de Minas Gerais, porém, significativamente maior que o encontrado por Da Silva (2013) tendo um valor de $52,0 \pm 0,0 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ extrato da geoprópolis de *M. interrupta* coletada no Amazonas. Esses valores podem variar de acordo com a origem e composição química da geoprópolis, bem como o solvente usado na obtenção do extrato e até o tempo de reação.

O FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) é um teste simples e preciso, capaz de reproduzir em condições adversas e relativamente barato que mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}). Em baixo pH, o excesso de Fe^{3+} na mistura da reação é reduzido à forma ferrosa, o qual gera a formação de cor que está diretamente relacionada com a capacidade de redução da amostra. Observa-se que de acordo com os valores encontrados neste trabalho, não existe correlação significativa entre a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante pelo método FRAP, a alta capacidade antioxidante talvez não possa ser atribuído ao conteúdo de fenólicos totais, uma vez que os resultados indicam que a concentração total de compostos fenólicos não é o único fator responsável pelas propriedades antioxidantes, a natureza química das substâncias fenólicas e a presença de outros derivados, também contribuem para a capacidade antioxidante total dos extratos (SALGUEIRO e CASTRO, 2016).

Pelo método ORAC, a atividade antioxidante do EEGP foi de $0,57 \pm 0,03 \mu\text{mol TEAC}/\text{mg}$, inferior à atividade da geoprópolis de *M. quadrifasciata* estudada por Rubinho *et al.*, (2019), que foi de $2919.57 \pm 46.75 \mu\text{mol TEAC}/\text{g}$. A capacidade de absorção do radical oxigênio (Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC) é um método de medida, *in vitro*, da capacidade antioxidante em amostras biológicas. O ensaio mede a degradação oxidativa da molécula fluorescente “fluoresceína”, após ser misturada com geradores de radicais livres como o “AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride)”. O AAPH, assim como outros azo-iniciadores, produz radicais peroxila por aquecimento, os quais oxidam a sonda fluorescente. Assim, a intensidade de fluorescência decresce com o progresso do processo oxidativo. A degeneração da fluoresceína é medida na presença de antioxidantes, os quais retardam a taxa de oxidação e, por consequência, a perda de fluorescência (CHISTÉ *et al.*, 2011). A atividade determinada pelo método ORAC apresenta uma melhor correlação com a atividade antioxidante que ocorre *in vivo*, pois analisa a atividade contra radicais peroxila que são envolvidos na peroxidação e auto oxidação lipídica

(TAN & LIM, 2015).

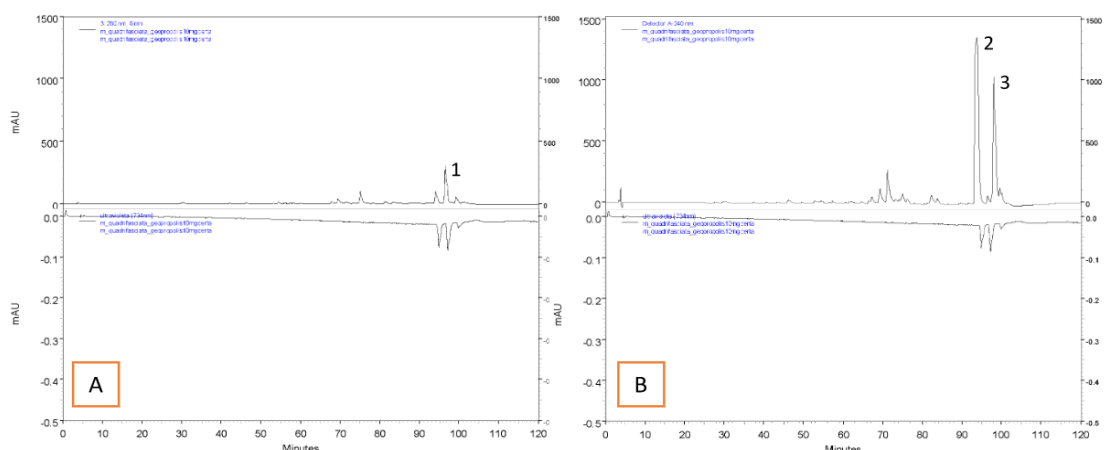
Estudos relataram que a atividade antioxidante está significativamente correlacionada com várias propriedades curativas, como atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas e anti-obesidade (AVILA *et al.*, 2019; AZIZ *et al.*, 2017; BONAMIGO *et al.*, 2017 e RANNEH *et al.*, 2019). Isso não é surpreendente, dado que o papel dos antioxidantes no estresse/dano oxidativo é bem conhecido e está implicado em uma ampla gama de doenças. Além disso, o papel dos antioxidantes não se limita a eliminar os radicais livres; também tem bons potenciais para modular as vias de transdução de sinal que são afetadas pelos radicais livres durante o estresse oxidativo e são responsáveis pelas respostas celulares, por exemplo, inflamação, sobrevivência, proliferação e morte em várias doenças (AL-HATAMLEH, M. *et al.*, 2020; DHARMARAJA, A.T., 2017 e DZIAL, M. *et al.*, 2016).

