



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI-UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS
DA ABELHA NATIVA TUBI, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE,
1807) FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Listeria monocytogenes*,
Staphylococcus aureus, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli***

Nilson dos Santos Loiola

Lajeado/ RS, novembro de 2020

Nilson dos Santos Loiola

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS DA ABELHA NATIVA TUBI, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807) FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Desenvolvimento, na linha de pesquisa Tecnologia e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr Eduardo Miranda Ethur

Lajeado/RS, novembro de 2020

Nilson dos Santos Loiola

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS DA ABELHA NATIVA TUBI, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807) FRENTE ÀS BACTÉRIAS *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Desenvolvimento, na linha de pesquisa Tecnologia e Ambiente:

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur – Orientador
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dra. Simone Stülp
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dra. Alessandra Nejar Bruno
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS

Prof. Dra. Carla Kauffmann
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Lajeado/ RS, 25 de novembro de 2020

Dedico este trabalho ao meus avós paternos Edézia de Souza Pinto (em memória) e Hozano Loiola Pinto (em memória) em gratidão por todos os ensinamentos. Aos meus pais, minhas irmãs Izabela dos Santos Loiola e Daniella dos Santos Loiola por acompanharem essa caminhada e em especial ao meu sobrinho Heitor Loiola Araújo, pelas alegrias proporcionadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento da UNIVATES pelos ensinamentos e vivências.

Ao professor Dr Eduardo Miranda Ethur pela calma, serenidade e domínio.

A Ani Caroline Weber, bolsista de iniciação científica da UNIVATES, por todo apoio nas atividades laboratoriais.

A grande amiga Dr^a Antonia Amanda Cardoso de Almeida (pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI) e sua colega de trabalho Msc. Layana Karine Farias Lima (pesquisadora do Laboratório de Produtos Naturais e de Neuroquímica Experimental da UFPI), pelas contribuições para a caracterização da própolis.

Ao meliponicultor Wilson Amorim Mello, pela receptividade e confiança.

A minha família do coração, Alane, Thiago, Heloisa, Clarice, Kássia, Aline e Salatiel, por todas as conversas, companheirismo, vinhos e devaneios.

Aos meus colegas de curso, Gabriela e Maurício, por tornar tudo bem mais agradável.

A todos que estiveram por perto nessa trajetória e que, de alguma forma, tentaram me acalmar.

E, em especial, a Deus, por toda proteção e discernimento.

RESUMO

A própolis é um produto natural oriundo das atividades das abelhas e que vem sendo utilizado na fitoterapia e em pesquisas por decorrência de seu potencial antimicrobiano, antifúngico, antiprotozoário, antiviral, além de seu reconhecido potencial antioxidante. Ela é um produto de composição variável com destaque para a própolis formada pelo grupo das meliponinas ou abelhas sem ferrão, e que tem despertado interesse científico pois a diversidade e riqueza de compostos bioativos constituintes desse recurso natural lhe conferem propriedades úteis à indústria bem como à saúde. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do extrato etanólico da própolis da abelha nativa *Scaptotrigona affinis postica*, criada em meliponário da cidade de Barra do Corda – MA, frente as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*, como uma possibilidade de uso de um recurso natural eficaz no controle dessas bactérias e malefícios associados a ocorrência delas. A própolis bruta e o extrato etanólico da própolis foram caracterizadas sensorialmente quanto a sua consistência, coloração, sabor e granulometria. As características físico e químicas avaliadas, tanto para a própolis bruta como para o extrato etanólico da própolis (EEP) foram o teor de umidade, teor de cinzas, teores fenólicos, com base no Equivalente de Ácido Gálico (EAG), e de flavonoides totais, com base no Equivalente de Quercetina (QE), que foram quantificados e extrapolados em curva padrão de ácido gálico e quercetina (respectivamente), além da determinação do seu índice de oxidação. A avaliação do potencial antimicrobiano foi realizada por meio da técnica de Difusão em Disco, sendo utilizado como padrão antibacteriano o ciprofloxacino a 60 µg/mL, além da testagem do EEP nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL. Os teores médios de fenólicos totais foram de 1,54% e 2,10% mg de EAG/100 g para testes com as concentrações de 1 mg/mL e de 2 mg/mL de própolis bruta, respectivamente, e 1,42% e 2,70% mg de EAG/100 g para testes com as concentrações de 1 mg/mL e de 2 mg/mL de extrato etanólico da própolis, respectivamente. Os teores médios de flavonoides totais encontrados foram de 7,15% e 13,09% mg de QE/100 g para testes com as concentrações de 1 mg/mL e de 2 mg/mL de própolis bruta, respectivamente, e 13,08% e 26,46% mg de QE/100 g para testes com as concentrações de 1 mg/mL e de 2 mg/mL de extrato etanólico de própolis, respectivamente. As amostras de própolis apresentaram um índice de oxidação médio de 7s para os testes com extrato etanólico de própolis e de 3s para os testes com a própolis bruta. Os resultados indicam que as amostras de própolis e de seu extrato etanólico, coletadas em Barra do Corda – MA, apresentam teores de fenólicos e flavonoides que lhe conferem algum

potencial antioxidante e anti-inflamatório no entanto, apesar de ser atribuído ao propólis atividade antimicrobiana, no presente estudo esta não foi observada uma vez que as amostras de EEP nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL não tiveram ação antimicrobiana frente os microrganismos testados, requerendo mais estudos e caracterizações que contribuam para o conhecimento desse produto natural.

Palavras-chave: Meliponinas. Própolis. Antimicrobiano

ABSTRACT

Propolis is a natural product derived from the activities of bees and has been used in herbal medicine and research due to its antimicrobial, antifungal, antiprotozoal, antiviral potential, in addition to its recognized antioxidant potential. It is a product of variable composition with emphasis on the propolis formed by the group of meliponins or stingless bees, and which has aroused scientific interest because the diversity and richness of bioactive compounds that make up this natural resource give it useful properties for industry as well as health. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of the ethanol extract of propolis from native bee *Scaptotrigona affinis postica*, raised in a meliponary of the city of Barra do Corda - MA, against the bacteria *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*, as a possibility of using an effective natural resource to control these bacteria and harms associated with their occurrence. The raw propolis and the ethanol extract of propolis were sensorially characterized in terms of consistency, color, flavor and granulometry. The physico and chemical characteristics evaluated, both for crude propolis and for the ethanol extract of propolis (EEP), were the moisture content, ash content, phenolic, based on Gallic Acid Equivalent (GAE), and total flavonoid contents, based on Quercetin Equivalent (QE), which were quantified and extrapolated in a standard curve of gallic acid and quercetin (respectively), in addition to determining its oxidation index. The evaluation of the antimicrobial potential was performed using the Disc Diffusion technique, with ciprofloxacin at 60 µg/mL being used as an antibacterial standard, in addition to testing the EEP at concentrations of 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL and 2 mg/mL. The average levels of total phenolics were 1.54% and 2.10% mg of EAG/100 g for tests with the concentrations of 1 mg/mL and 2 mg/mL of crude propolis, respectively, and 1.42% and 2.70% mg of EAG/100 g for tests with the concentrations of 1 mg/mL and 2 mg/mL of ethanol extract of propolis, respectively. The average levels of total flavonoids found were 7.15% and 13.09% mg of QE/100 g for tests with the concentrations of 1 mg/mL and 2 mg/mL of crude propolis, respectively, and 13.08% and 26, 46% mg of QE/100 g for tests with concentrations of 1 mg/mL and 2 mg/mL of ethanol extract of propolis, respectively. The propolis samples had an average oxidation index of 7s for tests with ethanol extract of propolis and 3s for tests with crude propolis. The results indicate that the samples of propolis and its ethanolic extract, collected in Barra do Corda - MA, have levels of phenolics and flavonoids that give it some antioxidant and anti-inflammatory potential, however, despite being attributed to propolis an antimicrobial activity, in the present study this was not observed since the EEP samples at concentrations of 0.25; 0.5; 1 and 2 mg /

mL had no antimicrobial action against the tested microorganisms, requiring further studies and characterizations that contribute to the knowledge of this natural product.

Keywords: Meliponins. Propolis. Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Abelha Tubi, <i>Scaptotrigona aff. postica</i> (LATREILLE, 1807).....	28
Figura 2 – Favos de cria da espécie <i>Scaptotrigona aff. postica</i> (LATREILLE, 1807)	32
Figura 3 – Chegada das abelhas com pólen da flor da cajazeira nas corbículas.....	32
Figura 4 – Fluxograma de uso da própolis pelas abelhas	33
Figura 5 – Estrutura química da Quercetina.....	39
Figura 6 – Localização do Meliponário/ Barra do Corda – MA	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de calibração do ácido gálico pelo método de espectrofotometria UV/Vis	71
Gráfico 2 – Curva de calibração da quercetina pelo método de espectrofotometria UV/Vis	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Requisitos físicos e químicos para identidade da própolis bruta e para o extrato alcoólico de própolis (BRASIL, 2001)	35
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de umidade e teor de cinzas médios do extrato etanólico de própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020, expressos em média e desvio padrão, em função de padrões de qualidade nacional	70
Tabela 2 – Teor de umidade e teor de cinzas médios da própolis bruta de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020, expressas em média e desvio padrão, em função de padrões de qualidade nacional	70
Tabela 3 – Teores de fenólicos e flavonoides totais presentes no extrato etanólico de própolis de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020	72
Tabela 4 – Teores de fenólicos e flavonoides totais presentes na própolis bruta de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020.....	73
Tabela 5 – Atividade de oxidação do extrato etanólico de própolis e da própolis bruta de <i>Scaptotrigona aff. postica</i> , Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020, expressos em média e desvio padrão, em função de padrões de qualidade nacional.....	74
Tabela 6 – Média e desvio padrão dos halos de inibição bacteriana dos grupos experimentais em mm frente a <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Escherichia coli</i> (N = 3)	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Abreviação para Antes de Cristo
Aff.	Abreviação de Affinis. Terminologia taxonômica utilizada para indicar que uma espécie é relacionada mas não idêntica a espécie do binômio identificado
ANOVA	Análise Estatística de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CAPE	Éster fenetílico do ácido cafeico
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	<i>Colony Collapse Disorder</i> / Síndrome do Colapso das Colônias
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
d.C.	Abreviação para Depois de Cristo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EBP	Extrato bruto de própolis
EEP	Extrato etanólico de própolis
GL	Grau Gay Lussac
HeLa	Carcinoma cervical humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
MDD	Método da Difusão em Disco
mg	Miligrama
MH	Ágar Müller Hinton

MIC	Concentração Inibidora Mínima
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
PGRSS	Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviços em Saúde
QE	Equivalente de Quercetina
RS	Rio Grande do Sul
Spp.	Abreviatura para várias espécies ainda não identificadas
TMZ	Temozolomide
TSA	Ágar triptona de soja
TSA	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana
TSB	Caldo triptona soja
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µL	Micro litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Fitogeografia de Barra do Corda – MA	21
2.2	Abelha Tubi, <i>Scaptotrigona aff. postica</i> (LATREILLE, 1807).....	23
2.3	A construção social das colônias	24
2.4	A Meliponicultura.....	25
2.5	Biologia das Meliponinas	27
2.6	A própolis	31
2.7	Propriedades biológicas da própolis	35
2.7.1	Atividade antimicrobiana	37
2.7.2	Atividade antioxidante	38
2.7.3	Atividade anti-inflamatória.....	41
2.7.4	Atividade citotóxica	41
2.7.5	Demais atividades biológicas.....	43
2.8	Grupos microbianos testados	45
2.8.1	Listeria monocytogenes	45
2.8.2	Staphylococcus aureus	47
2.8.3	Streptococcus mutans.....	48
2.8.4	Escherichia coli	49
3	METODOLOGIA	51
3.1	Classificação da pesquisa.....	51
3.2	Local da pesquisa	52
3.3	Instrumentos da pesquisa	53

3.4	Coleta das amostras de própolis.....	54
3.5	Análises físico-química e microbiológicas com própolis.....	55
3.5.1	Obtenção do Extrato Etanólico da Própolis (EEP)	55
3.5.1.1	Diluição dos extratos.....	56
3.5.2	Caracterização sensorial da Própolis Bruta e EEP	56
3.5.3	Caracterização físico-química de EEP e da Própolis Bruta	56
3.5.3.1	Determinação do teor de umidade para amostras de EEP e Própolis Bruta.....	56
3.5.3.2	Análise do teor de cinzas para amostras de EEP e Própolis Bruta.....	58
3.5.3.3	Determinação do teor de fenóis totais para amostras de EEP e Própolis Bruta.....	59
3.5.3.4	Determinação do teor de flavonoides totais para amostras de EEP e Própolis Bruta.....	59
3.5.3.5	Determinação do índice de oxidação para amostras de EEP e Própolis Bruta.....	60
3.5.4	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco de Difusão para amostras de EEP e Própolis Bruta.....	61
3.5.4.1	Preparo da suspensão microbiana (Inóculo).....	62
3.5.4.2	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana/ Método de Disco-Difusão (MDD) ..	62
3.5.4.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	64
3.5.4.4	Substância empregada como padrão antimicrobiano	64
3.5.4.5	Controle do diluente	65
3.6	Tratamento estatístico dos dados	65
3.7	Tratamento do material microbiológico	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
4.1	Características sensoriais da Própolis Bruta e do EEP.....	68
4.2	Teor de umidade e cinzas	68
4.3	Teor de fenólicos e flavonoides totais	70
4.4	Determinação do Índice de Oxidação do EEP e da Própolis Bruta.....	74
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana	75
5	CONCLUSÃO	79
6	PERSPECTIVAS PARA NOVOS TRABALHOS.....	81
7	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

As abelhas (Hymenoptera: Apoidea) são insetos com peças bucais especializadas em sugar e mastigar, que passam por metamorfose completa (ovo – larva – pupa – adulto voador), alimentam-se de néctar e pólen (fontes de proteínas, principalmente para o crescimento das larvas) e vivem muito bem numa sociedade permanente com diversos indivíduos separados por castas (operárias, zangões e rainha). Dentro do grupo, cada casta se encarrega de uma atividade em que a rainha se dedica à postura das novas crias, os zangões fecundam as novas rainhas e as milhares de operárias constroem e guardam a colmeia, se encarregam da alimentação da sociedade, obedecem à rainha, são responsáveis pela criação dos membros jovens, além de coletarem resinas da flora entorno para cimentar e fechar fendas na colmeia, protegendo do vento, umidade ou mesmo da entrada de invasores (STORER et al., 1991).

Estudos sobre as abelhas bem como dos produtos inerentes ao nicho ecológico desses insetos são de extrema importância para o entendimento do meio natural e da conservação da biodiversidade local, não só pelos benefícios agregados ao mel, mas também pelo serviço ambiental prestado através da polinização e manutenção dos ecossistemas naturais. Além disso, desempenham papel fundamental na agricultura e na produção de alimentos que, segundo estimativas, um terço da alimentação humana é resultado direto e/ou indireto da polinização realizada pelas abelhas (VILLAS-BÔAS, 2018).

As abelhas encontram-se reunidas dentro da superfamília Apoidea que integra as famílias Adrenidae, Colletidae, Dasypodidae, Halictidae, Megachilidae, Meganomiidae, Melittidae, Stenotritidae e Apidae, compreendendo cerca de 20.000 espécies de abelhas pelo mundo, boa parte dessas estando presentes no Brasil, como é o caso da abelha Tubi, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807), objeto deste trabalho (PIANARO, 2012).

Assim como a *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807), as abelhas nativas do Brasil são alvo de importantes estudos, uma vez que fomentam a meliponicultura (criação de abelhas nativas), os métodos tradicionais de manejo das mesmas, a viabilidade de geração de emprego e renda, além das práticas de conservação dos ecossistemas envolvidos nessa atividade.

De modo geral, as abelhas se classificam em: solitárias (aproximadamente 80% das espécies), cuja fêmea cria e cuida sozinha do ninho e acaba morrendo antes das proles nascerem, inviabilizando o contato entre gerações; parasitárias (aproximadamente 15% das espécies) com fêmeas que fazem uso de células de cria de outras espécies para ovopositar e suas larvas, ao nascerem, se alimentam dos nutrientes disponíveis no hábitat invadido, levando as larvas da colmeia hospedeira à morte; e existem ainda as abelhas sociais (aproximadamente 5% das espécies de abelhas), nesse grupo se encontram abelhas ótimas para a polinização e produção de mel como a *Apis mellifera* e a *Scaptotrigona* spp. e que se caracterizam por viverem em colônias com vários indivíduos e terem as fêmeas divididas em castas. O grupo das abelhas sociais é o dominante no Brasil (PIANARO, 2012).

Em seus habitats naturais, as abelhas podem se estabelecer em cavidade de rochas, árvores, etc., dependendo das condições do meio, incidência de predadores e ações antrópicas, sendo, por tanto, estudadas também como indicadoras das condições de equilíbrio do meio em que são encontradas (PEREIRA; SOUZA; LOPES, 2017).

O mel foi, durante milênios, praticamente o único adoçante conhecido pelos seres humanos, enquanto a cana-de-açúcar já era cultivada na Índia há uns três mil anos, mas só chegou ao norte da África e à Europa meridional por volta do século VIII d.C. (WOLKE, 2003).

O mel produzido pelas atividades gástricas das abelhas possui em média 17% de água e 77% de açúcares, com pequenas quantidades de minerais, enzimas e pólen, podendo ter cor variável entre um branco-água a tons bem escuros, além de variações de sabores, um resultado das variadas fontes de néctar da flora local (STORER et al., 1991).

Atualmente as abelhas, nativas ou não, são importantes para diversas áreas de estudo, não só pelo mel, mas por seus exemplos de organização ecológica e por todos os demais produtos e subprodutos dessas atividades, com destaque para a produção de própolis e geoprópolis, amplamente trabalhados na meliponicultura (SFORCIN et al., 2017).

A propósito, a meliponicultura é um ramo de trabalho da zootecnia que se dedica à gestão e propagação das meliponinas, abelhas sem ferrão, sendo uma atividade antiga por todas as Américas e amplamente difundida pelo Brasil (LEÃO, 2016).

