



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**



**JÉSSICA LIMA DE SOUZA**

**Investigação de geoprópolis produzida por *Melipona  
scutellaris*: procedimentos de extração, análise polínica e estudo  
antimicrobiano *in silico* e *in vitro***

**Feira de Santana-BA  
2024**

**JÉSSICA LIMA DE SOUZA**

**Investigação da geoprópolis produzida pela *Melipona  
scutellaris*: procedimentos de extração, análise polínica e estudo  
antimicrobiano *in silico* e *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana para obtenção do título de Doutora em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão  
Coorientadora: Profa. Dra. Carla Cardoso Rodrigues Branco  
Coorientador: Prof. Dr. Clayton Alvez Queiroz

**Feira de Santana-Ba  
2024**

**Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS**

Souza, Jéssica Lima de

S715i      Investigação de geoprópolis produzida por *Melipona scutellaris*:  
procedimentos de extração, análise polínica e estudo antimicrobiano *in silico*  
e *in vitro* / Jéssica Lima de Souza. - 2024.  
159f. : il.

Orientador: Hugo Neves Brandão

Coorientadora: Carla Cardoso Rodrigues Branco

Coorientador: Clayton Queiroz Alvez

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2024.

1. Abelha-sem-ferrão. 2. Pólen. 3. Meliponicultura. 4. Geoprópolis –  
Extração. 5. Fluido supercrítico. I. Brandão, Hugo Neves, orient. II. Branco,  
Carla Cardoso Rodrigues, coorient. III. Alves, Clayton Queiroz, coorient.  
IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 638.135

## BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 **ADEMIR EVANGELISTA DO VALE**  
Data: 17/06/2024 18:29:29-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale**  
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)

Documento assinado digitalmente  
 **BRUNO OLIVEIRA MOREIRA**  
Data: 12/06/2024 17:30:38-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira**  
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)

Documento assinado digitalmente  
 **FRANCISCO DE ASSIS RIBEIRO DOS SANTOS**  
Data: 17/06/2024 19:29:37-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)

Documento assinado digitalmente  
 **LUCIANO DA SILVA LIMA**  
Data: 12/06/2024 16:31:42-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof. Dr. Luciano da Silva Lima**  
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia - IFBA)

Documento assinado digitalmente  
 **HUGO NEVES BRANDÃO**  
Data: 11/06/2024 16:02:04-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof. Dr. Hugo Neves Brandão**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS)  
Orientador e Presidente da Banca

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização desta tese, tanto com apoio emocional quanto com suporte técnico e intelectual.

Agradeço ao meu pai, George, à minha mãe, Sandra, a minha madrastra Eurides por sempre estarem ao meu lado, ouvindo meus desabafos e oferecendo palavras de conforto. A meu padrasto, Valdir, pelo apoio constante.

Minha irmã Aline, você foi minha grande apoiadora, sempre pronta a me incentivar e a ajudar nos momentos de dificuldade.

Ao meu esposo Lucas, que ainda namorado durante o período do doutorado, sempre me apoiou e tornou essa caminhada mais leve com seu amor e compreensão.

Aos meus irmãos da Aliança Eterna, agradeço por todas as orações e apoio espiritual que foram essenciais para a minha jornada.

Aos colegas do laboratório de bioprospecção vegetal (LABIV), obrigada por todo o suporte durante nossas pesquisas e experimentos, em especial Juliana e Icaro

À professora Carla e ao professor Clayton, meus coorientadores, agradeço pelas orientações valiosas e pela paciência em me guiar ao longo deste processo. Ao Professor Maurício Lordêlo pelo desenvolvimento da estatística.

Ao professor Hugo Brandão, meu orientador, sou grata pelo seu incansável apoio e sabedoria, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

Ao professor Carlos Alfredo (Insecta/UFRB) e ao meliponicultor Pedro Viana do Meliponário Costa do Sauipe, agradeço pela disponibilização do material que foi crucial para minha pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer aos laboratórios LAMASP e LAMIV pelo suporte técnico e pela infraestrutura que permitiu a execução dos experimentos microbiológicos e palinológico desta tese.

A todos vocês, minha eterna gratidão. Este trabalho é reflexo do apoio, incentivo e orientação que recebi de cada um ao longo desta jornada.

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

*À Deus meu porto seguro, meus familiares e amigos.*

*“Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o SENHOR, porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos.”*