Parte da atividade antioxidante demonstrada pela geoprópolis pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos como 4-ácido cumárico, a naringenina e alguns flavonoides que foram identificados na amostra estudada.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ONLINE POR CLAE - FR COM O RADICAL ABTS•

Os resultados da atividade antioxidante *on-line* do extrato de geoprópolis de *M. quadrifasciata* estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Cromatogramas do EEGP de *M. quadrifasciata* obtido em HPLC-DAD com ABTS *on-line* acoplado (picos negativos).



Nota: A - leitura no comprimento de onda 280 nm e **B** - leitura no comprimento de onda 240 nm.

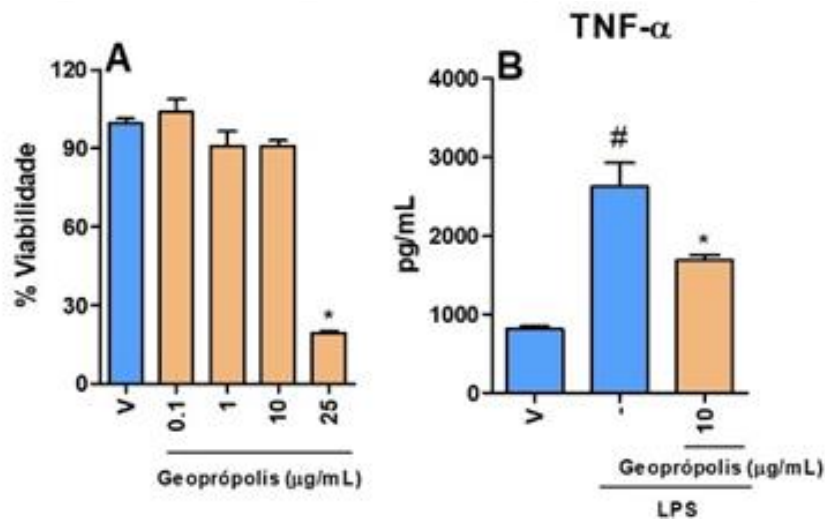
Nos comprimentos de onda 280 e 240 nm, foi possível observar que 3 compostos apresentaram potencial em reduzir o radical ABTS^{•+}, formando picos negativos. Os três compostos, não identificados, e que apresentaram capacidade de redução ABTS^{•+} foram quantificados e expressos em equivalentes ao Trolox, através de uma curva de calibração. O composto 1 (TR=96.47 min) representa uma atividade equivalente à 107,89 µmol de Trolox/mg. O composto 2 (TR= 93.8 min) representa 84,15 µmol de Trolox/mg. E o composto 3 (TR= 98.24 min) tem atividade relativa à 18,05 µmol de Trolox/mg.

Alguns compostos, possuem maior capacidade em interagir com o radical ABTS^{•+} devido a carga positiva deste (SPAGNOL *et al.*, 2019), entretanto, isso não significa que os compostos que não reduzem o radical ABTS^{•+}, não tenham atividade antioxidante em relação a outros radicais, através de outras formas de redução. Sendo assim, a geoprópolis de *M. quadrifasciata* apresenta capacidade antioxidante de compostos isolados quanto à redução do radical ABTS^{•+}, havendo a necessidade da posterior identificação dos compostos que apresentaram tal atividade.

5.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

Ensaio de viabilidade celular e quantificação de TNF- α foram realizados para determinar se o extrato apresentava efeitos citotóxicos em macrófagos e melhor avaliar seu mecanismo de ação na ativação do TNF- α , respectivamente (Figura 3).

Figura 3 - Efeito da geoprópolis na viabilidade celular de macrófagos tratados com diferentes concentrações do EEGP e estimulados com LPS na presença do EEGP.