Desde o início da humanidade esta vem aprendendo a aplicar os recursos naturais em benefício da saúde e dentre esses recursos está o uso da própolis, cujos primeiros registros de emprego na medicina foram descritos pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios, se estendendo até a contemporaneidade (LUSTOSA, 2007).

A própolis é um produto variável e resultante da ecologia das abelhas e que, mesmo com as variações de composição já relatadas na bibliografia acerca do assunto, possui compostos bioativos capazes de, dentre outros efeitos, limitar ou inibir a proliferação bacteriana, o que confere uma grande importância desse produto natural para a indústria farmacêutica e para a medicina popular.

Ela se caracteriza como uma substância complexa em sua formação e composição, formada de resinas, pólen, secreções orais das abelhas e demais elementos naturais que variam de acordo os recursos naturais disponíveis e acompanhando fatores de sazonalidade dos recursos vegetais.

Cerca de 300 compostos, relacionados a diversos benefícios, já foram identificados em diferentes amostras de própolis, incluindo: ésteres de ácidos

fenólicos, diversos flavonóides, terpenos, β -esteróides, álcoois e aldeídos aromáticos, sesquiterpenos, naftalenos, dentre outros (LUSTOSA, 2007).

Tal complexidade e variação é um dos pontos de maior relevância para realização de pesquisas em torno da própolis, uma vez que essa falta de padronização instiga novas pesquisas sobre seus princípios bioativos, suas concentrações e reais aplicabilidades dos mesmos.

Existe, por tanto, um interesse cada vez maior da indústria em conhecer os mecanismos de ação de produtos de origem natural como a própolis, com destaque para a indústria farmacêutica, muito estimulada pela busca de métodos naturais de promover a saúde humana, reduzindo possíveis efeitos adversos, como no combate a agentes microbianos a exemplo da *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*.

As bactérias anteriormente listadas apresentam expressivo potencial infeccioso, podendo estar associadas a casos de mortalidade, além de possuírem relevantes mecanismos evolutivos de resistência e proliferação, mesmo quando submetidas a variadas condições, o que levanta grande preocupação para a Saúde Pública, pois requerem ações de vigilância constante e chamam a atenção para estudos gerais nas áreas da Microbiologia, bem como na Indústria de Alimentos.

Mesmo a humanidade ciente de todos os benefícios com a criação das abelhas a sua incidência está diminuindo, suprimidas pelo fenômeno denominado CCD (*Colony Collapse Disorder* ou Síndrome do Colapso das Colônias) onde o responsável por essa crise é um conjunto de fatores provenientes do agronegócio. A expansão das fronteiras agrícolas em larga escala (destruidora de habitats naturais das abelhas e limitadora das suas áreas de sobrevivência), a homogeneização dos habitats naturais por consequência das monoculturas, reduzindo a diversidade e abundância das flores e o uso indiscriminado de agrotóxicos que envenenam e promovem um efeito biocida sobre esses insetos são algumas das possíveis causas de CCD oriundas do agronegócio (VILLAS-BÔAS, 2018).

O fenômeno CCD, largamente acompanhado nos Estados Unidos e Europa, tem despertado estudos também no Brasil, sendo relevante para entender a sanidade

apícola do país, visto que esta contribui com a polinização de cerca de 70% das suas plantas cultivadas, ou seja, a riqueza de espécies de abelhas e a atividade ecológica desempenhada por elas representam um aporte econômico significativo para a produção agrícola, fato esse que se soma à importância e valorização da produção de mel e demais produtos apícolas como a própolis e o geoprópolis das abelhas nativas (PIRES, 2016).

Nesse sentido, o presente trabalho analisou amostras de própolis de meliponário de área ribeirinha ao Rio Mearim, na cidade de Barra do Corda – MA, centro sul maranhense, para avaliar o potencial antimicrobiano da própolis da abelha nativa Tubi, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807) frente a bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) e da bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*) comparando sua ação com a de agentes antimicrobianos de primeira escolha da medicina, servindo de indicativo da presença de princípios bioativos provenientes da flora local na própolis estudada.

O tema dessa dissertação é a ação antimicrobiana da própolis da abelha nativa *Scaptotrigona affinis postica* (LATREILLE, 1807), com a delimitação de avaliar a bioação da própolis frente a culturas das bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* e se justificou pelas possibilidades de propiciar métodos sustentáveis de combate à Listeriose, infecções diversas, diarreias, além de possíveis aplicações para a odontologia.

Foi definido como objetivo geral da pesquisa avaliar a atividade antimicrobiana de amostras da própolis da abelha nativa Tubi, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807), encontrada na cidade de Barra do Corda – MA, de modo a indicar a presença de possíveis princípios ativos importantes para uso na indústria farmacêutica, alimentícia, dentre outros ramos da indústria.

Os objetivos específicos foram descritos da seguinte forma:

- a) Avaliar características físicas e químicas de amostras de própolis frente a padrões da Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001;
- b) Avaliar a ação antimicrobiana de extrato etanólico de própolis, diluído em diferentes concentrações, da abelha *Scaptotrigona aff. postica*

(LATREILLE, 1807) sobre cepas das bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli*.

Este trabalho está organizado sob a forma de cinco capítulos que abordam o tema na seguinte sequência: o primeiro capítulo contempla a introdução, tratando de tópicos gerais sobre o referencial teórico para a pesquisa, a problematização do mesmo, a justificativa para a sua implementação e os objetivos da pesquisa.

O segundo capítulo trata da revisão de literatura, apresentando conceitos importantes ao entendimento da ecologia das abelhas e do valor químico agregado aos produtos e subprodutos dos serviços ecossistêmicos das mesmas. Na primeira parte desse capítulo consta uma caracterização de Barra do Corda/MA (local da pesquisa) e da abelha nativa dessa região (objeto de estudo), seguidos dos aspectos sociais das abelhas, de uma forma geral, para então descrever o grupo das abelhas nativas do Brasil (Meliponinas), os grupos de bactérias escolhidas para o estudo e os princípios bioativos, relacionados à própolis, citados pela literatura.

O terceiro capítulo foi destinado à descrição do contexto da pesquisa, dos procedimentos metodológicos adotados, desde a classificação da pesquisa até a execução de práticas laboratoriais e a tabulação das informações obtidas.

No quarto capítulo foram descritos os resultados e discussões possibilitados de acordo os dados obtidos nas análises e, para encerrar a pesquisa, no quinto capítulo foram feitas as considerações finais, os apontamentos acerca do que foi possível concluir, além das observações sobre os possíveis estudos capazes de dar continuidade no tema abordado para sua melhor compreensão e aplicação no cotidiano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A própolis é uma mistura multifuncional produzida e utilizada pelas abelhas como elemento estruturante, defensivo e mantenedor da colmeia, com uma composição química muito complexa e de inúmeras propriedades farmacológicas já estudadas durante séculos pela humanidade. A presença de compostos bioativos e sua aplicação na saúde são características resultantes de uma interação de fatores sobre a formulação da própolis como a localização da colmeia, os recursos vegetais disponíveis como fonte de busca de elementos, o país de origem, a estação do ano, dentre outros (LUSTOSA et al. 2008).

2.1 Fitogeografia de Barra do Corda – MA

O clima maranhense se classifica basicamente como um aspecto transitório entre características amazônicas e características tropicais com duas nítidas estações definidas “uma seca e outra chuvosa”, onde ou o clima é marcado por ser menos pluvioso ou há o registro de grande estação chuvosa (TORRES et al., 2016).

Barra do Corda é uma cidade da região central do estado, de bioma predominante o Cerrado e que possui tipologia climática classificada como C₁SA'a',

ou seja, seco e subúmido, com excesso moderado no inverno e megatérmico (MARANHÃO, 2002).

O mês de maio é característico em Barra do Corda - MA por marcar o início da diminuição das chuvas, o que se intensifica no período compreendido entre os meses de junho a dezembro, com reposição significativa das chuvas a partir do mês de janeiro, podendo contar com excedentes entre os meses de fevereiro a abril (SOUZA et al., 2015).

O perfil florístico atual é resultado de remanescentes da vegetação original em estágios secundários de sucessão somados a muitas espécies gradualmente introduzidas pelos moradores. A área de coleta da própolis se encontra com progressiva presença antrópica, com o estabelecimento de residências no seu entorno, sendo comum encontrar espécies de plantas ornamentais e medicinais trazidas pelos moradores, o que transformou a vegetação local num mosaico formado por resquícios de pastagens, florestas abertas e vegetação exótica, além da degradação resultante da ocupação humana (MARANHÃO, 2002).

Segundo Souza et al. (2015) estudos sobre aspectos polínicos da própolis da abelha *Scaptotrigona* aff. *postica* revelaram que no entorno das colmeias, em Barra do Corda-MA, existem plantas das famílias das Amaranthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Aquifoliaceae, Arecaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Boraginaceae, Burseraceae, Cactaceae, Caryophyllaceae, Commelinaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Lythraceae, Malpighiaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Meliaceae, Myrtaceae, Nyctaginaceae, Phyllanthaceae, Poaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Sapotaceae e Solanaceae.

Souza et al. (2015) também encontraram alguns grãos de pólen que não favoreceram a determinação da família pertencente, sendo que no estudo ocorreu uma maior frequência de pólen da família das Fabaceae e das Rubiaceae e pequena frequência de pólen anemófilo das famílias Cyperaceae e Poaceae, o que pode estar relacionado a fatores atrativos às abelhas, maior produção de resina em detrimento à produção de grãos de pólen por parte da planta e a presença de pólen trazido pelo ar, o que contaminou a colmeia local.

Estudos qualitativos e quantitativos dos grãos de pólen presentes na própolis de uma colmeia permitem identificar os táxons vegetais que interagem nos serviços ecológicos estabelecidos pelas abelhas, permitindo inferências acerca da origem dos produtos apícolas bem como a sua caracterização sendo, portanto, a caracterização palinológica da colmeia um dado importante para compreender as interações ecológicas das abelhas com a flora local, a sazonalidade da vegetação e do clima, ao mesmo tempo que caracteriza fitogeograficamente a região (D'ALBORE, 1979).

2.2 Abelha Tubi, *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807)

Tubi é o nome popular dado a um grupo de abelhas facilmente adaptáveis, altamente reprodutivas (quando comparadas a outras abelhas nativas) e com colmeias muito populosas, o que facilita a multiplicação de colmeias em caixas, troncos de árvores, dentre outros suportes (SILVA, 2009).

O Brasil possui cerca de 400 espécies de abelhas nativas sendo as mais famosas a jataí, mandaçaia, uruçú e jandaíra. Nesse grupo se encontra o gênero *Scaptotrigona* (Moure, 1942) que é formado de 24 espécies, conhecidas popularmente como abelhas canudo, mandaguari, tubi e tubiba e dessas a tubi, como é popularmente chamada a espécie *Scaptotrigona affinis postica* (Latreille, 1807), mede menos de um centímetro e está presente mais ao sul do Maranhão, sul do Piauí e norte do Tocantins podendo ser encontrada também nos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Pernambuco e São Paulo, onde tem instigado diversas pesquisas sobre seu nicho ecológico e produtos derivados de seus serviços ecossistêmicos (SILVA, 2009; SANCHES, 2014).

Elas são abelhas altamente sociais e que facilmente constroem ninhos podendo utilizar para isso árvores vivas, fendas em rochas ou mesmo em cavidades artificiais que possuam uma entrada característica, semelhante a um tubo, o que motivou a nomenclatura usual de abelha Tubi (SANCHES, 2014).

Apesar de serem abelhas nativas, sem ferrão e de fácil criação, elas demonstram comportamento hostil quando em situações que perturbam a ordem da colmeia, fazendo uso de suas fortes mandíbulas para morder um possível invasor, por isso, é aconselhável o uso de vestimentas adequadas no manuseio das colmeias (VILLAS-BÔAS, 2012).

As abelhas *S. aff. postica* também se destacam pela grande quantidade de própolis e seus derivados produzidos nas colmeias, fato esse que não se repete por todas as espécies e quanto a produção de mel esse quantitativo não passa de 10% quando comparado ao total de compostos produzidos. Esse baixo teor de mel é ainda a principal fonte de nutrientes dessas abelhas, especialmente nas primeiras fases de seu desenvolvimento, por isso, de forma comercial, a criação de *S. aff. postica* foca na exploração de pólen, própolis e geoprópolis que também está intimamente ligada à agricultura pelo fato dessa abelha ter uma importância significativa na polinização de espécies de culturas nativas (SILVA, 2009; LEÃO, 2016).

Na região de Barra do Corda – MA, produtos à base da própolis da *Scaptotrigona aff. postica*, como pomadas e extratos, já são usados com finalidade medicinal, inclusive por meio de indicação médica, principalmente para ação anti-inflamatória no trato respiratório e tratamento de feridas e queimaduras na pele (SILVA, 2009).

2.3 A construção social das colônias

As colônias de meliponíneos são construídas com três materiais básicos: cera, barro e resina vegetal, sendo estes usados puros ou misturados com outros compostos originando o cerume (mistura entre cera pura e resinas vegetais, com predominância da cera), a própolis (mistura de resinas vegetais com cera, sendo predominante as resinas) e o geoprópolis (produzido exclusivamente pelas abelhas Meliponinis e constitui uma mistura entre barro e resinas vegetais). Além disso,

eventualmente podem ser usados sementes, fibras vegetais e até excrementos animais. Essas abelhas também utilizam resinas puras para vedação da colônia e para defesa pelo estímulo repulsivo produzido, fato que não é registrado entre as abelhas do gênero *Apis* (VILLAS-BÔAS, 2018).

Alguns desses materiais (geoprópolis, barro, cerume e/ou cera pura) também são muito importantes para conectar a colônia ao meio externo uma vez que são utilizados para formar e sustentar a “porta” de entrada, variando muito de formato, tamanho e cor dependendo da espécie, do barro e das resinas coletados (VILLAS-BÔAS, 2018).

2.4 A Meliponicultura

A Meliponicultura é uma nomenclatura utilizada para todas as atividades designadas a partir da criação de abelhas sem ferrão, nativas do Brasil e de regiões tropicais e subtropicais do planeta (VILLAS-BÔAS, 2018).

Historicamente, a meliponicultura está associada às práticas étnicas através do modo de uso dos produtos das colmeias, a forma de extrativismo desses materiais, bem como das técnicas rústicas de criação utilizados por grupos tradicionais, como os indígenas (VILLAS-BÔAS, 2018).

O modo como as comunidades indígenas, pequenos grupos produtores, grupos familiares, dentre outros, acessam as colmeias, captam o mel e outros produtos e reproduzem as sociedades desses insetos sem levá-las à morte, garantindo sucessivas cadeias produtoras numa mesma melgueira, são ótimos exemplos da etnocultura envolvida na criação de abelhas, características essas que precisam ser preservadas (VILLAS-BÔAS, 2018).

As comunidades indígenas possuem forte influência sobre o beneficiamento dos produtos de uma colmeia, sobre a criação e manipulação das abelhas e isso

reflete, primariamente, na diversidade de nomes populares usados para diferenciar as muitas espécies localizadas, como Jataí, Iraí, Uruçu, Tiúba, Mombuca, Arapuá, Tataíra, Jandaíra, Guaraipo, Manduri e tantas outras variações com origem nas línguas indígenas (VILLAS-BÔAS, 2012; VILLAS-BÔAS, 2018).

Nos hábitos das comunidades tradicionais, o mel das abelhas sempre configurou uma importante forma de se obter energia para os trabalhos diários, a caça de animais e caminhadas para a colheita de alimentos, além de ter sido o principal adoçante natural (VILLAS-BÔAS, 2012).

Por toda a importância histórica do mel no cotidiano das comunidades e, conseqüentemente, a sua valorização comercial, este também passou a ser considerado um agravo à meliponicultura, uma vez que as meliponinas (abelhas nativas, sem ferrão) não são boas produtoras de mel, quando comparadas as abelhas africanizadas.

Muito se fala da influência do avanço das fronteiras agrícolas, desflorestamento, ocupação do solo para construção de áreas urbanas, toxicidade e letalidade promovida pelos compostos químicos dos agrotóxicos frente as colmeias de abelhas, como fatores para a redução da riqueza e abundância desses animais que deixam de encontrar fonte de alimento, locais para nidificação e matéria prima para a construção de ninhos, mas há também que considerar a influência dos apicultores, que na sua prática, dão preferência pelo manejo de abelhas *Apis mellifera*, devido a sua boa produção de méis, em detrimento às abelhas brasileiras (boas produtoras de própolis), o que requer estudo sobre as possibilidades de competição entre essas espécies na natureza e a magnitude da influência dos apicultores sobre a preservação do gênero *Apis* frente à meliponicultura ao longo do tempo (PRONÍ, 2000; KERR et al., 2001).

Nesse sentido, a meliponicultura deve ser entendida como uma atividade historicamente desenvolvida por comunidades tradicionais – como caboclos, indígenas, ribeirinhos, caipiras, açorianos e sertanejos – para subsistência, em escala artesanal, sem destaques quantitativos na agricultura do país onde, só nas últimas duas décadas, a atividade ganhou visibilidade, provavelmente, impulsionada pela acessibilidade das tecnologias de comunicação e o que antes era considerado uma

prática dos chamados “matutos”, ganhou as atuais redes sociais e já registra mais de 20 mil adeptos (VILLAS-BÔAS, 2018).

Atualmente a meliponicultura trabalha, não só com os costumes tradicionais acerca do manejo das abelhas nativas do Brasil, mas também com a efetivação da inserção da própolis no mercado de consumo de produtos de origem natural e que vem se configurando como uma eficiente fonte de princípios ativos para a área da fitoterapia (VILLAS-BÔAS, 2012).

As dificuldades de caracterização das diversas própolis pelo Brasil, impulsionadas pela crescente demanda de consumo desse produto e de seus derivados, visando o mercado meliponicultor, controle de qualidade e competitividade nacional e internacional, levaram ao estabelecimento da Instrução Normativa Nº 3, de Janeiro de 2001, com vistas a garantir a qualidade de produtos apícolas, incluindo a própolis bruta e seus extratos (BRASIL, 2001).

2.5 Biologia das Meliponinas

Meliponíneo é o nome dado a um grupo exclusivo de insetos da Família Apidae, do tipo corbiculados, sendo abelhas nativas e sem ferrão (com acúleo atrofiado) divididas nas tribos Meliponini e Trigonini (MOURE, 1961; SOUZA et al., 2005).

Na classificação proposta por Moure (1961), as Meliponinis são maiores, com aspecto robusto, de tamanho médio a grande (de 7 a 15 mm). Ex(s): uruçus, jandaíras, tiubas, mandaírias, tubi (Figura 1) etc. Já as Trigoninis, são todos os demais gêneros diferentes do Melipona, sendo abelhas menores, de aspecto mais vistoso e de tamanho pequeno a médio (de 2 a 11 mm). Ex(s): jataís, irais, mirins, canudos, etc (VILLAS-BÔAS, 2018).

Figura 1 – Abelha Tubi, *Scaptotrigona* aff. *postica* (LATREILLE, 1807)



Fonte: Do autor (2019).

A proposta de divisão desses insetos em duas tribos distintas, realizada por Moure em 1961, é tida como a mais didática e, por isso, a mais usual, sugerindo que essas abelhas compreendem o Reino – Animalia; Filo – Arthropoda; Classe – Insecta; Ordem – Hymenoptera; Superfamília – Apoidea; Família – Apidae; Subfamília – Meliponinae; Tribo – Meliponini ou Trigonini (VILLAS-BÔAS, 2018).

As abelhas sem ferrão são insetos muito sociais, de grande diversidade e ampla distribuição geográfica, o que tem gerado variações nos estudos, bem como no modo de classificá-las cientificamente (VILLAS-BÔAS, 2018).

Estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Terra, com exceção do Chile, ocupando 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 sendo, aproximadamente, 350 tipos descritos com 250 desses só no Brasil (VILLAS-BÔAS, 2018).

Os meliponíneos, assim como outros insetos sociais (vespas, formigas e cupins), possuem suas famílias divididas em castas, dividindo as colônias em três tipos básicos de abelha: as rainhas (poedeiras ou virgens) e as operárias – ambas fêmeas – e os machos (VILLAS-BÔAS, 2018).

O grupo das meliponinas é relatado como produtor de uma própolis tão importante quanto a própolis de origem *Apis mellifera*, isso porque a meliponina além

de produzir própolis também tem a capacidade de formar derivados desse, como o geoprópolis (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

A organização da colônia é uma responsabilidade das operárias, através de um complexo sistema de comunicação baseado no uso de feromônios e nessa estrutura, normalmente, existe apenas uma rainha poedeira, mas existem relatos da existência de colônias e de espécies com duas ou mais (VILLAS-BÔAS, 2018).

Antes de serem fecundadas e assumirem essa responsabilidade reprodutiva, as rainhas são chamadas rainhas virgens e a grande maioria dessas nasce e morre sem nunca se tornar uma rainha poedeira, mas estão sempre presentes na colônia, caso seja necessário assumir esse papel, ou por morte da rainha poedeira ou em caso de enxameagem (VILLAS-BÔAS, 2018).

A enxameagem é o processo natural pelo qual ocorre a reprodução total das colônias de abelhas sem ferrão, dispersando a população de abelhas pela sua área geográfica de ocorrência como resultado de superpopulação da colônia, mas dependente da oferta de alimento (pólen e néctar) no ambiente (VILLAS-BÔAS, 2018).

É por ocorrência da enxameagem que as abelhas rainhas virgens são fecundadas no “voo nupcial” passando então a serem chamadas de rainhas poedeiras ou fisiogástricas e irão coordenar um novo ninho montado pelo enxame que se dispersou da colônia inicial, a “colônia-mãe”. A nova colônia, “colônia-filha”, tem então o estabelecimento de uma rotina biológica à espera do nascimento das novas abelhas e de manutenção por parte das abelhas que se dispersaram inicialmente (VILLAS-BÔAS, 2018).

O tempo de desenvolvimento de uma abelha sem ferrão, desde o ovo até a abelha adulta, varia de acordo com as espécies. Entre as espécies da tribo Meliponini, o tempo é relativamente equivalente, uma média de 35-45 dias: 5-7 dias para eclosão do ovo; 12 à 16 dias de desenvolvimento larval; e 18 à 22 dias de amadurecimento da pupa. Nessa média, o período de desenvolvimento costuma ser um pouco mais longo para os machos e um pouco mais curto para as rainhas virgens (VILLAS-BÔAS, 2018).

Por anos, preservou-se a imagem de que a *Apis mellifera* era um agente polinizador muito eficiente da natureza. Hoje sabe-se que em várias plantas ela até se

conFigura como um visitante frequente, mas de baixa taxa polinizadora, principalmente quando comparado com as abelhas silvestres (NATES-PARRA, 2005).

Os serviços ecossistêmicos das várias espécies de meliponinas são fundamentais para o equilíbrio do meio natural pois muitas espécies de plantas dependem, exclusivamente, desses animais para a sua polinização, onde estima-se que, de 30% a 80% das plantas, conforme a floresta, são polinizadas por uma ou mais espécies da subfamília Meliponinae (KERR et al., 2001).

Além das características já descritas, a biologia das meliponinas incluem uma gama de informações que favorecem o seu estudo como bioindicadoras da qualidade ambiental.

Os hábitos naturais como o voo, nidificação e forrageio são características essenciais para definir o potencial polinizador da abelha, claramente utilizado em diversos cultivos, mas que também podem ser manejados para a manutenção de ecossistemas naturais bem como para a implementação de projetos de recuperação ambiental (NATES-PARRA, 2005; RICHARDS, 2001).

Outra característica ambiental importante das meliponinas é a transferência de substâncias químicas do meio externo para o interior de suas colmeias, impregnando-os nos seus produtos e subprodutos. Isso ocorre porque, durante o voo, as abelhas realizam o registro químico do ar por onde trabalham, através de partículas que ficam aderidas aos pelos superficiais do seu corpo ou incorporadas ao néctar e pólen coletados. Quando identificadas, essas mesmas partículas podem informar se a área se trata de um habitat conservado ou com indícios de risco ambiental (WOLFF; DOS REIS; SANTOS, 2008).

2.6 A própolis

A palavra própolis tem origem no grego pro - em defesa, e polis - cidade ou comunidade, ou seja, designa uma substância em defesa da comunidade (LUSTOSA, 2007).

O termo faz referência aos usos empregados à própolis dentro da colmeia, seja para vedar frestas e diminuir o tamanho da entrada, reduzindo o ataque de intrusos e protegendo as abelhas e suas crias do frio, ou ainda sendo utilizada como antisséptico na região dos alvéolos (Favos de cria), onde a rainha faz a postura dos ovos (Figura 2), além de ser depositada sobre inimigos abatidos dentro da colmeia, como uma forma de embalsamamento, evitando que o mesmo apodreça e contamine o ninho (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

A própolis é um composto formado pelas abelhas a partir de substâncias resinosas, coletadas de diversas origens vegetal, misturadas a secreções salivares, cera, pólen (Figura 3) e minerais, sendo estimado um percentual de 50 – 60% de resinas e bálsamos em sua composição e que na porção resinosa a grande maioria dos componentes fazem parte do grupo dos compostos fenólicos (COSTA et al., 2014; GHISALBERTI, 1979; WOISKY, 1996).

De forma geral, os compostos da própolis têm três diferentes origens naturais. As substâncias ativamente secretadas pelas plantas, como as substâncias exsudadas por feridas em plantas (materiais lipofílicos em folhas e brotos de folhas, resinas, mucilagens, entre outros) e as substâncias vegetais coletadas pelas abelhas; as substâncias secretadas do próprio metabolismo das abelhas; além de materiais introduzidos pelas abelhas durante a elaboração da própolis (MIGUEL, ANTUNES, 2011).

As secreções salivares das abelhas são um importante componente no processo de elaboração da própolis em virtude da presença da enzima β -glicosidase que promove a hidrólise dos flavonoides presentes na mesma (COSTA et al., 2014).

Figura 2 – Favos de cria da espécie *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807)



Fonte: MELO (1990).

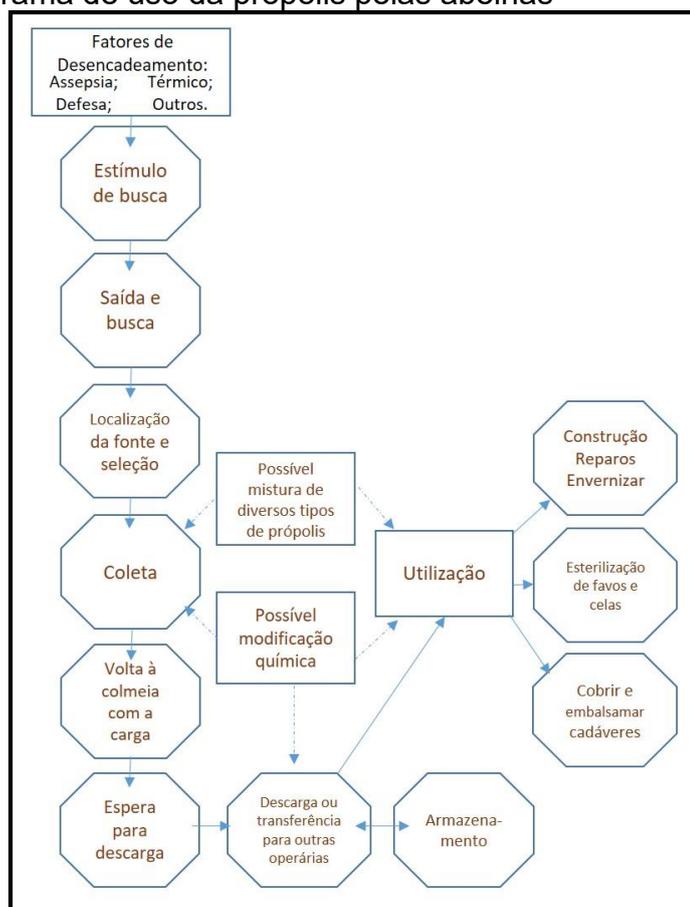
Figura 3 – Chegada das abelhas com pólen da flor da cajazeira nas corbículas



Fonte: MELO (1990).

Na Figura 4 é apresentado um fluxograma representando alguns fatores estimulantes da coleta de compostos naturais pelas abelhas, algumas etapas do processo de manejo dos materiais coletados, bem como alguns usos empregados à própolis produzida pelas abelhas (DIEHL, 2008).

Figura 4 – Fluxograma de uso da própolis pelas abelhas



Fonte: Diehl (2008, p. 6).

A própolis é uma mistura resinosa, gomosa e balsâmica, com consistência, cheiro, textura e coloração variada, coletada de diversas partes de várias plantas, acrescida de secreções salivares das abelhas, podendo ainda ter cera, pólen, óleos essenciais e aromáticos e outras substâncias variadas como distintos resíduos orgânicos (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

Esses constituintes aparecem em várias concentrações por influência da localização geográfica e da origem botânica, no entanto, a composição exata da própolis dessas diferentes origens botânicas é variável, mesmo quando apresentarem mecanismos bioativos semelhantes (SARDANA et al., 2013).

As características organolépticas da própolis (cor, odor, sabor, textura, além de seus princípios bioativos) são diretamente dependentes da sazonalidade da região em que foi produzida, refletindo aspectos ambientais como vegetação próxima, incidência pluviométrica, período de florada, etc.

O uso da própolis é antigo, principalmente na medicina tradicional, com registros há, pelo menos, 300 a.C., sendo hoje um produto apícola de largo uso em todo o mundo com uma vasta lista de relatos sobre as atividades biológicas da própolis, dentre elas atividades anticâncer, antioxidante, anti-inflamatório, antibiótico e antifúngico (GHISALBERTI, 1979; BURDOK, 1998; MARCUCCI, 1995).

O uso medicinal da própolis se destaca por ela ser um produto de origem natural, com efeitos bioativos semelhantes a antibióticos, antissépticos, analgésicos, dentre outros, e que se configura como uma reprodução dos usos já atribuídos à própolis desde a antiguidade ou mesmo por comunidades indígenas, sendo um hábito na América do Sul mais antigo até que as atividades envolvendo a *Apis mellifer* (VILLAS-BÔAS, 2012; SILVA, 2009).

Para uma efetiva inserção da própolis no mercado nacional e internacional, há o desafio de caracterizá-la qualitativa e quantitativamente, na busca por uma identidade e possível padronização, tanto para suplementação alimentar como aplicações farmacológicas.

Tendo em vista a variedade e complexidade química das diversas fontes de própolis e na busca por entender as características físicas, químicas e microbiológicas das mesmas, entidades governamentais responsáveis estabeleceram normativas técnicas para identidade e qualidade de produtos como mel, própolis bruta e extrato de própolis através da Instrução Normativa N°03, publicada em Janeiro de 2001, como segue no Quadro 1 (BRASIL, 2001).

Quadro 1 – Requisitos físicos e químicos para identidade da própolis bruta e para o extrato alcoólico de própolis (BRASIL, 2001)

Própolis bruta		Extrato alcoólico de própolis	
Requisito	Brasil*	Requisito	Brasil*
Umidade (perda por dessecação)	Máx. de 8% (m/m)	Extrato seco	Mín. de 11% (m/v)
Cinzas	Máx. de 5% (m/m)	Cera	Máx. de 15% de extrato seco (m/m)
Cera	Máx. de 25% (m/m)	Compostos fenólicos	Mín. de 0,5% (m/m)
Massa mecânica	Máx. de 40%	Flavonoides	Mín. de 0,25% (m/m)
Compostos fenólicos	Mín. de 5% (m/m)	Atividade de oxidação	Máx. de 22 s
Flavonoides	Mín. de 0,5% (m/m)	Teor alcoólico	Máx. de 70° GL (v/v)
Atividade de oxidação	Máx. de 22 s	Metanol	Máx. de 0,40 mg/L
Solúveis em etanol	Mín. de 35% (m/m)		

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: Máx.: máximo; Mín.: mínimo; s: segundos

* Valor preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001)

2.7 Propriedades biológicas da própolis

Há anos, pesquisas vêm reportando benefícios à saúde como resultado da atividade biológica de grupos de compostos presentes na própolis e a caracterização desses componentes químicos, associada a crescente procura por tratamentos alternativos naturais, têm elevado a demanda pela própolis bem como dos compostos enriquecidos com ela.

A própolis é uma substância de origem animal de vasto uso na medicina popular com diversas aplicações farmacológicas já comprovadas, com destaque para a eficácia de seu poder antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

Ela reúne diversos componentes bioativos, variando entre as espécies de abelha, a região em que estas se estabelecem, a biodiversidade local e da

periodicidade das intempéries ao longo do ano onde os estudos sobre essas características só encorpam a relação de sua empregabilidade aos seus compostos químicos, seja através de seu uso isolado ou associado a algum medicamento, muitas vezes enaltecendo compostos bioativos já estudados ou mesmo descobrindo novos compostos.

Um dos primeiros relatos do uso da própolis data do Egito antigo, no papiro de Ebers, escrito em 1700 a.C., onde foi registrado o emprego dela em processos de embalsamamento de mortos durante atividades de mumificação (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

São conhecidas diversas ações dos princípios bioativos da própolis como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica e até anti-HIV, propriedades dependentes da espécie de abelha, das plantas escolhidas como fonte de resinas, sazonalidade de fatores climáticos, etc. (DE-MELO et al., 2014).

A vasta gama de utilidades já testadas e confirmadas em pesquisas com a própolis só ratifica a biodiversidade envolvida na biologia das abelhas e, ao mesmo tempo, demonstra uma dificuldade de padronização dos produtos derivados dela, uma vez que a mesma é diretamente dependente dos recursos naturais disponíveis no ambiente.

Marcucci (1996) já havia relatado que a própolis, tanto isolada como em associação, possui propriedades biológicas, tais como: ação antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de potencializar a ação de vários antibióticos como o ocorrido em testes com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em presença de biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina e estreptomicina que tiveram seu efeito aumentado pela adição de própolis ao meio nutriente; ação antifúngica onde os melhores resultados foram obtidos em testes com Extratos Etanólicos de Própolis (EEPs) e destes em sinergismo com drogas antimicóticas; antiprotozoárias, com estudos feitos contra protozoários preocupantes para a saúde pública, como *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*; e antivirais, onde, *in vitro*, se estudou a ação dos flavonóides de própolis frente a virulência e duplicação de algumas linhagens virais, tais como: herpes, adenovírus e rotavírus.

2.7.1 Atividade antimicrobiana

Estudos utilizando extratos etanólicos da própolis têm demonstrado a ocorrência de ação inibidora do crescimento das bactérias, sendo citado como responsável por prevenir a divisão celular e produzir defeitos na estrutura da parede bacteriana, além de promover desorganização citoplasmática, alterações na membrana plasmática e inibir a síntese de proteínas (TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER, 1994).

Acredita-se que a própolis seja uma das misturas mais heterogêneas de ocorrência natural, com mais de 300 substâncias já identificadas, com destaque para o grupo dos flavonoides onde se acredita que esse grupo de moléculas seja o grande responsável pelas principais ações antibacterianas (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011; BITAJIAN et al., 2013).

Alguns estudos com compostos ácidos e do grupo dos flavonoides da própolis têm mostrado boa ação contra atividade bacteriana, em especial contra as Gram-positivas, tendo uma ação mais limitada contra as Gram-negativas, o que pode estar associado à complexidade da parede celular dessas bactérias bem como à presença de seus componentes lipídicos que formam uma barreira à ação dos compostos bioativos da própolis (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011).

Estudos *in vitro* tem evidenciado que a atividade antimicrobiana da própolis é resultado da presença de flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural, além da galantina, pinocembrina e os ácidos ferúlicos e cafeicos que contribuem para a ação bactericida da própolis, entretanto, a relação entre a estrutura química e a atividade antibacteriana dos constituintes da própolis não é plenamente conhecida (DIEHL, 2008; GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998).