Nota: (A) Ensaio de MTT realizado em macrófagos RAW 264.7 tratados com geoprópolis e incubados por 24h **(B)** quantificação de TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos tratados com geoprópolis 10 g/mL e estimulados com LPS 10 ng/mL por 4h.

Como visto, o EEGP de *M. quadrifasciata* não exibiu efeito citotóxico quando testado nas concentrações 0,1; 1,0 e 10 µg/mL, quando comparado ao controle de meio de cultura em uma faixa de 10 µg/mL a 1000 µg/mL ($p > 0,05$). No entanto, as células tratadas com o extrato na concentração mais alta (25 µg/mL) apresentou viabilidade diminuída em comparação ao controle, sendo assim, foi utilizado a concentração de 10 µg/mL para verificar a atividade anti-inflamatória do EEGP com base na liberação da citocina TNF- α pelos macrófagos estimulados com LPS. Como pode ser observado na Figura 3B, o EEGP foi capaz de inibir a produção de TNF- α na concentração de 10 µg/mL apresentando uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle sem EEGP.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida em várias doenças inflamatórias, como artrite, doenças autoimunes e certos tipos de câncer, sendo que a própolis tem sido amplamente estudada devido às suas propriedades anti-inflamatórias (Franchin *et al.*, 2012; Da Cunha *et al.* 2016). Diversos compostos presentes na própolis, como flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides, têm sido associados a esses efeitos. Essas substâncias podem modular a resposta imunológica e inibir a produção de citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- α .

Entre os compostos presentes no EEGP, um que se destaca é o ácido jasmônico (composto 9), que, segundo DANG *et al.* (2008), apresentou atividade anti-

inflamatória inibindo a produção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EEGP DE *M. QUADRIFASCIATA* CONTRA DIFERENTES LINHAGENS MICROBIANAS

A atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato de geoprópolis de *M. quadrifasciata* analisado no presente trabalho encontra-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana e antimicrobicida *in vitro* do EEGP de *M. quadrifasciata*.

	Cepas	EEGP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		CIM	CMM
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	125 - 250	1000 - 2000
	<i>Bacillus cereus</i>	N.A	N.A
	<i>Listeria innocua</i> CLIST 2050	N.A	N.A
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 2035	N.A	N.A
Gram-negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	N.A	N.A
	<i>Salmonella typhimurrium</i>	N.A	N.A
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	N.A	N.A
Levedura	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	250 - 500	N.A

Fonte: Autor

Nota: CIM (Concentração Inibitória Mínima), CMM (Concentração Microbicida Mínima) e N.A (Não ativo nas concentrações testadas).

O EEGP de *M. quadrifasciata* apresentou melhores resultados de inibição contra *S. aureus* (125–250 µg/mL) e *C. albicans* (250-500 µg/mL). Valores de MIC para *E. coli*, *L. innocua*, *B. cereus*, *L. monoeytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. typhimorrium* não foram encontrados nas concentrações testadas no presente trabalho (> 2.000 µg/mL).

O resultado da CIM para *S. aureus* foi inferior ao obtido por Rubinho et al. (2016) em que a inibição foi de 62,5-125 µg/mL, do EEGP de *M. quadrifasciata* coletada no Sul de Minas Gerais, porém resultado foi superior para *C. albicans*, (>1000). Também apresentou resultado inferior a atividade contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurrium*. Porém obteve valor aproximado a da própolis vermelha contra *S. aureus* ATCC 25923, onde os valores avaliados por Cabral et al., (2009) variaram de 62,5 a 125 µg/mL.

Para se ter um perfil completo de atividade antimicrobiana, foram realizados testes para determinação de CMM do EEGP avaliado (Tabela 5). Os resultados de CBM para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* variou de 1000 a 2.000 µg/mL. Valor diferente ao de Rubinho et al., (2016) que foi 250-500 µg/mL.

O extrato bruto de qualquer produto natural que apresente CIM inferior a 500 µg/mL é promissor e merece mais investigações para elucidar sua composição química e possíveis mecanismos de ação (DUARTE, et al., 2007). A atividade antibacteriana da geoprópolis de *M. quadrifasciata* foi maior contra bactérias Gram-positivas, e pode estar relacionada à presença de flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos na sua composição. Esses compostos têm efeitos nas paredes celulares desses microrganismos através de um mecanismo ainda não conhecido (BANKOVA, et al., 1999). Dado que as bactérias Gram-negativas possuem duas membranas plasmáticas, a externa cobrindo a parede celular, podemos levantar a hipótese de que os ácidos fenólicos do EEGP não conseguiram penetrar na membrana externa e, portanto, não foram capazes de atingir seu alvo. Como as bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa (BROWN, L. et al., 2015), o EEGP não poderia agir contra sua parede celular.