Bankova et al. (1996) analisaram halos de inibição formados pela própolis brasileira e pelos seus constituintes em reação contra *S. aureus*, com destaque para o efeito isolado do ácido isocuprêssico (halo – 10,5 mm) quando comparado ao efeito da própolis (halo – 11,8 mm). Estudos com *S. aureus* também foram realizados por Miorin et al. (2003), onde demonstraram que a própolis brasileira da abelha

Tetragonisca angustula, quando comparada com a própolis da abelha *Apis mellifera*, através da definição da Concentração Inibidora Mínima (MIC), possui alta atividade contra *S. aureus*, sendo também mais eficaz que o efeito produzido pelo mel de ambas as abelhas testadas.

Segundo Silva et al. (2017) os extratos de própolis vermelha obtidos, tanto por extração etanólica como por extração com fluido supercrítico, apresentaram os maiores níveis de atividade antimicrobiana contra várias bactérias, ao passo que nenhum dos extratos analisados apresentou atividade contra *Escherichia coli* ou contra o fungo *Candida albicans*.

O fomento ao uso de antimicrobianos de origem natural tem se tornado uma opção bioeconômica e segura frente à automedicação e ao uso prolongado de substâncias químicas sintéticas (DIEHL, 2008).

2.7.2 Atividade antioxidante

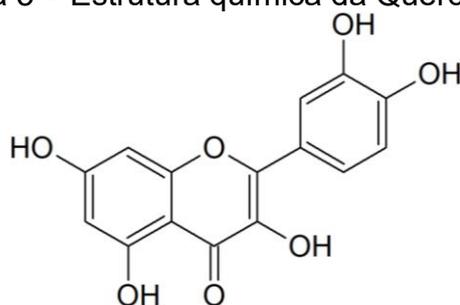
São consideradas antioxidantes toda e qualquer substância que, mesmo em pequenas concentrações, em comparação a um substrato oxidável, retarda ou impede a oxidação do substrato comparado de forma eficaz (SIES; STHAL, 1995; HANDELMAN, 2001).

A indústria de alimentos tem se dedicado muito a estudar os mecanismos de ação dos compostos com atividade antioxidante, isso porque podem ser amplamente empregados, principalmente, com a finalidade de retardar ou inibir a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, garantindo assim a qualidade de vários alimentos e, principalmente, durante a chamada “vida de prateleira” dos mesmos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Dentre os princípios bioativos da própolis um dos que mais se destaca é o efeito antioxidante, resultante da ação conjunta de um grande número de flavonoides, como quercetina, flavonas, isoflavonas, flavononas e antocianinas (MORENO et al., 2000; NAGAI et al., 2001).

A quercetina é a representante da classe dos flavonoides mais frequentemente quantificada para estabelecer a qualidade da própolis e de seus possíveis princípios ativos (MARCUCCI, 1995; VANHAELEN, VANHAELEN-FASTRÉ, 1979). A estrutura química da quercetina pode ser visualizada na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura química da Quercetina



A própolis é um produto apícola com grande diversidade de atividades biológicas, possui composição complexa, dependente de sua fonte botânica. Estudos com amostras de própolis das cidades de Afonso Bezerra e Alto do Rodrigues (Rio Grande do Norte/ Brasil) demonstraram características químicas de padrão semelhante ou superior à própolis verde brasileira comercializada internacionalmente, com alta atividade antioxidante, sendo que a maioria dos constituintes dessas própolis são flavonoides (cerca de 70% do total de substâncias fenólicas) e alto teor de substâncias fenólicas (correspondendo a cerca de 25% dos sólidos solúveis), além de baixo teor de cera, o que projeta pesquisas para esse tipo de própolis além de viabilidade para o mercado apícola (FERREIRA, et al., 2017; WOISKY, SALANTINO, 1998).

Apesar de os flavonoides serem estudados como os antioxidantes mais presentes e abundantes em própolis, Yamauchi et al. (1992) verificaram que outros compostos fenólicos, como por exemplo o benzil cafeato, também apresentam atividade antioxidante, contudo, o mesmo não foi identificado em amostras de própolis brasileira.

Park et al. (1998a, 1998b) determinaram que os extratos etanólicos de própolis preparados com 70 e 80 % de etanol apresentam maior atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com menor concentração de etanol.

Estudos comparativos *in vitro* com extratos de própolis vermelho, verde e marrom de diferentes regiões do Brasil, obtidos por meio de extração etanólica e por fluido supercrítico, demonstraram que ambos os métodos, em todos os tipos de própolis, obtiveram bons resultados como agente antioxidante, sendo que tal ação ficou condicionada à concentração do extrato (quanto mais concentrado, maior atividade antioxidante) e em todos os testes também foi constatado que o extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante que o obtido por extração supercrítica (SILVA et al., 2017).

Estudos com amostras de própolis do estado de Minas Gerais mostraram que o Artepillin C é um antioxidante que, quando ingerido na dieta, é facilmente transportado de forma livre no sistema de absorção intestinal, agindo no DNA dos hepatócitos, evitando danos oxidativos e prevenindo doenças degenerativas. O Artepillin C ou ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico é uma molécula que tem sido encontrada em amostras de própolis brasileira sendo relacionada com o potencial efeito antioxidante promovido pelas amostras analisadas, bem como tem sido relatada como uma molécula de ação citotóxica frente a células tumorais cultivadas *in vitro* (SHIMIZU et al., 2004; MATSUNO et al., 1997).

É importante destacar que, para determinação das concentrações totais de compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente, os métodos de Folin-Ciocalteu e de formação do complexo com $AlCl_3$ são os mais comumente utilizados em análises de produtos vegetais e de alimentos (MARQUELE, 2005).

No meio científico é sabido que a própolis possui efeito antioxidante cabe, porém, mais estudos para definir quais elementos promovem tal efeito, bem como deve-se procurar entender os mecanismos de ação desses elementos de forma isolada e a sua ação de forma sinérgica e, ainda, os efeitos advindos da interação com outros elementos químicos possíveis de participação no metabolismo humano.

2.7.3 Atividade anti-inflamatória

Na própolis, o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) e a galangina são considerados compostos majoritários e que, graças a ação combinada desses dois compostos (a CAPE reforçando a ação da galangina), a própolis possui uma boa ação anti-inflamatória (BORRELLI et al., 2002).

Borrelli et al., (2002) avaliaram a ação de extratos etanólicos de própolis (com e sem CAPE) frente a casos agudos e crônicos de inflamação modelados em ratos machos (edema de carragenina no pé, pleurisia de carragenina e artrite adjuvante) e concluíram que os extratos com CAPE e CAPE isoladamente inibiram o edema de carragenina, a pleurisia de carragenina e a artrite adjuvante. Em contrapartida, extratos sem CAPE e galangina não exibiram efeitos anti-inflamatórios, o que sugere que a atividade anti-inflamatória da própolis se deve ao CAPE e a seus efeitos combinados (BORRELLI et al., 2002).

2.7.4 Atividade citotóxica

Segundo Araújo *et al.* (2010) o estudo da ação antitumoral de extrato da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (originária de Barra do Corda – MA) em células de tumor de Erlich, em avaliação com modelo animal (avaliado nas patas de camundongos), apresentou sinais de baixa toxicidade em órgãos e em análises séricas e nenhuma morte, após quatorze dias, sendo verificado também a redução no tamanho do tumor e inibição da produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

A própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Barra do Corda – MA) também foi testada *in vitro* em células de glioblastoma (U251 e U343) e em fibroblasto humano (MRC-5), onde Borges et al., (2011) verificaram a ocorrência da inibição da proliferação das amostras celulares testadas ao passo que também verificaram a não ocorrência de morte celular por apoptose e o registro de efeito sinérgico

antiproliferativo entre as amostras de própolis e o Temozolomide (TMZ), droga utilizada para quimioterapia.

O extrato etanólico da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* e suas frações foram testados também em células tumorais em comparação com células normais sendo identificado um potencial citotóxico frente a linhagem de fibroblasto normal 3T3 e frente as linhagens tumorais de câncer mamário MCF7, de astrocitoma humano U343 e de melanoma murino B16-F10 (SANCHES, 2014).

Estudos *in vitro* com células HeLa (carcinoma cervical humano) testaram, sob diferentes métodos de cultura, o efeito de EEP, onde esses se mostraram como agentes citotóxico (MARCUCCI, 1996).

Em amostras de própolis brasileira foram isolados novos compostos derivados de seus extratos metanólicos, como o (E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-metil etenil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-ácido propenóico e (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocina-namoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenilfenil}-2-ácido propenóico, e ambos os compostos demonstraram suave ação citotóxica para o câncer de fígado e células do fibrosarcoma humano HT-1080 (BANSKOTA et al., 2000b).

Carvalho et al. (2011) avaliaram *in vivo* e *in vitro* a atividade antitumoral de um extrato de própolis obtido com óleo vegetal comestível em comparação com a atividade de extrato etanólico e observaram que todos os extratos apresentaram atividade antitumoral com efeito de toxicidade moderada nos níveis de exposição experimental, sendo que o extrato de própolis a óleo foi tão eficaz quanto o etanólico na inibição do crescimento tumoral.

Analisando extratos de própolis *in vivo*, Gonzaga et al. (2009) verificaram o seu efeito citotóxico em estudos usando o modelo Sarcoma 180 (S-180) (tumor originado em camundongo, frequentemente usado em pesquisas antitumorais *in vivo*). Por efeito dos extratos de própolis testados, observou-se que houve uma redução significativa do peso do tumor em todos os camundongos transplantados com tumor modelo S-180 (GONZAGA et al., 2009).

Em testes de citotoxicidade, apenas os extratos etanólico de amostras de própolis vermelha mostraram efeito citotóxico contra quatro linhas celulares de câncer

testadas (HL-60, HCT-116, OVCAR-8 e SF-295) quando comparados a extratos de própolis verde e marrom, indicando que extratos de própolis vermelha têm grande potencial para terapias anticâncer (SILVA et al., 2017).

2.7.5 Demais atividades biológicas

A própolis também já apresentou diversas outras propriedades biológicas em estudos *in vitro*, como a influência de EEPs sobre o desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi*, ação anestésica, regeneração de tecidos (cartilaginoso, ósseo, polpa dental), imunogenia, hepatoproteção, desintoxicação no fígado, antiúlcera, anticáries (em ratos) e ação imunomoduladora (MARCUCCI, 1996), ação como agente protetor contra radiações gama, antileishmaniose em hamster (MARCUCCI, 1995), efeito de cicatrização de feridas e reparo tissular, agindo em dermatites devido aos ácidos alil-cafeicos e no tratamento de varicose crônica trófica (FONTANA et al., 2004).

Outros estudos com flavonoides também têm conferido à própolis uma cadeia de bioação indutora de apoptose em células de melanoma humano, um avanço nos estudos com princípios ativos de efeito carcinogênicos (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011), além de estudos que reportam ao Artepellin C, presente na própolis, uma cadeia de bioação antitumoral (MATSUNO et al., 1997).

É reconhecido também pela ciência o potencial antifúngico da própolis frente às espécies do gênero *Trichophyton* e *Mycrosporium*, quando em presença do propilenoglicol, além de testes exitosos de sinergismo entre extrato etanólico de própolis e drogas antifúngicas contra *Candida albicans* (MARCUCCI, 1996).

Segundo Sena-Lopes et al. (2018), após estudos para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) de uma ação antiprotozoária, a concentração de 200 µg/ mL de óleo essencial de própolis vermelha brasileira foi capaz de reduzir a proliferação do parasita *Trichomonas vaginalis* (ATCC 30236) em 70%. Nesse estudo foi testada a atividade *in vitro* do óleo essencial de própolis vermelha (OEP) em diferentes concentrações, variando de 25 a 500 µg/ mL, mostrando que os

trofozoítos reagiram a ação citotóxica do mesmo onde a concentração de 500 µg/ mL proporcionou 100% de morte dos trofozoítos após 24 h de exposição, demonstrando ser um ótimo anti-Trofozoíto.

O óleo essencial da própolis também demonstrou ótima ação adjuvante no sinergismo com a proteína rCP40 em comparação com os testes dos mesmos componentes, mas de forma isolada. O estudo mostrou que a ação conjunta promoveu aumento nas concentrações de IgG, IgG1 e IgG2a, demonstrando ser um efeito estimulador do sistema imune (SENA-LOPES et al., 2018).

O óleo essencial da própolis vermelha brasileira se constitui, portanto, uma mistura de componentes biologicamente ativos com, dentre outros mecanismos, atividades antiparasitárias e imunoestimuladoras promissoras que precisam ser compreendidas, haja vista que exibe uma boa ação estimuladora da produção de IgG bem como uma promissora ação citotóxica frente a parasitas com um forte potencial para a formulação de novas vacinas e/ou drogas tricomonacidas, tanto na sua ação isolada ou como adjuvante de outros princípios ativos (SENA-LOPES et al., 2018).

Silva et al. (2017) também compararam os efeitos inibitórios de extratos etanólicos de amostras de própolis vermelha, verde e marrom do Brasil frente ao crescimento de *Trypanosoma cruzi*, fato esse confirmado ainda nas primeiras 24 h. No entanto, transcorrido 96 h, a persistência do efeito inibitório foi detectada apenas nos testes com extratos de amostras de própolis vermelha, o que denota um potencial alternativo frente a doença de Chagas.

Outros estudos com extratos de própolis vermelha *in vitro* comprovaram a inibição do crescimento de *Trypanosoma cruzi* e de outros patogênicos protozoários, como *Trypanosoma evansi*, *Giardia* e *Leishmania amazonensis* (PICCINELLI, et al., 2001; SALOMÃO, et al., 2010; GRESSLER, et al., 2012).

Contudo, Castro e Higashi (1995) relataram que a mortalidade, parasitemia ou ainda o tempo de sobrevivência de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* não foram afetados quando os ratos foram alimentados com dietas contendo várias formulações de extratos de própolis, o que demanda pesquisas adicionais sobre a atividade da própolis por vias gástricas para desenvolver uma preparação que demonstre níveis de atividade comparáveis aos observados em testes *in vitro*.

Definir a atividade biológica da própolis requer, antes de tudo, uma gama de conhecimentos sobre sua constituição química e os mecanismos de ação destes constituintes, fato esse impreciso, uma vez que a composição varia de acordo com fatores como o clima, a região, dentre outros, sendo assim, é errado buscar generalizar a natureza dos efeitos biológicos de cada grupo de própolis (PALMA, MALASPINA, 1999).

As inúmeras pesquisas sobre as diversas fontes de própolis, suas propriedades biológicas e suas preparações, refletem a necessidade de tentar resolver o problema de sua padronização, fato que limita o seu uso pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (SILVA et al., 2017).

2.8 Grupos microbianos testados

2.8.1 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria com formato de bastonete, classificada em Gram-Positiva, de crescimento aeróbio e com motilidade flagelar (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A *L. monocytogenes* compõem a família Listeriaceae, que é representada por 8 espécies bacterianas, que são a *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria rocourtiae* e *Listeria marthii* onde, de todas, a *L. monocytogenes* é a que tem gerado mais preocupação para a saúde pública devido suas adaptações aos procedimentos empregados na indústria de alimentos (SWAMINATHAN et al., 2007).

É um bacilo citado como causa de natimortalidade e de doença neurológica em animais, muito antes de ser reconhecido como patógeno humano onde, excretado nas fezes de animais, é amplamente distribuído no solo e na água e, infectando

gestantes, é capaz de provocar aborto espontâneo, natimorte ou danos graves para o feto, ocorrências essas chamadas de listeriose. Na listeriose a gestante, geralmente, sofre sintomas leves, parecidos com os de um resfriado, enquanto o feto poderá ser infectado via placenta, sofrendo com complicações sérias resultantes ou não no seu óbito, enquanto em outros casos os efeitos se manifestam até algumas semanas depois do nascimento, o que pode resultar em dano significativo ao cérebro ou morte do bebê (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

O nome atribuído ao micróbio é derivado da proliferação dos monócitos (um tipo de leucócito), encontrados em alguns animais infectados pelo bacilo e, nos últimos anos, a doença listeriose mudou de uma doença de importância muito limitada para um problema de saúde pública, bem como para a indústria de alimentos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A espécie patogênica do gênero *L. monocytogenes* pode contaminar alimentos, especialmente os lácteos e carnes, devido seu potencial crescimento mesmo em temperaturas de refrigeração, o que pode estar associado a sua alta prevalência, exigindo rigor nos critérios de segurança no fornecimento de alimentos (YANG et al., 2006).

Essa associação com alimentos sugere que a *L. monocytogenes* seja a principal dentre as seis espécies do grupo na transmissão da listeriose humana onde a maioria dos casos notificados são pessoas imunossuprimidas, crianças e gestantes, correspondendo a um potencial de letalidade acima de 30% (ANDRADE et al., 2014).

Estudos relatam a *L. monocytogenes* como um micróbio com potencial ação letal que, quando não leva a óbito, deixa sobreviventes com defeitos físicos e/ou mentais permanentes, possuindo uma ampla gama de hospedeiros já estudados que inclui 37 mamíferos (dentre eles os humanos), 17 espécies de aves, carrapatos, moscas, peixes e crustáceos, somados aos estudos de sua presença em alimentos frescos e refrigerados, água corrente, lama, esgoto, lixo de matadouro, silagem e poeira de enfermaria, com distribuição mundial (GRAY, KILLINGER, 1966).

Segundo Yang et al. (2006), a suscetibilidade da *L. monocytogenes* a extratos etanólicos da própolis tem influência direta da sua concentração, temperatura de

incubação, pH e idade celular onde, em testes variados demonstrou, por exemplo, que o microrganismo foi mais suscetível à temperatura de 37°C e em valores de pH ácido.

A atividade antibacteriana da própolis é maior sobre bactérias do grupo das Gram-positivas, isso devido à concentração de flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos presentes, sem um mecanismo bioquímico exatamente esclarecido. Esse potencial antibacteriano é que instiga as pesquisas da própolis frente a biologia da bactéria *Listeria monocytogenes*, que também é Gram-positiva (MARCUCCI; CUSTÓDIO; PEREIRAL, 2007).

2.8.2 Staphylococcus aureus

Estafilococos é um grupo de bactérias que tipicamente ocorrem aglomeradas e em formato de cacho de uva. A espécie mais importante desse grupo é a *S. aureus*, assim denominada pela pigmentação amarelada das suas colônias, sendo uma bactéria Gram-positiva, com capacidade de produzir ácido a partir de glicose e anaeróbias facultativas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

S. aureus é uma bactéria também encontrada com frequência nas fossas nasais, sendo um organismo tolerante a altas concentrações de cloreto de sódio e que também pode fermentar o carboidrato manitol para formar ácido. Seu potencial de ação conta com o fato de possuir plasmídeos com genes para codificar toxina esfoliativa, o que aumenta a patogenicidade da bactéria (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A *S. aureus* causa uma grande variedade de infecções em humanos, variações de espinhas, furúnculos, pneumonias, intoxicações alimentares e infecções em feridas cirúrgicas, também relatada como uma importante causa de infecções hospitalares. Uma das primeiras tentativas de tratamento frente às infecções provocadas por essa bactéria foi o uso da penicilina, mas logo linhagens resistentes à penicilina tornaram-se a principal ameaça nos hospitais na década de 1950, o que levou a adoção da meticilina (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Na década de 1980, *S. aureus* resistentes à metilina, as chamadas MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*), surgiram e tornaram-se endêmicos em muitos hospitais, provocando o uso de vancomicina como tratamento principal. Já no final da década de 1990, infecções por *S. aureus* menos suscetíveis à vancomicina (*S. aureus* com sensibilidade intermediária à vancomicina, ou VISA, de vancomycin-intermediate *S. aureus*) foram relatadas, sendo que logo em 2002, foi relatada a ocorrência de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA, de vancomycin-resistant *S. aureus*) causadora de infecção em uma paciente nos Estados Unidos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Há décadas, *S. aureus* acompanha a humanidade, se adaptando e requerendo novos estudos em torno de drogas capazes de conter sua patogenicidade.

2.8.3 *Streptococcus mutans*

A *Streptococcus mutans* é uma bactéria gram-positiva fortemente associada ao início da formação da cárie e, provavelmente, a bactéria cariogênica que mais desperta estudos quanto a sua influência na saúde humana. Trata-se do patógeno mais significativo dentre o grupo de estreptococos alfa-hemolíticos, capaz de metabolizar uma variedade maior de carboidratos que qualquer outro organismo gram-positivo e que, apesar de outras espécies de estreptococos também terem ação cariogênica, essas são menos importantes, haja vista que seu potencial de iniciação das cáries é menor (DE-CARLI et al., 2010; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A *S. mutans* favorece a proliferação de cáries especialmente nos sítios onde o controle mecânico de higienização, a ação dispersiva da mastigação ou da ação de lavagem promovida pelo 1L aproximadamente de saliva produzida diariamente são falhos, favorecendo a formação de um biofilme dental potencialmente cariogênico (DE-CARLI, et al., 2010).

A bactéria sobrevive, em especial, fixa à superfície dos dentes, através de seu glicocálice e tem ainda a habilidade de usar sua cápsula como fonte de nutrição

degradando-a e utilizando os açúcares, quando na falta de nutrientes, obtendo energia para continuar sua ação. A ação fixadora promovida pelo glicocálice é resultado da enzima bacteriana, a glicosiltransferase, que é responsável por converter a glicose (derivada da sacarose ou açúcar de mesa) em um polissacarídeo aderente denominado dextrana, que faz parte do glicocálice da bactéria e tem ação aderente (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

E como um agravante, células bacterianas de *Actinomyces* produzem fímbrias capazes de se aderirem ao glicocálice da *S. mutans*. A ação combinada das duas bactérias, mais o polissacarídeo aderente (dextrana) constitui a placa dentária e contribui para a deterioração do dente (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

2.8.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um habitante da flora normal do intestino grosso dos vertebrados, incluindo humanos, e sua presença é importante, pois ajuda na produção de certas vitaminas e participa da digestão de alimentos que não seriam digeridos sem a sua presença. Contudo, a linhagem chamada de *E. coli* O157:H7, causadora de diarreia sanguinolenta, conhecida desde 1982, tem sido tratada como um problema de saúde pública e é considerada como uma das principais causas de diarreia no mundo (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

A *E. coli* é um dos micro-organismos mais prolíficos no trato intestinal humano e suas linhagens patogênicas produzem fímbrias especializadas que permitem adesão a certas células do epitélio intestinal, tendo sua ação baseada na produção de enterotoxina causadora de secreção de grandes quantidades de fluidos e eletrólitos, o que resulta no Quadro de diarreia, além de também ter a capacidade de produzir invasina que é uma proteína de superfície que provoca rearranjo de filamentos de actina proximais no citoesqueleto de uma célula hospedeira, facilitando sua fixação e patogenicidade (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Se caracteriza como uma bactéria comensal do intestino, podendo causar diarreias, mas também podendo causar doenças fora dele, como infecções urinárias. Isso é possível devido a fatores de virulência dessas bactérias, genes de resistência a antibióticos, além da capacidade de, através do canal uretral, atingir a bexiga, como decorrência da proximidade do ânus com o canal urinário e da falta de bons hábitos de higiene, e em situações mais graves, podendo atingir os rins, corrente sanguínea e causar sepse (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

3 METODOLOGIA

A pesquisa trabalhou abordagens quali-quantitativas, de objetivo exploratório, descritivo e explicativo e foi desenvolvida através de levantamento de referencial teórico, visitas *in loco*, coleta de amostras e procedimentos experimentais padronizados a fim de verificar a significância das hipóteses construídas.

3.1 Classificação da pesquisa

A pesquisa iniciou com abordagens qualitativas acerca dos aspectos de manejo e caracterização da abelha *Scaptotrigona affinis postica* através de levantamento de referencial teórico, mas de forma a fortalecer os dados obtidos foram realizados procedimentos experimentais quantitativos de caracterização microbiológica do material coletado (própolis da abelha) onde a integração do dados constituiu um aspecto importante pelo caráter complementar que as duas abordagens proporcionam (CHEMIN, 2015).

No que se refere aos aspectos qualitativos a pesquisa visou relatar a importância da *S. aff. postica* para o manejo praticado na meliponicultura, relacionando com os registros da medicina natural, bem como com dados sobre as características naturais autóctones. Já nos aspectos quantitativos a pesquisa focou

no desenvolvimento de práticas *in vitro* que avaliassem a ação antimicrobiana exercida por princípios bioativos presentes nas amostras de própolis coletadas, buscando correlações com as indicações farmacológicas descritas nos referenciais teóricos, através de testes laboratoriais para colônias das bactérias Gram-Positivas *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e da bactéria Gram-Negativa *Escherichia coli*.

Sendo assim, a pesquisa se configurou como exploratória, descritiva e explicativa pois buscou em dados bibliográficos explorar, compreender e descrever as características das vivências em torno da meliponicultura bem como suas correlações com a problemática da medicina natural e o emprego farmacológico da própolis produzida pela abelha *S. aff. postica*, através de procedimentos laboratoriais que investigassem e contribuíssem para a compreensão dos fatos e variáveis levantadas (CHEMIN, 2015).

3.2 Local da pesquisa

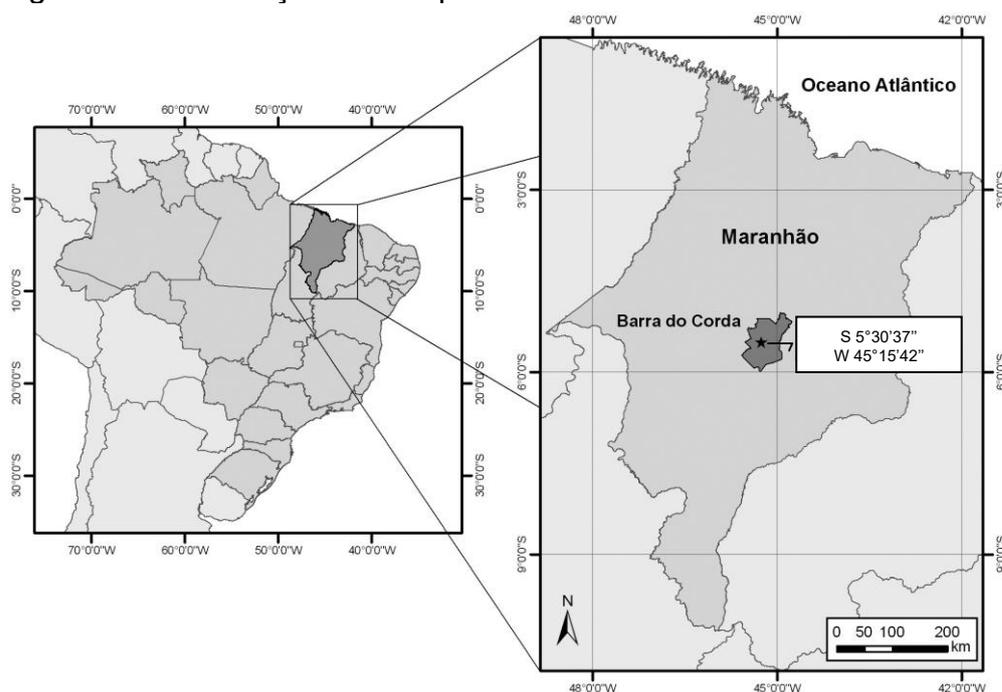
A própolis foi obtida das atividades ecológicas de abelhas *S. aff. postica* (LATREILLE, 1807) manejadas em meliponário da cidade de Barra do Corda/ MA, sendo a coleta realizada no mês de julho de 2019. O meliponário está instalado numa área de aproximadamente um hectare que também é utilizada para o cultivo doméstico de plantas frutíferas e a, aproximadamente, 100 m do Rio Mearim, onde se encontra uma estreita faixa de mata ciliar nas duas margens do rio (SOUZA et al., 2015).

A coleta foi realizada no meliponário Nº 01 dentre os 16 meliponários instalados numa área de 1.100 m², às margens do Rio Mearim, localizado com coordenadas geográficas S 5°30'37", W 45°15'42" na cidade de Barra do Corda, Estado do Maranhão (Figura 6), região centro sul do estado, a 450 Km da capital São Luís, sendo uma cidade localizada numa área característica de Cerrado, com clima

quente e úmido e banhada por dois rios perenes o Rio Corda e o Rio Mearim (IBGE, 2019).

As amostras foram acondicionadas em coletores opacos e estéreis, similares aos utilizados para coletas em laboratório de análises clínicas, pesadas e armazenadas sob refrigeração, cerca de 8°C, a fim de evitar contaminações.

Figura 6 – Localização do Meliponário/ Barra do Corda – MA



Fonte: SOUZA et al., 2015.

3.3 Instrumentos da pesquisa

Como instrumentos de pesquisa foram selecionados a realização levantamento de referencial teórico, coletas *in loco*, registros fotoGráficos, obtenção e caracterização físico e química de extratos etanólicos de própolis, realização de testes *in vitro* para a confirmação de ação antimicrobiana das amostras obtidas e análise estatística dos dados quantitativos onde, para isso:

- Realizou-se pesquisas no Science Direct e Portal de Periódicos da CAPES/MEC, Google Scholar, fazendo uso dos seguintes Operadores Boleanos: Difusão em Disco AND Própolis; Teste de Sensibilidade Antimicrobiana AND Própolis; Própolis AND Brasil; Própolis AND Abelha nativa; Própolis AND *Listeria monocytogenes*; Meliponicultura AND Brasil; TSA AND Própolis; Disco Difusão AND Própolis; Staphylococcus aureus AND Disco difusão; Streptococcus AND Disco difusão; *Scaptotrigona* AND Antimicrobiana; Caracterização AND Própolis AND *Scaptotrigona*.

- Foram coletadas amostras de própolis de colmeias de *Scaptotrigona affinis postica*;

- O extrato etanólico, bem como suas diluições, foram elaborados nos Laboratórios de Química e de Microbiologia da Univates/ RS;

- As análises para caracterização do extrato etanólico da própolis e da própolis bruta foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais e de Neuroquímica Experimental da Universidade Federal do Piauí – UFPI;

- Procedeu-se com os Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) em Placas de Petri, submetidas a Difusão em Disco, nos Laboratórios de Química e de Microbiologia da Univates/ RS;

- A tabulação estatística foi realizada com o software Excel e BioEstat 5.3.

3.4 Coleta das amostras de própolis

As amostras foram coletadas por raspagem das bordas internas da tampa da colmeia, sendo o material acondicionado em potes plásticos, opacos e secos, com identificação da colmeia, em posterior levado ao laboratório.

Foi então realizada a pesagem do material coletado, em bancada analítica, totalizando 276,491 g de própolis bruta, que foi mantida sob o abrigo da luz, em

congelador, até os procedimentos para a obtenção do EEP. A coleta foi realizada com vestimenta adequada e com uso de EPI's apropriados ao manejo de abelhas.

3.5 Análises físico-química e microbiológicas com própolis

As amostras foram submetidas à formação de extratos, diluição dos mesmos, análises de caracterização físico-química e testes de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão, como segue:

3.5.1 Obtenção do Extrato Etanólico da Própolis (EEP)

As amostras foram submetidas à limpeza para a retirada de qualquer tipo de material estranho, triturada (ralada) e, posteriormente, direcionada para procedimentos de elaboração do seu extrato etanólico, sendo a própolis triturada e extraída a frio com agitação mecânica tendo como solvente a utilização de etanol absoluto.

Nessa etapa foram utilizadas 100 g de própolis para cada 1000 mL de etanol absoluto, ficando em repouso por 24 h, sendo esse processo repetido por três vezes, seguido da filtração e rotaevaporação, obtendo-se o extrato seco. O extrato etanólico de própolis (EEP) foi então guardado sob refrigeração, aproximadamente a 8 °C, até o momento dos ensaios fitoquímicos.

O uso de extratos etanólicos da própolis tem demonstrado ação inibidora do crescimento das bactérias uma vez que, previne a divisão celular e produz defeitos na estrutura da parede bacteriana, além de promover desorganização citoplasmática, alterações na membrana plasmática e inibir a síntese de proteínas (TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER, 1994).

3.5.1.1 Diluição dos extratos

Para obtenção da diluição do extrato etanólico foi pesado 0,2 g do EEP, acrescentando parcelas de álcool de cereais puro e realizando agitação constante com o auxílio de uma espátula metálica. Cada porção diluída foi então transferida para um balão volumétrico de 10 mL, até obter-se a diluição total do valor pesado e atingir-se a marca de 10 mL do volume do balão.

Ao final se obteve um diluído de 20 mg/mL à partir do extrato de própolis e para análise de diferentes concentrações do extrato foi realizada a diluição seriada do mesmo, obtendo-se concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL.

3.5.2 Caracterização sensorial da Própolis Bruta e EEP

Para fins de caracterização as amostras foram submetidas a provas sensoriais realizadas por três pesquisadores voluntários no Laboratório de Produtos Naturais da UFPI/ Teresina-PI onde, cada provador, avaliou os critérios aroma, cor, sabor, consistência e granulometria para a própolis bruta, bem como avaliou aroma, cor, sabor e aspecto para o EEP de acordo critérios da Instrução Normativa N° 3.

Os resultados foram anotados e submetidos a comparação com a finalidade de se obter um consenso prevalente sobre as opiniões declaradas.

3.5.3 Caracterização físico-química de EEP e da Própolis Bruta

3.5.3.1 Determinação do teor de umidade para amostras de EEP e Própolis Bruta

A avaliação do teor de umidade foi realizada de acordo com a metodologia para análise físico-química de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008), com adaptações, de modo que foi inicialmente pesado um cadinho vazio (C), seguido do registro do valor do cadinho com amostra úmida (CAU), sendo registrado o equivalente a 2 g de amostra.

Findada a etapa anterior, iniciou-se a realização do teste do teor de umidade propriamente dito. Nessa etapa o cadinho contendo a amostra úmida foi colocado dentro de uma estufa de secagem onde foi submetido a uma temperatura de 105 °C e nela permaneceu por aproximadamente 6 (seis) horas para que a água presente no alimento fosse evaporada.

Findado a etapa do CAU na estufa, o mesmo foi transferido para um dessecador, onde permaneceu até serem completadas 24 (vinte e quatro) horas da primeira pesagem. Transcorridas as 24 (vinte e quatro) horas, com o auxílio de um papel e de forma ágil, o cadinho com a amostra foi pesado em balança analítica e efetuou-se o registro do valor obtido.

Essa mesma amostra retornou para a estufa à 105 °C por uma hora, sendo em seguida disposta em dessecador até atingir a temperatura ambiente para, só então, ser novamente pesada em balança analítica.

A etapa anterior foi sucessivamente repetida até que duas pesagens consecutivas não demonstrassem mais variações significativas em seus valores (não exceder 5,0 mg). O peso seco final foi então registrado e utilizado para determinação do teor da umidade presente na amostra (M%), como segue.

Para a determinação do teor da umidade presente na amostra (M%) fez-se uso da respectiva fórmula:

$$M\% = (CAU - CAS) \times 100 / (CAU - C)$$

Onde:

M% = Percentual de umidade da amostra

CAU = Peso do cadinho contendo a amostra úmida

CAS = Peso do cadinho contendo a amostra seca

C = Peso do cadinho vazio

3.5.3.2 Análise do teor de cinzas para amostras de EEP e Própolis Bruta

A avaliação do teor de cinzas da amostra foi realizada de acordo com a metodologia para análise físico-química de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008), com adaptações.

Após término da avaliação do teor de umidade, o cadinho com o produto residual que estava no dessecador foi transferido para um forno tipo mufla, sendo submetido a aquecimento a 550 °C, permanecendo até que a amostra no cadinho apresentasse coloração branca ou cinza claro.