Portanto, os valores de CIM registrados para o EEGP de *M. quadrifasciata* testada neste estudo demonstram que são compostos antimicrobianos promissores. Embora a variante de EEGP aqui testada tenha sido coletada em outra região e sua composição química seja diferente das própolis brasileiras, ela possui potencial antimicrobiano, e, portanto, merecem atenção em uma futura prospecção de seus

compostos ativos.

5.8 TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO* EM MODELO DE *GALLERIA MELLONELLA*

Foram analisadas diferentes concentrações do extrato etanólico de geoprópolis de *M. quadrifasciata*, utilizando o modelo *in vivo* de larvas da espécie *G. mellonella*, conforme mostrado na Figura 5.

Fotografia 5 - Larvas de *G. mellonella* para indicação de toxicidade *in vivo*.

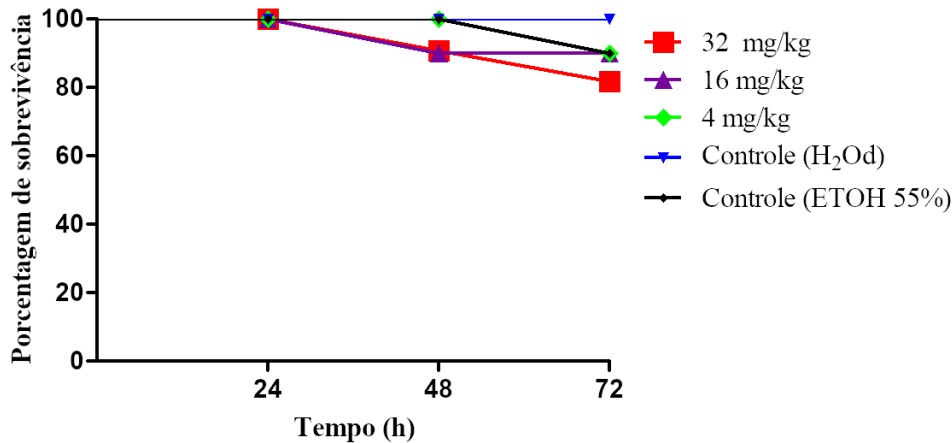


Fonte: Autor

Nota: **A-** larva melanizada e morta, evidenciando toxicidade ao composto e **B-** larva viva e com aspecto normal saudável, efeito citotóxico não evidenciado.

Foram analisadas diferentes concentrações do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata*, diluída em etanol 55% (maior concentração etanólica que não apresentou toxicidade para a condução do ensaio), utilizando o modelo *in vivo* de larvas da espécie *Galleria mellonella*, conforme descrito na Figura 3.

Figura 4 - Toxicidade sistêmica do EEGP em modelo de larvas de *G. mellonella*.



Fonte: Autor.

Nota: Dose 32 mg/kg⁻¹ de larva (800 µg/mL), 16 mg/kg de larva (400 µg/mL) e 4 mg/kg de larva (100 µg/mL).

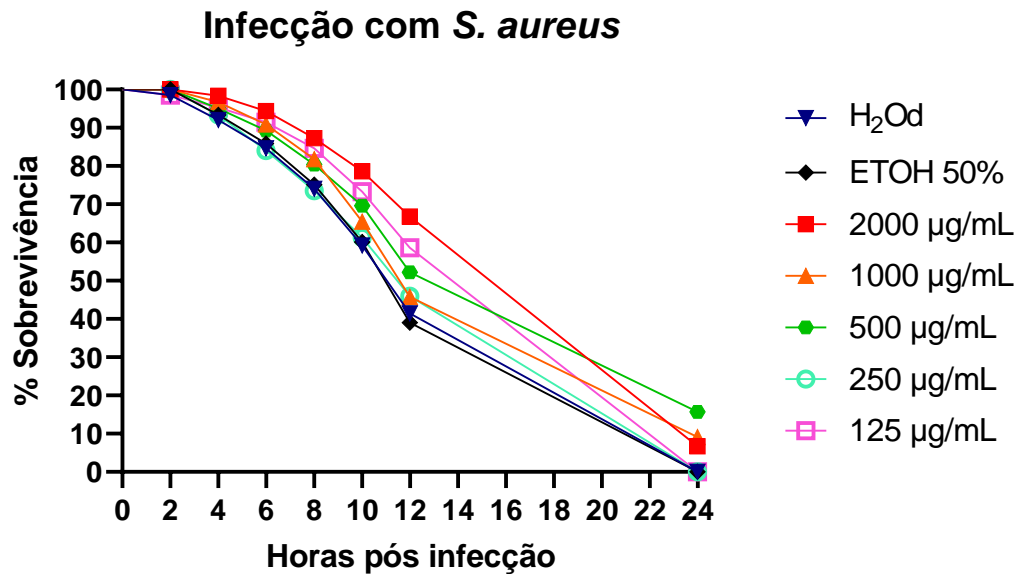
O EEGP de *M. quadrifasciata* aplicado nas larvas de *G. mellonella* nas concentrações de 32 mg/kg de larva (800 µg/mL), 16 mg/kg de larva (400 µg/mL) e 4 mg/kg de larva (100 µg/mL) e o veículo não apresentaram efeito tóxico significativo após um período de 72h comparado ao controle.