Após, a mufla foi desligada, aguardou-se a temperatura reduzir para 200 °C, sendo o cadinho com as cinzas disponibilizado num dessecador, onde foi mantido até atingir a temperatura ambiente.

Decorrido o tempo de redução da temperatura o cadinho com as cinzas (CAC) foram pesados e os valores obtidos utilizados para determinação do percentual de cinzas da amostra (C%), de acordo fórmula à seguir:

$$C\% = (CAC - CA) \times 100 / (CAA - CA)$$

Onde:

C% = Percentual de cinzas da amostra

CA = Peso do cadinho vazio (g)

CAA = Peso do cadinho com amostra (g)

CAC = Peso do cadinho com as cinzas

3.5.3.3 Determinação do teor de fenóis totais para amostras de EEP e Própolis Bruta

O teor de fenóis do EEP e da própolis bruta da *S. aff. postica*, nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, foi determinado por meio do ensaio de Folin-Ciocalteu descrito por Tambe e Bhambar (2014), como a seguir.

Inicialmente adicionou-se em tubos de ensaio 100 µL de cada amostra a ser analisada (EEP nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL e Própolis Bruta nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL) e para cada uma realizou-se as seguintes etapas: adicionou-se 900 µL de água destilada e 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, agitou-se a mistura. Após 5 minutos, 1 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7%, ao final adicionou-se 5 mL de água destilada.

Incubou-se por 40 minutos à temperatura ambiente e as absorbâncias foram lidas a 750 nm em espectrofotômetro ultravioleta (UV)/ Visível.

Uma solução padrão de Ácido Gálico foi preparada nas concentrações de 40, 80, 120, 160, 200 µg/mL, nas mesmas condições descritas anteriormente. A partir desta foi preparada a curva padrão de Ácido Gálico ($r = 0,994$), a qual foi utilizada para determinação de fenóis totais nas amostras analisadas.

As análises foram realizadas em quadruplicata com resultados expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g da amostra (EEP e Própolis Bruta).

3.5.3.4 Determinação do teor de flavonoides totais para amostras de EEP e Própolis Bruta

O teor de flavonoides foi analisado através do ensaio colorimétrico de Cloreto de Alumínio (AlCl_3) descrita por Tambe e Bhambar (2014), com adaptações.

O ensaio consistiu em adicionar em tubos de ensaios 500 μL (5 mg/mL) das amostras, com 2 mL de água destilada e 150 μL de nitrito de sódio a 5% (NaNO_2), após 5 minutos adicionou-se 150 μL de AlCl_3 a 10%, após 5 minutos 1 mL de Hidróxido de Sódio 1M (NaOH) e completou-se o volume final com água destilada para 5 mL. Logo em seguida realizou-se as leituras a 510 nm no espectrofotômetro ultravioleta (UV)/ Visível.

A etapa anteriormente descrita foi executada para amostras de EEP e Própolis Bruta nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, sendo utilizado uma solução padrão de quercetina como referência, nas concentrações de 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g/mL}$, preparadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

O teor de flavonoides foi expresso em mg de QE/100 g da amostra (EEP e própolis bruta), com análise realizada em quadruplicata e os resultados obtidos extrapolados numa curva analítica padrão de quercetina ($r = 0,992$).

3.5.3.5 Determinação do índice de oxidação para amostras de EEP e Própolis Bruta

O índice de oxidação das amostras foi determinado de acordo Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) através da pesagem de 0,2 g de amostra, posteriormente dissolveu-se a pesagem anterior em 5 mL de álcool etílico e foi deixada em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, foram acrescentados 100 mL de água destilada e a solução foi filtrada em papel de filtro n° 3.

Do filtrado obtido foi transferido 1 mL de cada amostra para um béquer de 250 mL sendo adicionado a essa amostra 40 mL de água destilada e 1,0 mL do ácido sulfúrico 20%. A mistura foi agitada por 1 minuto e depois foi acrescentado 5 μL de permanganato de potássio 0,1 N.

As amostras de EEP e Própolis Bruta foram analisadas nas concentrações de 1 e 2 mg/mL sendo que, logo após a adição do permanganato de potássio e com o auxílio de um cronômetro, foi aferido o tempo, em segundos, necessário para o desaparecimento da cor rosa, a qual determina o índice de oxidação (BRASIL, 2001; FÓRUM NACIONAL DE AGRICULTURA, 1997).

3.5.4 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco de Difusão para amostras de EEP e Própolis Bruta

Foram realizados testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* através do estudo dos halos de inibição pelo Método de Difusão em Disco (MDD) e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (CLSI, 2015).

Para a avaliação de sensibilidade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* repicadas em 20 mL de Ágar Müller Hinton (MH) vertido em placas de Petri, um dia antes de realizar o experimento, sendo mantidas em estufa bacteriológica à 37 °C (BrCAST, 2018).

As cepas liofilizadas foram ressuspendidas em MH (algumas são colocadas em Skim Milk, com vistas a reduzir danos do processo de estocagem: congelamento e descongelamento) e então são congeladas (a -80 °C) para posteriores usos (CLSI, 2015).

Nessa etapa preparou-se também as placas de Petri (90 mm x 15 mm) a serem usadas no teste que, previamente esterilizadas, receberam 20 mL de ágar MH (também estéril e resfriado), ficando com uma espessura de aproximadamente 3 mm, sendo, em seguida, armazenadas em estufa bacteriológica a fim de avaliar possível proliferação microbiana, o que indicaria contaminação prévia do material. No dia seguinte ao repique e preparo das placas com meio de cultura, estas (caso não contaminadas) foram inoculadas.

Utilizou-se como controle positivo discos de papel filtro embebidos do antibiótico Ciprofloxacino a 60 µg/mL, além de discos com alíquotas de álcool de cereais e, como controle negativo, utilizou-se discos com água estéril (10 µL de cada controle testado).

As cepas bacterianas de referência utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana e da Concentração Inibitória Mínima (CBM) foram linhagens padrão American Type Culture Collection (ATCC) de: *Listeria monocytogenes* (7644, 13932 e 19114), *Staphylococcus aureus* (25923), *Streptococcus mutans* (25175) e *Escherichia coli* (25922).

3.5.4.1 Preparo da suspensão microbiana (Inóculo)

O inóculo bacteriano foi ajustado com salina 0,85% (solução salina 0,85 a 0,9%).

Algumas colônias foram retiradas da placa repicada um dia anterior ao teste, distribuídas em tubo contendo 10 mL de salina e homogeneizadas em vortex. Uma parcela do homogeneizado foi disposto em cubeta e submetido à leitura de absorbância em espectrofotômetro (UV/ VIS), com salina como branco, em 625 nm. A absorbância registrada foi entre 0,08 e 0,10, a qual corresponde à concentração de 1×10^8 UFC, ou seja, a 0,5 na escala de McFarland (CLSI, 2015).

3.5.4.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana/ Método de Disco-Difusão (MDD)

A análise da sensibilidade antimicrobiana pelo método de disco de difusão se deu através da semeadura de placas de Petri, com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis e descartáveis, sendo o inóculo previamente padronizado em ágar MH. Todas as placas receberam a mesma quantidade do inóculo já ajustado (100 µL), a fim de evitar diferenças na semeadura, sendo o mesmo espalhado uniformemente por toda a superfície do ágar com o auxílio da alça de inoculação.

Para cada ATCC avaliada foram montadas oito placas de Petri, sendo uma para avaliação do controle positivo (Ciprofloxacino 60 µg/mL), uma para avaliação de cada diluente utilizado (álcool 70%, álcool de cereais puro e água destilada) e uma placa para avaliação de cada concentração obtida a partir da diluição do EEP (0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL e 2 mg/mL).

O teste foi realizado em triplicata, ou seja, em cada placa foram dispostos três discos equidistantes, de aproximadamente 7 mm cada, contendo o mesmo volume de componente a ser testado (10 µL) e na mesma concentração. Os discos foram dispostos firmemente na superfície da placa de ágar MH garantindo que mantenham completo contato com a superfície do ágar, empregando leve pressão com a ponta da pinça e, uma vez aplicados, os discos não puderam mais ser removidos dado que já haveria iniciado a difusão dos agentes impregnados para testagem (BrCAST, 2018).

Para a *Listeria monocytogenes* optou-se por pipetar a solução sobre os discos dispostos em placa de Petri aberta, a fim de promover a evaporação do álcool, em seguida foram mantidos em estufa, para secagem final da solução, só então foram dispostos sobre a placa de Petri semeada com o inóculo. Para a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* optou-se por pipetar a solução a ser testada diretamente sobre os discos já dispostos na placa semeada com o inóculo.

Após aplicação dos discos, as placas foram dispostas na estufa bacteriológica na posição invertida, assegurando que os discos não caíssem da superfície do ágar. A incubação foi providenciada em até 15 minutos após a aplicação dos discos obedecendo as condições específicas para o microrganismo estudado (*Listeria monocytogenes*, 35 ± 1 °C em ar com 4-6% de CO por 16-20 h; *Staphylococcus aureus*, 35 ± 1 °C em ar por 16-20 h; *Streptococcus mutans*, 35 ± 1 °C em ar com 4-6% de CO por 16-20 h) (BrCAST, 2018).

3.5.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As placas com culturas de ágar Müeller-Hinton foram lidas observando a superfície contendo os discos, sob a luz refletida, analisando as bordas dos halos nos pontos de completa inibição do crescimento, vistas a olho nu, com a placa posicionada a cerca de 30 cm dos olhos (BrCAST, 2018).

A atividade antimicrobiana foi mensurada pela aferição do diâmetro (mm) da zona de inibição (halo) formada ao redor de cada disco, utilizando-se uma régua milimetrada. Na interpretação dos resultados foi evitado a sobreposição de halos e a interferência de mais de um agente antimicrobiano na mesma porção da placa de Petri (FERRONATTO et al., 2007).

Considerou-se como Concentração Inibitória Mínima a menor concentração empregada em disco que tenha promovido a formação de halo de inibição.

3.5.4.4 Substância empregada como padrão antimicrobiano

O padrão de antibiótico utilizado para verificação da atividade antimicrobiana foi o Ciprofloxacino a 60 µg/mL, com procedimento descrito a seguir.

A preparação da solução de antibiótico foi realizada em capela de fluxo laminar. Abriu-se cuidadosamente o frasco de colírio de ciprofloxacino 0,3% (3 mg de ciprofloxacino base em 1 mL de colírio) e retirou-se 200 µL (equivalente a 600 µg de ciprofloxacino). O volume retirado de colírio de ciprofloxacino foi adicionado a um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com água ultrapura, previamente autoclavada. Desta forma, a concentração da solução de antibiótico resultou em 60 µg/mL, sendo considerada a MIC do antibiótico.

Após o preparo da solução, a mesma foi acondicionada em tubo eppendorf, devidamente identificado, e conservado em geladeira.

3.5.4.5 Controle do diluente

Foi utilizado como diluente o álcool de cereais puro.

O mesmo também foi testado, sendo pipetado 10 μ L em discos de papel filtro e avaliado sua ação sobre as bactérias estudadas.

3.6 Tratamento estatístico dos dados

Os dados foram tabulados inicialmente em planilhas do Excel afim de obter-se as médias e desvios padrão necessários. O software Excel também foi utilizado para os cálculos referentes ao índice de umidade e cinzas e o ajuste à curva de calibração dos valores de absorvância para os testes de teores de fenóis e de flavonoides nas amostras de própolis bruta e de extrato etanólico da própolis.

Com o auxílio do software BioEstat 5.3 foi realizado o Teste de Análise de Variância (ANOVA): um critério (Tukey, com nível de significância de 5%, admitindo $p \leq 0,05$), para avaliar as diferenças significativas entre os valores encontrados para os halos de inibição formados no teste de sensibilidade antimicrobiana.

3.7 Tratamento do material microbiológico

As bactérias que foram utilizadas na pesquisa geraram resíduos em saúde classificados como (GRUPO A). As culturas e estoques de microrganismos, e instrumentais utilizados para transferência e inoculação, foram monitorados no

laboratório gerado e acondicionados de maneira compatível com o processo de tratamento a ser utilizado. Foi adotado como tratamento para obtenção da eliminação da carga microbiana, o procedimento de autoclavagem. O processo de autoclavagem aplicado garantiu a eficácia dos equipamentos mediante controles químicos e biológicos periódicos devidamente registrados (ANVISA, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Vários estudos sobre as propriedades bioativas da própolis de Meliponinas do Brasil têm sido realizados no intuito de elencar quais atividades biológicas são resultados de sua composição (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, imunomoduladora, anticancerígena, dentre outras) e quais substâncias são responsáveis por essas atividades. Adelman (2005), por exemplo, já havia afirmado que o teor de componentes fenólicos e de flavonóides, mesmo presente em pequenas concentrações, podem ser os responsáveis pela própolis apresentar tais propriedades.

Mesmo a abelha *Scaptotrigona aff. postica* sendo citada, por exemplo, em estudos frente a formas de câncer, como no combate a tumores de Ehrlich em camundongos (ARAUJO et al., 2010), e em estudos sobre seu vasto potencial polinizador, indicando que esta é uma espécie excepcional na coleta de compostos químicos da natureza, fato esse que também é importante para a manutenção da biodiversidade nos ecossistemas (SOUZA et al., 2015), o extrato da própolis da referida abelha não apresentou resultados satisfatórios na presente pesquisa frente aos grupos microbianos testados, como descrito a seguir.

4.1 Características sensoriais da Própolis Bruta e do EEP

As amostras da própolis bruta possuíam aroma característico resinoso, com coloração em tom marrom, sabor característico forte e amargo, consistência rígida à temperatura ambiente e granulometria heterogênea.

Já o extrato etanólico das amostras da própolis possuía aroma característico resinoso, de coloração em tons de âmbar, sabor característico forte e amargo e com aspecto pastoso, límpido e homogêneo.

Dutra et al., 2008, em análises sobre a geoprópolis e seus extratos hidroalcoólicos (EHA) da abelha nativa *Melipona fasciculata* Smith (nome comum - Tiúba), da baixada maranhense (cidades de Arari, São João Batista e São Bento), classificaram sete amostras de geoprópolis como de aroma inodoro, com cor marrom escuro (típico de geoprópolis devido a presença de materiais terrosos) e sabor amargo. Quanto aos EHA's o aroma variou de resinoso a adocicado, com coloração marrom escuro e de sabor variando entre amostras insípidas, resinosas, picante ou amargas.

A coloração da própolis varia em função da sua procedência, manifestando tons que vão desde o marrom escuro, tons esverdeados até o marrom avermelhado, com um odor característico e também variável, assim como também existem própolis sem nenhum odor. O sabor pode variar de suave balsâmico a forte e picante, estando intimamente dependente de sua origem botânica (MARCUCCI, 1996).

4.2 Teor de umidade e cinzas

Avaliar o teor de umidade das amostras é importante para se ter entendimento, principalmente, sobre as possibilidades de proliferação de fungos. Teores médios muito elevados de umidade na própolis estão associados a

armazenamento inadequado, em especial quando não refrigerada, ou ainda como resultado da ação de fatores ambientais, o que favorece o crescimento fúngico, inviabilizando o consumo, comercialização, transporte ou mesmo sua manipulação farmacológica (WOISKY, 1996; MARCUCCI et al., 1998; MARCUCCI, BANKOVA, 1999).

Nesse sentido, conforme Tabela 1, o teor médio de umidade da amostra de EEP avaliada neste trabalho foi de 8,20%, onde para a mesma, não há valores estabelecidos pela Instrução Normativa Brasileira N° 03 (BRASIL, 2001), nem tampouco foram encontradas pesquisas com valores sobre essa mesma característica em EEP da mesma abelha.

No que se refere a determinação do teor de umidade para a própolis bruta o resultado encontrado foi de 9,19% (Tabela 2), ou seja, acima do delimitado pela Instrução Normativa N° 3 que prevê um valor máximo de 8%. Tal resultado diverge dos resultados obtidos por Oliveira et al., (2015) em estudos com a própolis bruta de abelhas nativas da região amazônica no período entre outubro de 2013 a janeiro de 2014, onde para a *Scaptotrigona* sp. o valor encontrado foi de 6,58% \pm 0,20.

O valor da umidade encontrada na própolis bruta também se mostrou maior do que o valor encontrado no extrato etanólico da mesma fonte de própolis, isso porque parte da umidade do extrato também é perdida durante as etapas realizadas no rotaevaporador. Além disso, neste trabalho foram analisadas amostras de própolis colhidas no mês de julho de 2019, período caracterizado com chuvas esporádicas e que marcam o fim do período de fortes chuvas vivido pela cidade de Barra do Corda – MA (cidade da coleta) e região, podendo ser o motivo da obtenção de um valor acima do previsto pela normativa brasileira para o limite de umidade na própolis bruta.

Quanto ao teor de cinzas, foram encontradas 2,68% e 5,67% de cinzas no extrato etanólico da própolis e na própolis bruta respectivamente (Tabelas 1 e 2, respectivamente), sendo que não há valor de referência preconizado para a análise de extrato etanólico da própolis, enquanto a própolis bruta se mostrou acima do limite máximo da normativa brasileira, onde o padrão é de no máximo 5% (m/m).

Segundo Franco et al. (2000), teores elevados de cinzas encontrados em amostras de própolis são resultados, provavelmente, das impurezas naturais encontradas como contaminantes da própolis, muitas derivadas do habitat natural das abelhas uma vez que essas têm a habilidade de coletar elementos variados no ambiente, divergindo dos produtos de origem botânica.

Tabela 1 – Teor de umidade e teor de cinzas médios do extrato etanólico de própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica*, Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020, expressos em média e desvio padrão, em função de padrões de qualidade nacional

Características	Média ± DP	BRASIL ^a
Umidade (%)	8,20 ± 0,25	-
Cinzas (%)	2,68 ± 0,64	-

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: (-): padrão não requerido; DP: desvio padrão; EEP: extrato etanólico da própolis

^a Valor preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001)

Tabela 2 – Teor de umidade e teor de cinzas médios da própolis bruta de *Scaptotrigona* aff. *postica*, Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020, expressas em média e desvio padrão, em função de padrões de qualidade nacional

Características	Média ± DP	BRASIL ^a
Umidade (%)	9,19 ± 0,02	Máx. 8% (m/m)
Cinzas (%)	5,67 ± 1,21	Máx. 5% (m/m)

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: DP: desvio padrão; Máx.: máximo

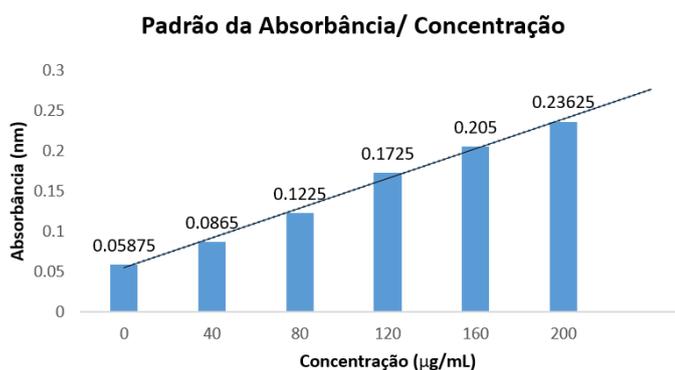
^a Valor preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001)

4.3 Teor de fenólicos e flavonoides totais

O estudo do percentual de compostos fenólicos totais presente nas amostras estudadas foi realizado com base na quantificação do composto ácido gálico, sendo estudado em seis níveis diferentes de concentração (de 0 a 200 µg/mL) obtendo a equação linear $y = 0,0369x + 0,0176$ ($R^2 = 0,994$), conforme Gráfico 1. Já o estudo do

teor de flavonoides totais nas amostras foi realizado com base na quantificação da quercetina, sendo estudada em seis níveis diferentes de concentração (de 0 a 200 µg/mL) e a equação linear obtida foi $y = 0,0363x - 0,0239$ ($R^2 = 0,992$), conforme Gráfico 2.

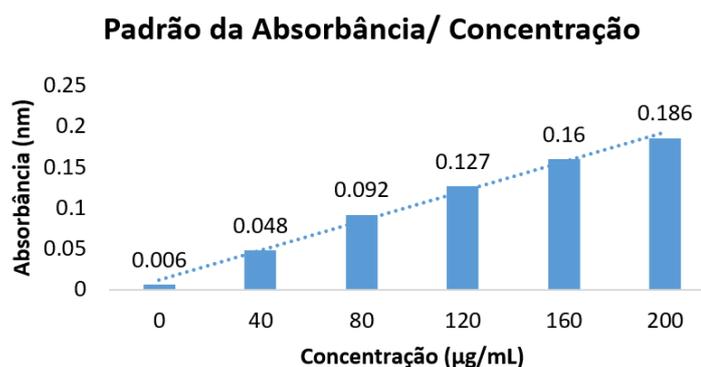
Gráfico 1 – Curva de calibração do ácido gálico pelo método de espectrofotometria UV/Vis



Fonte: Do autor (2020).

Legenda: Medidas de absorbância em 750 nm, com curva analítica expressa em $y = 0,0369x + 0,0176$ com $r = 0,994$

Gráfico 2 – Curva de calibração da quercetina pelo método de espectrofotometria UV/Vis



Fonte: Do autor (2020).

Legenda: Medidas de absorbância em 510 nm, com curva analítica expressa em $y = 0,0363x - 0,0239$ com $r = 0,992$

O teor de compostos fenólicos totais encontrado nas amostras de EEP nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL foi de $1,42 \pm 0,07$ mg de EAG/100 g de EEP e $2,70 \pm 0,20$ mg de EAG/100 g de EEP, respectivamente (Tabela 3), enquanto que para a própolis bruta foi de $1,54 \pm 0,09$ mg de EAG/100 g de PB e $2,10 \pm 0,18$ mg de

EAG/100 g de PB, também nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente (Tabela 4).

Já os teores de flavonoides totais encontrado no EEP foram de $13,08 \pm 0,31$ mg de QE/100 g de EEP e $26,46 \pm 0,41$ mg de QE/100 g de EEP para testes com as concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente (Tabela 3), enquanto que os teores obtidos para a própolis bruta foi de $7,15 \pm 0,33$ mg de QE/100 g de PB e $13,09 \pm 0,17$ mg de QE/100 g de PB, também nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente (Tabela 4).

Esses grupos de compostos são importantes na caracterização das amostras estudadas haja visto que são citados como responsáveis pela bioatividade da própolis com destaque para a ação antioxidante. Os flavonoides são os antioxidantes mais presentes e abundantes em própolis, o que está relacionado ao fato desse grupo de substâncias também ser abundante nos vegetais, conferindo aos mesmos proteção antimicrobiana, ação antioxidante, controle de atividade enzimática, dentre outras ações, e dentre os flavonoides a quercetina é uma das substâncias de maior destaque (MARKHAM, 1982; YAMAUCHI et al., 1992; ZUANAZZI, 1999; MORENO et al., 2000; NAGAI et al., 2001).

A análise realizada com o EEP e a própolis bruta da *Scaptotrigona aff. postica* de Barra do Corda – MA revelaram teores maiores de flavonoides totais quando em comparação com o teor de fenóis totais nas amostras aqui estudadas, conforme valores descritos nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

Tabela 3 – Teores de fenólicos e flavonoides totais presentes no extrato etanólico de própolis de *Scaptotrigona aff. postica*, Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020

Amostras	Fenólicos totais (mg de EAG/ 100g de EEP) Média ± DP	Flavonoides totais (mg de QE/ 100g de EEP) Média ± DP
1 mg/mL de EEP	$1,42 \pm 0,07$	$13,08 \pm 0,31$
2 mg/mL de EEP	$2,70 \pm 0,20$	$26,46 \pm 0,41$

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: EAG: equivalente ácido gálico; QE: equivalente quercetina; EEP: extrato etanólico da própolis

Tabela 4 – Teores de fenólicos e flavonoides totais presentes na própolis bruta de *Scaptotrigona aff. postica*, Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020

Amostras	Fenólicos totais (mg de EAG/ 100g de própolis bruta) Média ± DP	Flavonoides totais (mg de QE/ 100g de própolis bruta) Média ± DP
1 mg/mL de Própolis bruta	1,54 ± 0,09	7,15 ± 0,33
2 mg/mL de Própolis bruta	2,10 ± 0,18	13,09 ± 0,17

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: EAG: equivalente ácido gálico; QE: equivalente quercetina

Segundo Silva et al. (2016), em estudo sobre oito amostras coletadas de geoprópolis da meliponina *Plebeia aff. flavocincta* da zona rural da Serra do Mel e da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, relatando que duas amostras (F e G) se destacaram por apresentar altos teores de compostos fenólicos (usando como padrão o ácido tânico) e de flavonoides (usando como padrão a quercetina), com relação às demais onde, para fenóis totais, os valores foram ($5,67 \pm 0,39\%$ e $9,40 \pm 0,28\%$) e maiores concentrações de flavonoides totais (10,05 mg/100 g e 22,00 mg/100 g de geoprópolis).

Vieira, et al. (2015) quantificaram fenóis totais em valores bem acima de flavonoides totais (fenóis totais 50,47 mg de EAG/g e flavonoides totais na concentração de 2,01 mg de EQ/g), para a mesma espécie de abelha e da mesma cidade dessa presente dissertação, o presente trabalho obteve um teor de fenóis totais com valor inferior à concentração verificada para o teor de flavonoides totais, como já citados nas Tabelas 3 e 4. Todavia, vale ressaltar que os teores de fenóis e flavonoides totais, bem como a atividade antioxidante promovida, são características intimamente relacionadas com a flora local e que esta sofre constantes influências de fatores climáticos, tais como temperatura, luminosidade e pluviosidade (DUTRA et al., 2008; CARDOZO et al., 2015; LIMA, 2015).

4.4 Determinação do Índice de Oxidação do EEP e da Própolis Bruta

O índice de oxidação de um alimento pode ser relacionado com o seu potencial de bioatividade, a idade do produto analisado e o acondicionamento do mesmo. Valores elevados para o índice de oxidação da própolis podem ser resultados de um armazenamento por longo período e/ou sob temperaturas elevadas, o que pode ocorrer tanto no interior das colmeias ou na forma de armazenamento pós coleta na natureza (ASIS, 1989).

As médias dos valores encontrados para a determinação dos índice de oxidação de amostras de própolis bruta, bem como de seu extrato etanólico, estão apresentadas na Tabela 5. Em todas as amostras analisadas a variação do índice de oxidação se manteve dentro do limite estabelecido pela Instrução Normativa N° 3, sendo estipulado como valor máximo o tempo de 22 segundos para a reação colorimétrica empregada (BRASIL, 2001).

Tabela 5 – Atividade de oxidação do extrato etanólico de própolis e da própolis bruta de *Scaptotrigona aff. postica*, Barra do Corda, Maranhão, Brasil, 2020, expressos em média e desvio padrão, em função de padrões de qualidade nacional

Amostra	Média ± DP (seg.)	BRASIL ^a (seg.)
Extrato Etanólico da Própolis	7 ± 0	Máx. 22
Própolis Bruta	3 ± 0	Máx. 22

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: DP: desvio padrão; Máx.: máximo; seg.: segundos; EEP: extrato etanólico da própolis

^a Valor preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001)

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

O Teste de Sensibilidade Antimicrobiana foi determinado sobre seis diferentes cepas bacterianas, divididas entre Gram-positivas e Gram-negativa. Os resultados indicam que os extratos etanólicos de própolis da abelha *Scaptotrigona* aff. *postica* se mostraram ineficientes nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL em estudos *in vitro* frente as cepas bacterianas de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* analisadas.

Silva et al. (2016) avaliaram a ação antimicrobiana de amostras de geoprópolis da meliponina *Plebeia* aff. *flavocincta* da zona rural da Serra do Mel e da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, analisando oito amostras coletadas, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 35032), usando como controle positivo ciprofloxacino (5µg). No estudo de Silva et al. (2016) a cepa utilizada para *Escherichia coli* (ATCC 25922) é a mesma utilizada no estudo da presente dissertação e em todas as concentrações dos extratos hidroalcoólicos da geoprópolis (12,5; 25; 50; 75 e 100%) foram observados halos de inibição frente ao grupo microbiano testado, com algumas concentrações registrando valores superiores aos halos formados pelo controle positivo.

Em estudo similar Akatsu (2009) avaliou a bioação da própolis de espécies do gênero *Scaptotrigona* relatando que extratos tanto da *S.* aff. *postica* como *S.* aff. *depilis* apresentaram baixa atividade contra *Staphylococcus aureus*, nenhuma atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, além de não demonstrar efeito inibitório frente a *Candida albicans* e um efeito inibidor para o crescimento do fungo *Aspergillus brasiliensis*.

Diferentemente dos resultados de Akatsu (2009), bem como dos resultados da presente dissertação, Farnesi et al. (2009), dentre os grupos microbianos analisados, identificaram ação inibitória efetiva do extrato da própolis de *Scaptotrigona* sp. frente a culturas de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*. Nesse mesmo trabalho os autores sugeriram que a ação bactericida seria um resultado da ação dos

flavonoides presentes no extrato, atuando em canais iônicos e em reações de fosforilação e desfosforilação da membrana plasmática.

As bactérias testadas neste trabalho foram sensíveis ao antibiótico comercial ciprofloxacino, com halos de inibição de crescimento médios de 14,333 mm, 10 mm e 10 mm, para as ATCC's 19114, 7644 e 13932 de *L. monocytogenes*, respectivamente, média de 15,666 mm e 7,333 mm para a ATCC 25923 e ATCC 25175 de *S. aureus* e *S. mutans*, respectivamente, além de halo com média de 23,666 mm para a ATCC 25922 de *E. coli*.

Foram ainda evidenciadas diferenças significativas entre a ação do antibiótico ciprofloxacino (controle positivo) e demais controles e soluções de EEP avaliados, não havendo formação de halos de inibição em nenhuma das concentrações do EEP testadas. Os resultados para os halos obtidos estão descritos da Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 – Média e desvio padrão dos halos de inibição bacteriana dos grupos experimentais em mm frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* (N = 3)

Microrganismo		Grupo experimental	
		Ciprofloxacino	Álcool de cereais puro
		Média ± DP	Média ± DP
Gram positivas			
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19114	14.333 ± 0.471	∅
	ATCC 7644	10 ± 0	∅
	ATCC 13932	10 ± 0	∅
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	15.666 ± 0.471	7.666 ± 0.471
<i>S. mutans</i>	ATCC 25175	7.333 ± 0.471	∅
Gram negativa			
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	23,666 ± 0.613	∅

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: mm: milímetros; N: número de repetições; DP: desvio padrão; ∅: sem formação de halo

As médias dos halos de inibição formados pela ação do antibiótico ciprofloxacino *in vitro* mostram que o mesmo é mais eficiente frente à bactéria *E. coli*

(ATCC 25922) do que contra a *S. aureus* (ATCC 25923), seguido de uma menor ação contra as bactérias *L. monocytogenes* (ATCC's 19114, 7644 e 13932) e com uma ação mais inferior frente a *S. mutans* (ATCC 25175).

Além disso também foi evidenciado que o diluente álcool de cereais foi o único grupo experimental testado, além do antibiótico padrão, que demonstrou ação antibacteriana, sendo esta apenas frente a bactéria *S. aureus*, sem efeitos sobre as demais cepas testadas. Havendo a formação de halos de inibição de alguma concentração de EEP frente a bactéria *S. aureus*, o correto seria a repetição dos testes para descartar a influência do diluente álcool de cereais.

Compostos do grupo dos flavonoides e dos fenóis são tidos como de destaque na ação antimicrobiana promovida pela própolis e, mesmo o mecanismo antibacteriano ainda sendo tido como complexo, infere-se que o sinergismo entre flavonoides e outros compostos é o que garante essa complexa cadeia de ação.

Apesar do EEP à 1 mg/mL apresentar $1,42 \pm 0,07$ mg de EAG/100 g de EEP e $13,08 \pm 0,31$ mg de QE/100 g de EEP de teor de fenólicos totais e de flavonoides totais, respectivamente, e à 2 mg/mL apresentar $2,70 \pm 0,20$ mg de EAG/100 g de EEP e $26,46 \pm 0,41$ mg de QE/100 g de EEP de teor de fenólicos totais e de flavonoides totais, respectivamente, em nenhuma das concentrações testadas foi verificada ação antimicrobiana contra os organismos testados.

Não houve, por tanto, nenhuma sensibilidade dos microorganismos gram-positivos e do grupo gram-negativo testados *in vitro* como resultado da interação dos mesmos com extratos etanólicos de própolis da abelha *S. aff. postica* nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL.

Vale ressaltar que, possivelmente, a falta de atividade antimicrobiana está relacionada com as características químicas da mesma, sem relação com, por exemplo, a temperatura a que esteve exposta, uma vez que, segundo Bonhevi et al. (1994), o seu armazenamento por 3 a 4 anos à temperatura entre 0 °C e 4°C, ou mesmo à temperatura ambiente, não tem comprovado efeito redutor no potencial antimicrobiano da própolis e tais padrões foram controlados durante a realização da pesquisa.

Tais estudos evidenciam a necessidade de mais pesquisas que contemplem novas formas de obtenção do extrato, outros mecanismos de proliferação microbiana e demais cepas, tanto *in vitro* como *in vivo*, a fim de se obter dados mais precisos que fomentem ou descartem a utilização de tal composto pela indústria farmacêutica e demais aplicabilidades.

Algumas amostras sofreram proliferação de fungos, outras formaram extratos muito difíceis de solubilizar, o que inviabilizou a realização da metodologia para a formação de biofilme em placas de 96 poços, sendo necessário então optar por testar a atividade antimicrobiana através do método de difusão em disco, além da caracterização ter sido feita com amostras de meses marcados por chuvas, o que pode ter influenciado em resultados como o teor de umidade. Somado a tais dificuldades, a ocorrência da pandemia do COVID 19, bem como as determinações por isolamento social, intensificou a impossibilidade de pleno andamento da pesquisa com a paralisação das atividades em laboratórios.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho sofreu com limitações metodológicas que persistiram desde o transporte de amostras para o laboratório até a aplicação das metodologias de extração e avaliação antimicrobiana.

Ainda assim, considerando os resultados apresentados e discutidos, constatou-se que:

- Alguns parâmetros de análise qualitativa e quantitativa apresentaram resultados compatíveis com os limites aceitáveis de acordo a legislação brasileira em vigor (Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro de 2001), a saber a cor, textura, odor, dentre outras características qualitativas, além da oxidação da amostra de extrato e da própolis bruta não ultrapassar o limite estipulado de no máximo 22 segundos;
- O teor de umidade encontrado para as amostras de própolis bruta corrobora a influência das intempéries sobre a qualidade dos produtos oriundos das atividades das abelhas, uma vez que foi obtido um valor acima do limite estabelecido de 8% (m/m);
- O valor encontrado para o teor de cinzas nas amostras é reflexo da atividade coletora das abelhas uma vez que, quanto maior o teor de cinzas maior poderá ser a presença de resíduos orgânicos presentes e tidos como contaminantes naturais. Conclui-se então que as amostras de própolis bruta estavam, provavelmente, impregnadas de outros produtos, como fibras, fragmentos de

folhas, dentre outros, uma vez que registrou valor acima do limite estabelecido de 5% (m/m);

- Foram registrados valores para o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, o que indica que a própolis da abelha *Scaptotrigona affinis postica* pode ter mecanismos de bioação benéficos à saúde humana;
- Quanto a análise para ação antimicrobiana do extrato etanólico da própolis não foi evidenciado sensibilidade frente as espécies bacterianas a seguir: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC's 19114, 7644 e 13932) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Mediante todos os dados obtidos considera-se que é plausível a continuidade de pesquisas acerca da bioquímica dos produtos e subprodutos da abelha *Scaptotrigona affinis postica*, diversificando a metodologia empregada, comparando as diversas técnicas de obtenção de extratos, caracterizando-os por meio de métodos cromatográficos (uma vez que os métodos colorimétricos utilizados nesta dissertação não foram adequados para inferir comparações entre os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais bem como suas correlações com demais características) e analisando amostras de diversos períodos do ano, de modo a melhor caracterizá-las em função de fatores sazonais, contribuindo assim para o conhecimento da espécie uma vez que ainda é escasso o número de publicações em especial no que tange às aplicações antimicrobianas.