Os dados mostraram que *G. mellonella* é um modelo eficaz para avaliação de toxicidade *in vivo* e que o EEGP estudado não apresentou efeito tóxico nas concentrações testadas.

5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VIVO* EM MODELO DE *G. MELLONELLA* DO EEGP.

A atividade antimicrobiana *in vivo* em modelo de *G. mellonella* foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.7.3 e os resultados estão apresentados na Figura 4.

Figura 5 - Determinação da atividade antimicrobiana *in vivo* em modelo de *G. mellonella* do EEGP em diferentes doses.



Nas primeiras duas horas após iniciar o experimento é possível notar que a porcentagem de sobrevivência não foi alterada pela infecção bacteriana. Porém após 12 horas de infecção a sobrevivência das larvas não tratadas cai para abaixo de 40%, enquanto a sobrevivência das larvas tratadas é maior quanto maior da concentração do EEGP demonstrando que a geoprópolis, em combinação com o sistema imune da larva, consegue retardar o efeito da infecção nos insetos tratadas. Após 24 horas decorrido o início da infecção, a concentração que apresentou maior porcentagem de sobrevivência foi a 500 µg/mL.

A atividade antimicrobiana do EEGP pode estar relacionada à presença de compostos identificados no extrato, tais como ácido cumárico, ácido jasmônico e naringenina que são compostos descritos na literatura como possuidoras de atividade antimicrobiana, conforme discutido anteriormente. E uma possível explicação para que a concentração de 500 µg/mL tenha apresentado a melhor porcentagem de sobrevivência após 24h de infecção pode estar relacionado à toxicidade do próprio EEGP nas concentrações de 1000 e 2000 µg/mL, o que ocasionou uma menor porcentagem de sobrevivência nessas concentrações.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu avaliar a composição química e identificar o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antibacteriano da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata*, bem como a sua toxicidade em modelo de *G. mellonella*.

Compostos entre as quais, naringenina, artemisina, ácido jasmônico, ácido cumárico, entre outros fenólicos, foram identificados no EEGP por LC-ESI-QTOF.

O EEGP destacou-se por apresentar atividade anti-inflamatória atuando na diminuição da produção de TNF- α na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ do EEGP e uma relativa atividade antioxidante dependendo da metodologia empregada.

Além disso, exibiu atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus* com concentração inibitória entre 125 a 250 $\mu\text{g/mL}$ e contra a levedura *C. albicans* apresentando CIM de 250 a 500 $\mu\text{g/mL}$.