6 PERSPECTIVAS PARA NOVOS TRABALHOS

Neste trabalho foram implementadas metodologias com vistas a obter, diluir, caracterizar e testar o efeito antimicrobiano promovido por extrato etanólico de própolis produzida pela abelha *S. aff. postica* e no decorrer da aplicação desse conjunto de metodologias de análise resultados como o teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais se revelaram “interessantes” porém discordantes do que já é preconizado em referencial teórico sobre o tema.

Em seguida, entende-se que as análises e resultados obtidos no decorrer desse estudo contribuem com a literatura sobre os conhecimentos acerca das abelhas nativas do Brasil, bem como os potenciais de uso da própolis, mas há de se destacar a necessidade de mais pesquisas dentro das perspectivas de continuidade deste trabalho, a saber:

- Em relação ao extrato de própolis é interessante a continuidade de estudos semelhantes, mas utilizando diferentes metodologias para obtenção desse extrato, uma vez no presente estudo o extrato obtido apresentou dificuldades do ponto de vista da sua diluição e uso nas análises para caracterização e para teste de sensibilidade antimicrobiana;

- Fica também como proposta a realização de estudos futuros adequando o extrato da referida própolis à metodologias para aplicação em biofilmes;

- Para a quantificação dos teores fenólicos e de flavonoides, comparando com os resultados obtidos por metodologias colorimétricas, a continuidade dessa área de

pesquisa deve valer-se de metodologias mais precisas como a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), buscando resultados mais refinados, bem como a identidade de moléculas;

- É importante também, em havendo trabalhos futuros, que o extrato dessa própolis seja testado frente a outras cepas microbianas;

- Além disso, destaca-se a possibilidade de novos estudos testando tal própolis como um agente potencializador de antimicrobianos, a fim de evidenciar seu potencial sinérgico com fármacos de ação já reconhecida.

Assim, com a continuidade de estudos sobre a própolis da abelha *Scaptotrigona aff. postica* (LATREILLE, 1807), espera-se poder continuar contribuindo com a descoberta de novos produtos naturais possíveis de serem aplicados em diversos ramos da indústria, descobrindo novas atividades biológicas para as espécies encontradas no bioma Cerrado e fomentando o conhecimento tradicional agregado ao manejo das abelhas nativas do Brasil.

7 REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AKATSU, I. P. **Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade antimicrobiana**. 2009. 115 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia da FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 22 ed. Washington, D.C.: APHA, 2012.

ANDRADE, Rafael R. de. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 147-152, jan., 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782014000100024

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988-2005.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviços em Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (PGRSS)**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços em saúde. ANVISA - Resolução RDC N° 306, de dezembro de 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0306_07_12_2004.pdf/95eac678-d441-4033-a5ab-f0276d56aaa6>. Acesso em 14 de abril de 2019.

ARAÚJO, M. J. A. M., DUTRA, R. P., COSTA, G. C., REIS, A. S., ASSUNÇÃO, A. K. M., LIBÉRIO, S. A., MACIEL, M. C. G., SILVA, L. A., GUERRA, R. N. M., RIBEIRO, M. N. S., NASCIMENTO, F. R. F. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 4, Curitiba, agosto./setemb. 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000400018

AUTO, Helvio J. de F. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**. v. 51c, p. 277-280, jan. 1996. DOI: 10.1515/znc-1996-5-602

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**. Toyama, v. 63, n.9, p. 1277-1279, mar. 2000b. DOI: 10.1021/np000143z

BITAJIAN, Fatemeh et al. A selective culture medium for separating listeria monocytogenes by taking benefit from propolis (bee glue). **International Journal of Current Research**. v. 5, n. 10, p. 2868-2871, out. 2013.

BORGES, K. S.; BRASSESCO, M. S.; SCRIDELI, C. A.; SOARES, A. E. E.; TONE, L. G. Antiproliferative effects of tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetic and Molecular Biology**. v. 34, n. 2, p. 310-314, 2011. DOI: 10.1590/S1415-47572011000200024

BONHEVI, S. J.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. V. The composition, active components and bacteriostatic activity of própolis in dietetics. **Journal Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 71, n. 5, p. 529 – 532, 1994.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**. Itália, v. 73, n. 1, p. S53-S63, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. VISALEGIS. Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de Janeiro de 2001. Seção 1, p. 18-23.

BrCAST. **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Método de disco-difusão EUCAST**. 6 ed. 2018.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of the bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**. Flórida, v. 36, n. p. 347-363, 1998. DOI: 10.1016 / s0278-6915 (97) 00145-2

CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; SCHNEIDER, C. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual Quim**. v. 7, n. 6, p. 2457-2474, 2015.

- CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1239-1245, 2011.
- CASTRO, S. L., HIGASHI, K. O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal Ethnopharmacol**. Rio de Janeiro. v. 46, n. 1, p. 55-58, jan. 1995.
- CHEMIN, Beatriz F. **Manual da Univates para trabalhos acadêmicos: planejamento, elaboração e apresentação**. 4. ed. Lajeado/ RS: Univates, 2020. *E-book*. Disponível em: <http://www.univates.br/biblioteca>. Acesso em: 22 out. 2020.
- COSTA, A. S.; MACHADO, B. A. S.; UMSZA-GUEZ, M. A.; CIRQUEIRA, M. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Revista Sitientibus série Ciências Biológicas**. Feira de Santana, v. 18, n. 13, p. 1-7, 2014. DOI: 10.13102/scb324
- CLSI. **M 02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 12 ed., v. 35, n. 01. Pennsylvania, 2015.
- CUNHA, Fernanda de P. L. da. *Shigella* sp: um problema de saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 31, n. 264/265, p. 52 – 57, jan./fev. 2017.
- D'ALBORE, G. R. L' origine géographique de la propolis. **Apidologie**. Les Ulis, v. 10, n. 3, p. 241-267, 1979.
- DE-CARLI, A. D., ZÁRATE-PEREIRA, P., DE-CARLI, G., ZAFALON, E. J., ZÁRATE, C. B. R., YASSUMOTO, L. M. Ação da Própolis de *Apis mellifera* Associada ao Fluoreto de Sódio Sobre o Biofilme Dental: Ensaio Clínico Duplo Cego Randomizado. **Rev. Odontol. Bras. Central**. v. 19, n. 51, 2010.
- DE-MELO, Adriane A. M. et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 44, n. 3, p. 341-348, jul./set. 2014.
- DIEHL, L. C. P. **Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico**. 2008, 248 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- DRUMOND, Sheila N. et al. Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica na bacia hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. **Revista Eng. Sanit Ambient**. Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 579-590, maio/jun. 2018.
- DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.
- FARNESI, A.P.; AQUINO-FERREIRA, R.; DE JONG, D.; BASTOS, J.K.; SOARES, A.E.E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**. v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from northeast Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 2017.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 224-230, abr./jun. 2007. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000200016

FONTANA, J. D., ADELMANN, J., PASSOS, M., MARASCHIN, M., LACERDA, C. A.; LANÇAS, F. M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. **New Jersey: Humana press**, p. 203-218, 2004.

FÓRUM NACIONAL DE AGRICULTURA E APICULTURA. **Padrões de identidade e qualidade para produtores apícolas**. Belo Horizonte: FNA, 1997.

FRANCO, S. L.; Bruschi, M. L.; Moura, L. P. P.; Bueno, J. H. F. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 9, n. 10, p. 1-10, 2000.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World**. Western Australia, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979. DOI: 10.1080/0005772X.1979.11097738

GONZAGA, M. L. C., et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an α -(1,4)-glucan- β -(1,6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicine**, v. 63, p. 32–40, 2009.

GRAY, Mitchell L.; KILLINGER, Arden H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**. American Society for Microbiology. U.S.A., v. 30, n. 2, p. 309-382, jun. 1966.

GRESSLER, L. T., et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**. v. 93, n. 3, p. 1314-1317, fev. 2012.

HANDELMAN, G. J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**. New York, v. 17, n. 10, p. 818-822, 2001.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. n. 2, p. 123-140, 2004.

KERR, W.E.; et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**. n. 12, p. 20-41, 2001.

LEÃO, Kamila L. et al. Colony development and management of the stingless bee *Scaptotrigona aff. postica* (Apidae: Meliponini) using different hive models. **Sociobiology**. Feira de Santa – UEFS, v. 63, n. 4, p. 1038 – 1045, 2016.

LIMA, Maíra F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares - Revisão de literatura. **Revista UNINGÁ Review**. Maringá, v. 21, n. 1, p. 32 – 39, jan./mar. 2015.

LIMA, M. V. D. **Geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas: atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos**. 2015, 70 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Pará – Belém: 2015.

LUSTOSA, Sarah R. **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2007, 86 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco, 2007.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 447-454, jul./set. 2008. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000300020

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MARANHÃO. **Atlas do Maranhão**. Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico, Laboratório de Geoprocessamento – UEMA. São Luís: GEPLAN/UEMA, 2002.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. Springer Verlag, v. 26, n. 2, p. 83-99, jan. 1995. DOI: 10.1051/apido:19950202

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

MARCUCCI, M. C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian própolis from São Paulo state. **Z. Naturforsch., C: J. Biosci.**, Tuebingen, v. 53 C, p. 117 – 119, 1998.

MARCUCCI, M. C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Phytochemistry**. Amsterdam, v. 2, p. 115 – 123, 1999.

MARCUCCI, M.C; CUSTÓDIO, A. R.; PEREIRAL, R. M. S. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Mensagem Doce**, n. 90, 2007.

MARKHAM, K. R. Chemical methods used in flavonoid structure elucidation. In: **Techniques of flavonoid identification**. London, New York: Academic Press, cap. 5, p. 62 – 70, 1982.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M.; FONSECA, M. J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal Pharmaceut Biomed**. v. 39, n. 3-4, p. 455-462, 2005. DOI: 10.1016 / j.jpba.2005.04.004

MATSUNO, T.; JUNG, S. K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer**. v. 17, p. 3565-3568, 1997.

MELO, Wilson. **Chegada com pólen da flor da cajazeira**. 1990. 1 fotografia.

MELO, Wilson. **Favos de cria**. 1990. 1 fotografia.

MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 3, p. 540-548, 2012.

MIGUEL, M.; ANTUNES, M. Is propolis safe as an alternative medicine? **Journal of Pharmacy and Bio Allied Sciences**. v. 3, n. 4, p. 479-491, out. 2011.

MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. A. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. Campinas, v. 95, p. 913-920, set. 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02050.x

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. San Miguel de Tucumán, v. 71, p. 109-114, out. 2000.

MOURE, J. S. A Preliminary Supra-specific Classification of the Old World Meliponine Bees (Hym., Apoidea). **Studia Entomologica**. v. 4, p. 181-242, 1961.

NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. **Food Chemistry**. v. 75, p. 237-240, 2001.

NATES-PARRA, G. Abejas silvestres y polinización. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**. Costa Rica, v. 75, p. 7-20, 2005.

NEVES, David P. **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

OLIVEIRA, M. S. et al. Avaliação de três parâmetros físico-químicos de qualidade em amostras de própolis e geopropolis de abelhas nativas sem ferrão da Amazônia. IX Congresso Brasileiro de Agroecologia. **Cadernos de Agroecologia**. Belém, v. 10, n. 3, 2015.

- PALMA, M. S.; MALASPINA, O. El propóleo. **Apitec**. Ciudad de Mexico, n. 17, p. 6-10, 2000.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Estudo da preparação dos extratos etanólicos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 18, n. 3, 313-318, set. 1998a.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; Preparation of water and ethanolic extracts of própolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998b.
- PEREIRA, F. de M.; SOUZA, B. de A.; LOPES, M. T. do R. **Criação de abelhas sem ferrão**. EMBRAPA: Teresina, 2017.
- PIANARO, Adriana. **Ecologia química de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, *Scaptotrigona aff. depilis* Moure e *Solenopsis saevissima* Smith**. 2012, 241 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.
- PICCINELLI, A. L., et al. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography- photodiode array detection/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 2001.
- PINTO, Luciana. de M. A.; PRADO, Ney R. T do, CARVALHO, Lucas B. de. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Lavras, v. 8, n. 3, p. 76 – 100, 2011. DOI: 10.5216/ref.v8i3.15805
- PIRES, C. S. S., et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasil**. Brasília, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.
- PRONI, E. A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (hymenoptera: Apidae: Mliponinae) na Bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Ciên. vet. zool. UNIPAR**. v. 3, p. 145-150, 2000.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RICHARDS, A. J. Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? **Annals of Botany**. v. 88, p. 165-172, 2001.
- SALOMÃO K., et al. In Vitro and In Vivo activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megalzol against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 5, p. 2023-2031, março 2010.
- SANCHES, Márcia A. **Ação da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807) (hymenoptera, apidae, meliponini) em diferentes linhagens de células tumorais**. 2014, 87 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

SARDANA, D. et al. Role of propolis in dentistry: review of the literature. **Focus on Alternative and Complementary Therapies**. v. 18, n. 3, p. 118–125, setemb. 2013.

SENA-LOPES, A. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **Plos One**. Taiwan. v. 13, n. 2, fev., 2018.

SFORCIN, J. M.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; CARDOSO, E. de O.; CONTE, F. L.; OLIVEIRA, L. P. C.; ARAÚJO, M. J. A. M. **Própolis e geoprópolis: uma herança das abelhas**. São Paulo: Editora Unesp Digital, 2017.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of Artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Japão, v. 424, p. 181-188, jan. 2004.

SIES, H.; STHAL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, J. B.; COSTA, K. M. F. M.; COELHO, W. A. C.; PAIVA, K. A. R.; COSTA, G. A. V.; SALATINO, A.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, J. S. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras**. v. 36, n. 9, p. 874-880, setembro, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000900014

SILVA, R. A. **SOS abelhas nativas do Brasil**. SEABDERAL – Departamento de Economia Rural. Paraná, Ano II, n. 19, p. 1 – 9, 2009.

SILVA, R. P. D.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. de A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; CARVALHO, A. A.; PADILHA, F. F.; BARBOSA, J. D. V.; UMSZA-GUEZ, M. A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**. Estonia. v. 12, n. 3, p. 1-18, março, 2017.

SOUZA, H. R.; CORRÊA, A. M. S.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico da própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em Barra do Corda, MA, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 45, n. 3, p. 307-316, 2015. DOI: 10.1590/1809-4392201403663

SOUZA, S. G. X. de., et al. As abelhas sem ferrão (Apidae: meliponina) residentes no Campus Federação/ Ondina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. **Candombá**. Salvador, v. 1, n. 1, p. 57-69, jan./jun. 2005.

STORER, Tracy. I.; USINGER, Robert L.; STEBBINS, Robert C.; NYBAKKEN, James W. **Zoologia geral**. 6 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991.

SWAMINATHAN, B. et al. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.; BEUCHAT, L. (Eds.). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition**. 3. ed. Washington: American Society of Microbiology, 2007.

TAMBE, V. D.; BHAMBAR, R. S. Estimation of Total Phenol, Tannin, Alkaloid and Flavonoid in *Hibiscus Tiliaceus* Linn. Wood Extracts. **Research and reviews: Journal of pharmacognosy and phytochemistry**. v. 2, n. 4, oct-dez., 2014.

TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SHILCHER, H. El microscopic and microcolorimetric investigations of the possible mechanism of bacterial action of defined propolis provenance. **Planta Médica**, v. 60, n.3, p. 222-227, 1994.

TORRES, M. A. N. et al. Climatologia do Maranhão: levantamento sobre estudos de clima local desenvolvidos na cidade de São Luís. **XII SBCG. Variabilidade e susceptibilidade climática: implicações ecossistêmicas e sociais**. p. 1260-1268, Goiânia, 2016.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FESTRÉ, R. Origine, micrographie, compositions chimique et activité thérapeutique. **J. Pharm. Belg.**, Bruxelles, v. 34, n. 5, p. 253 – 259, 1979.

VIEIRA, W. L.; SILVA, J. S.; FERNANDES, L. S.; NETO, F. A. L.; NOVA, L. Y. S. V.; RIBEIRO, M. N. S.; BATISTA, M. C. A.; DUTRA, R. P. Atividade antioxidante de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão produzidas no estado do Maranhão. **67ª Reunião Anual da SBPC**. Química de Produtos Naturais. São Carlos: 2015.

VILLAS-BÔAS, Jerônimo. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão**. 2 ed. Brasília – DF: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2018.

VILLAS-BÔAS, Jerônimo. **Manual Tecnológico: mel de abelhas sem ferrão**. Brasília – DF: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012.

WOISKY, R. G. **Métodos químicos para controle de amostras de própolis**. 1996. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos/ Área de insumos farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo, São Paulo, 22 nov. 1996.

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

WOLFF, L. F.; DOS REIS, V. D. A.; SANTOS, R. S. S. Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. **Embrapa Clima Temperado**. Pelotas, v. 244, 38 p., 2008.

WOLKE, R. L. **O que Einstein disse a seu cozinheiro: a ciência na cozinha**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 2003.

YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANAEDA, J.; UENO, Y. Benzil caffeato, an antioxidative compound isolated from propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 56, n. 8, p. 1321-1322, jan. 1992. DOI: 10.1271 / bbb.56.1321

YANG, Hsin-Yi et al. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-*N*-oxide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Society of Chemical Industry, USA, vol. 86, p. 937-943, 2006.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRG; Florianópolis: UFSC, cap. 23, p. 489 – 516, 1999.



UNIVATES

R. Avelino Talini, 171 | Bairro Universitário | Lajeado | RS | Brasil
CEP 95914.014 | Cx. Postal 155 | Fone: (51) 3714.7000
www.univates.br | 0800 7 07 08 09