O EEGP não apresentou toxicidade no modelo *in vivo* de *G. mellonella* nas doses testadas e quando foi testado a atividade antimicrobiana *in vivo* usando o mesmo modelo, verificou-se que o EEGP consegue retardar a morte das larvas após 12h de infecção por xxxxx, na concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, D.S. A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2010. 161 p.
- ALENCAR, S.M *et al.*, Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J Ethnopharmacol**, v. 113, p. 278–283. 10.1016/j.jep.2007.06.005. 2007.
- AL - HATAMLEH, M. A. I. *et al.* Antioxidant - based medicinal properties of stingless bee products: Recent progress and future directions. **Biomolecules**, v. 10, p. 923, 2020.
- AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F. & CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. **Journal of Natural Products**. vol. 64. pp. 235-240. 1994.
- ANDREA, A. *et al.* Methods and Challenges of Using the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) as a Model Organism in Antimicrobial Compound Discovery. **Microorganisms**. v. 7(3) p.85. doi: 10.3390/microorganisms7030085. PMID: 30893839; PMCID: PMC6463077. Mar 19; 2019.
- ANTONINI, Y. *et al.* Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponina) in an urban forest fragment. **Braz J Biol**.<https://doi-org.ez37.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S1519-69842006000300012>. 2006.
- ARNAO, M.B., Cano, A. and Acosta, M. The Hydrphilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 73, 239-244, 2001.
- AVILA, S. *et al.* Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Res. Int.** v. 123, p. 1–10. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.068. 2019.
- AYOUB, H. M.; MCDONALD, M. R.; SULLIVAN, J. A.; TSAO, R.; PLATT, M.; SIMPSON, J.; MECKLING, K. A. The effect of anthocyanin-rich purple vegetable diets on metabolic syndrome in obese Zucker rats. *J. Med. Food*, 20, 1240– 1249, 2017.
- AZIZ, M.S.A. *et al.* Pancreatoprotective effects of *Geniotrigona thoracica* stingless bee honey in streptozotocin-nicotinamide-induced male diabetic rats. **Biomed. Pharmacother.** v. 89, p. 135–145, 2017.
- BALASUNDRAM, N. *et al.* Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chem.** v. 99, p. 191– 203. 2006.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y. & KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v.15, pp. 561-571. 2001.

BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361 – 367, 1998.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, p. 190–193. 1999.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v.5, p. 493– 506, DOI: 10.1038/nrd2060. 2006.

BAO, T.; XU, Y.; GOWD, V.; ZHAO, J.; XIE, J.; LIANG, W.; CHEN, W. Systematic study on phytochemicals and antioxidant activity of some new and common mulberry cultivars in China. **J. Funct. Foods**, v. 25, p. 537– 547, 2016.

BARBOZA, J. R. et al. Cytotoxicity and pro - apoptotic, antioxidant and anti - inflammatory activities of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Biology**, v. 9(9), p. 292, 2020.

BARTOLOMEU, A.R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomed. Pharmacother.* v. 81, p.48–55, 2016.

BONAMIGO, T. et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxid. Med. Cell. Longev.** v. 2017, p.1038153. doi: 10.1155/2017/1038153. 2017.

BOO Y.C. p-Coumaric Acid as An Active Ingredient in Cosmetics: A Review Focusing on its Antimelanogenic Effects. **Antioxidants**, 4;8(8):275, 2019.

BORGES, K.S. et al. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genet. Mol. Biol.** v.34, p.310–314. doi: 10.1590/S1415-47572011000200024, 2011.

BOZ, H. p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. **Internat. J. Food Sci. Technol.**, 50, 2323–2328, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa n. 3 de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União**, 2001.

BROWN, L. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, p. 620-30, 2015.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chem. Toxicol.**, v.36, pp. 347-363, 1998.

CAMPOS, J.F. et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí) **Evid.-Based**

Complement. Altern. Med. v.2015, p.1–11. doi: 10.1155/2015/296186. 2015.

CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim Nova.** v. 32, p. 1523–1527. 10.1590/S0100-40422009000600031. 2009.

CINEGAGLIA, N.C. et al. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells In Vitro. **Evid.-Based Complement. Altern. Med.** v. 2013, p. 1–6. doi: 10.1155/2013/737386, 2013.

CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry** , v. 127(2) , p. 419 - 426 . 2011.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4^a ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute** , 2017.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute** , 2018.

CORTOPASSI - LAURINO, M. et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie** , v. 37, n. 2, p. 275 – 292, 2006.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et bio- physica acta.* 2013; 1830(6):3670 – 95. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.008 PMID: 23428572 ; PubMed Central PMCID: PMC3672862

DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine** , v. 13, n. 1, 2013a.

DA CUNHA, M. G. et al. Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. **Evidence - based Complementary and Alternative Medicine** , v. 2013, 2013b.

DA CUNHA, M. G. et al. Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris* . **Planta Medica** , v. 82, n. 3, p. 190 – 194, 2016a.

DA CUNHA, M. G. et al. Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent - nemorosone from Brazilian geopropolis. **Journal of Functional Foods** , v. 26, p. 27 – 35, 2016b.

DA CUNHA, M. G. et al. Effects of Cinnamoyl Oxy-mammeisin from Geopropolis on Osteoclast Differentiation and *Porphyromonas gingivalis* - Induced Periodontitis. **Journal of Natural Products** , v. 80, n. 6, p. 1893 – 1899, 2017.

DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial, anti - adherence and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of a 4 - phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian

geopropolis. **Microbial Pathogenesis** , v.139, p. 103855, 2020.

DA SILVA, E.C.C. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**. v.36, p.628–633. doi: 10.1590/S0100-40422013000500003, 2013.

DANG H. T., LEE, H. J., YOO, E. S., HONG, J., BAO, B., CHOI, J. S., JUNG, J. H. New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents. **Bioorg Med Chem.**,15;16(24), 2008.

DE SOUZA, S. A. et al. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra) **Phytochem. Anal.** v.29, p. 549–558. doi: 10.1002/pca.2766, 2018.

DE SOUSA-FONTURA, D.M.N. et al. Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.30, p.367–373. doi: 10.1007/s43450-020-00030-8, 2020.

DE SOUZA, D.M.N. Phytochemical screening, in vitro toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bee's geopropolis. **Acta Veter. Bras.** v.9, p.134–140. doi: 10.21708/avb.2015.9.2.4784, 2015.

DHARMARAJA, A.T. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria. **J. Med. Chem.** v. 60, p. 3221–3240. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01243. 2017.

DZIALO, M. et al. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, p. 160. doi: 10.3390/ijms17020160. 2016.

DOS SANTOS, C.M et al. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata* anthidioides. **Oxidative Med. Cell. Longev.** p.1–13. doi: 10.1155/2017/8320804, 2017.

DUTRA, R.P et al. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. **J. Agric. Food Chem.** v.62, p.2549 -2557. doi: 10.1021/jf404875v, 2014.

DUTRA, R.P. et al. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Rev. Bras. Farm.** v.29, p.287–293. doi: 10.1016/j.bjp.2019.02.009, 2019.

DUARTE, M.C. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **J. Ethnopharmacol.** v. 111(2), p. 197-201. doi: 10.1016/j.jep.2006.11.034. Epub 2006 Dec 3. PMID: 17210236. 2007.

FERREIRA J.M et al. Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** v. 2017, p.1–6. doi: 10.1155/2017/4024721, 2017.

FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-

camu fruit (*Myrciaria dubia*) **Food Chem.** v. 139, p. 578– 588. 2013.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL - 1 β and TNF - α . **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, n. 2, p. 709 – 715, 2012.

FRANCHIN, M. et al. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, p. 907041, 2013.

FRANCHIN, M. et al. Cinnamoyloxy-mammeisin Isolated from Geopropolis Attenuates Inflammatory Process by Inhibiting Cytokine Production: Involvement of MAPK, AP - 1, and NF - κ B. **Journal of Natural Products** , v. 79, n. 7, p. 1828 – 1833, 2016.

GALGOWSKI, C. et al. Mollicute Anti-Adhesive and Growth Inhibition Properties of the Methanolic Extract of Propolis from the Brazilian Native Bee *Melipona quadrifasciata*. **Biodiversity**, v.18, Issue 1. e2000711. 2021.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**. Vol.60, pp. 59-84. 1979.

IGNASIAK, K. & MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes** , v. 10, p. 428, (2017).

ISDM. Guia Ilustrado das Abelhas “Sem Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tefé. ISDM. 267 p. 2013.

ISPN. Manual de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas sem Ferrão. 2ª Edição. 2018. Disponível em: <https://ispn.org.br/produtos-das-abelhas-sem-ferrao-manual-de-aproveitamento-integral-2a-edicao/>. Acesso 26 jan. 2022.

ISBN: 978-85-7601-912-1. WALDSCHMIDT, A. M.; CAVALCANTI, P.S.; ALVES, R.M.O. Criação de Abelhas Nativas sem Ferrão: Uruçu, Mandaçaia, Jataí e Iraí. In: Viçosa. 131 p. 2021. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/cursos-criacao-deabelhas/criacao-de-abelhas-nativas-sem-ferrao-urucu-mandacaia-jatai-e-irai>. Acesso em : 27 jan. 2022.

JAROCKA-KARPOWICZ I, MARKOWSKA A. Therapeutic Potential of Jasmonic Acid and Its Derivatives. **Int. J. Mol. Sci.**, 5;22(16):8437, 2021.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, v.21, pp. 221-228. 2001.

KUJUMGIEV, A.; TASVETKTOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. & POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 64. pp. 235-240. 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T. & NAKAYMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, **Food Chemistry**, Volume 84, Issue 3, 2004, Pages 329-339, ISSN 0308-8146, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4).

LIBERIO, S.A. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complement. Altern. Med.** v.11. p.108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108. 2011.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa-SP: **Instituto Plantarum**, 544 p. 2002.

MAGUIRE, R. et al. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. **Cell Biology and Toxicology**, v. 32 , 209 – 216, 2016.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**. v.50c, pp. 93-97. 1995.

MELO, P. S. et al. Winery by - products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v.181, p. 160 - 169, 2015.

MOERMAN, D.E. Plantas medicinais da américa nativa. Museu de Antropologia da Universidade de Michigan; **Ann Arbor**, MI: 1986.

MÜLLER, L. et al. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **LWT - Food Science and Technology** , v. 43, n. 6, p. 992 – 999, 2010.

OLIVEIRA, L.P.G. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sci.** v. 217, p.81–90. doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.060. 2019.

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.

PEREIRA , T. C. et al. Advances in the Use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **Journal of Fungi** , 4(4), p. 128, 2018.

PEREIRA,M.F. et al. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application, **Pathogens and Disease**, v.78, Issue 8. ftaa056, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa056>, 2020.

PIATEK, M. et al. *Galleria mellonella*: The Versatile Host for Drug Discovery, *In Vivo* Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10 (12), p. 1545. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121545>. 2021.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestração do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências , p. 1 – 6, 2017.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química**

Nova, v. 25, n. 1, p. 45 – 61, 2002.

POPOVA, M. et al. Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. **Phytomedicine**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153098>

RAMARAO , N. et al. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis . **Journal of Visualized Experiments**, v. 70, e4392, 2012.

RANNEH, Y. et al. Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2, NF-kappaB and p38 MAPK. **Nutr. Metab.** v. 16, p. 15. doi: 10.1186/s12986-019-0341-z. 2019.

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 antiproliferative effects. **Natural Product Research** , 34:21, 3139 - 3144, (2020).

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192 – 1199, 2016.

SARDI, J. C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia spp.* **Microbial Pathogenesis** , v. 105, p. 280 – 287, 2017.

SARTORI, G.A.; SPADA, F.P.; RIBEIRO, V. P.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; BASTOS, J.K. & de ALENCAR, S. M. (2021). An insight into the botanical origins of propolis from permanent preservation and reforestation areas of southern Brazil. **Scientific reports**, 11(1), 22043. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01709-1>.

SILVA, W. P.; LIMA, J. R.; PAZ, D. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on-line** , v. 10, n. 3, p. 146 – 152, 2012.

SILVEIRA, M. D. A. et al. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP - AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID - 19 patients: A randomized, controlled clinical trial. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 138, 111526, 2021.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152 – 178, 1998.

SOUSA J.P.L.D.M. et al. Chemical and Antimicrobial Potential Study of Brazilian Propolis Produced by Different Species of Bees. **Rev. Virtual Química**. v. 11, p.1480–1497. doi: 10.21577/1984-6835.20190103. 2019.

SUREK, M. et al. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **J.**

Ethnopharmacol. v.269, p.113662. doi: 10.1016/j.jep.2020.113662, 2021.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE** , v. 11, n. 11, p. 1 – 11, 2016.

TOLEDO, K. Benefício Mútuo: ganho de produtividade com polinização por abelhas representa 10% do valor da produção agrícola mundial. **Revista Pesquisa FAPESP online**, São Paulo, v. 218, p. 70-73, abril 2014. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/beneficio-mutuo/>. Acesso em: 26 jan. 2022.

TSAI, C, J, Y. et al. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, p . 214 - 229, 2016.

VELIKOVA, N. et al. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for studying the virulence of *Streptococcus suis*. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 291 , 2016.

VIEGAS, C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326 – 337, 2006.

Vinetz JM, Clain J, Bounkeua V, Eastman RT, Fidock D. Chemotherapy of malaria. In: Brunton LL, editors. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. New York: **The McGraw-Hill Companies**, p. 1383–418. 2011.

YOSRI, N. et al. Anti-Viral and Immunomodulatory Properties of Propolis: Chemical Diversity, Pharmacological Properties, Preclinical and Clinical Applications, and In Silico Potential against SARS-CoV-2. **Foods**. v.10, p.1776. doi: 10.3390/foods10081776. 2021.

WANG, L.; MINESHITA, S.; GA, I.; SHIGEMATSU, T. & MATSUNO, T. Antiinflammatory effect of propolis. **Japanese Journal of Pharmacological Therapeutics**. v. 24, pp. 223-224. 1993.

WOISKY, R. G. & SALATINO A. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. v.37(2), p.99 - 105, 1998.