*Isaías 55:8.*

## RESUMO

A geoprópolis produzida pela abelha-sem-ferrão *Melipona scutellaris* é produto da mistura de resinas vegetais, cera e barro. Estudos mostram seu potencial anti-inflamatório, antimicrobiano e antioxidante. Este trabalho tem como objetivo identificar as condições adequadas para o sistema de extração e período de coleta da geoprópolis, bem como identificar os principais compostos químicos e submetê-los à avaliação antimicrobiana *in silico* e *in vitro*. Esta tese está organizada em três capítulos. No primeiro capítulo, são apresentados os resultados do estudo da influência dos métodos de extração (maceração, ultrassom, refluxo, soxhlet e fluido supercrítico) no rendimento, na composição química e atividade biológica da geoprópolis coletada em Cruz das Almas, BA. Os rendimentos de extração variaram de  $7,37 \pm 0,40$  a  $15,67 \pm 3,45\%$ . Os teores de fenólicos e flavonoides totais foram determinados utilizando a técnica espectrofotométrica, e os valores de fenólicos ficaram entre  $16,57 \pm 0,87$  e  $19,16 \pm 0,11$  mgEAG/100g, enquanto os valores de flavonoides variaram de  $1,61 \pm 0,26$  a  $2,14 \pm 0,34$  mgQE/100g. O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado utilizando os radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ABTS<sup>+</sup>), e os valores variaram de  $7,09 \pm 0,32$  a  $10,88 \pm 0,41$  (µg/mL) para o DPPH e de  $2,14 \pm 0,34$  a  $7,43 \pm 1,33$  (µM/ trolox g) para o ABTS<sup>+</sup>. Com o propósito de avaliar a concentração inibitória mínima, foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*. Os valores do potencial antimicrobiano variaram entre  $0,24 \pm 0,01$  a  $1,96 \pm 0,07$  mg/mL. O capítulo 1 ainda mostra a influência dos métodos de extração na composição química da geoprópolis coletada no município de Cruz das Almas, BA. A geoprópolis foi submetida a extração por maceração, ultrassom, refluxo, soxhlet e fluido supercrítico. A comparação dos extratos foi realizada através da identificação e quantificação dos compostos com auxílio da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD). O Capítulo 2 apresenta o estudo *in silico* da atividade antimicrobiana dos compostos identificados e quantificados na geoprópolis de Cruz das Almas, BA. Os resultados mostram que o ácido elágico, identificado no extrato, se destacou como potencial inibidor da enzima lactato desidrogenase (LDH). O capítulo 3 consiste no diagnóstico polínico da geoprópolis coletada no município, Mata de São João - BA. O perfil palinológico foi determinado através da análise do pólen presente na geoprópolis coletada nos 12 meses do ano de 2021. Foram encontrados 84 tipos polínicos, distribuídos em 31 famílias botânica. Para a análise da influência do período de coleta foram utilizados como parâmetros o rendimento da parte resinosa, teor de fenólicos, flavonoides e perfil químico. Os rendimentos de extração obtidos nos diferentes meses de coleta (janeiro a dezembro) variaram de  $8,04 \pm 0,19\%$  a  $19,16 \pm 0,92\%$ . Através da técnica espectrofotométrica, foram determinadas concentrações de fenólicos totais entre  $3,20 \pm 0,19$  mgEAG/100g e  $1,12 \pm 0,01$  a  $3,08 \pm 0,06$  mgQE/100g para os flavonoides totais. Houve influência do período de coleta na composição química obtida por CLAE-DAD. Os resultados obtidos permitem a padronização dos extratos de geoprópolis e fornecem dados científicos que comprovam a relevância do uso da geoprópolis. Desse modo, é possível agregar valor científico, ambiental e econômico, alcançando diversas esferas da sociedade, como agricultores, meliponicultores e pesquisadores. Além disso, os dados trazem informações inéditas sobre a extração de geoprópolis por métodos convencionais e não convencionais.

**Palavras-chave:** Extração. Abelha-sem-ferrão . Fluido supercrítico. Pólen. Meliponicultura.



## ABSTRACT

The geopropolis produced by the stingless bee *Melipona scutellaris* is a product of the mixture of plant resins, wax, and clay. Studies show its anti-inflammatory, antimicrobial, and antioxidant potential. This work aims to identify the appropriate conditions for the extraction system and the collection period of geopropolis, as well as to identify the main chemical compounds and subject them to *in silico* and *in vitro* antimicrobial evaluation. This thesis is organized into three chapters. In the first chapter, the results of the study on the influence of extraction methods (maceration, ultrasound, reflux, Soxhlet, and supercritical fluid) on the yield, chemical composition, and biological activity of the geopropolis collected in Cruz das Almas, BA, are presented. The extraction yields varied from  $7.37 \pm 0.40\%$  to  $15.67 \pm 3.45\%$ . The total phenolic and flavonoid contents were determined using spectrophotometric techniques, with phenolic values ranging from  $16.57 \pm 0.87$  to  $19.16 \pm 0.11$  mg EAG/100g, while flavonoid values varied from  $1.61 \pm 0.26$  to  $2.14 \pm 0.34$  mg QE/100g. The antioxidant potential of the extracts was assessed using the radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), with values ranging from  $7.09 \pm 0.32$  to  $10.88 \pm 0.41$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) for DPPH and from  $2.14 \pm 0.34$  to  $7.43 \pm 1.33$  ( $\mu\text{M/Trolox g}$ ) for ABTS. To evaluate the minimum inhibitory concentration, the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Streptococcus mitis* were used. The antimicrobial potential values ranged from  $0.24 \pm 0.01$  to  $1.96 \pm 0.07$  mg/mL. Chapter 1 also shows the influence of extraction methods on the chemical composition of the geopropolis collected in Cruz das Almas, BA. The geopropolis was subjected to extraction by maceration, ultrasound, reflux, Soxhlet, and supercritical fluid. The comparison of the extracts was conducted through the identification and quantification of compounds using high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD). Chapter 2 presents the *in silico* study of the antimicrobial activity of the compounds identified and quantified in the geopropolis from Cruz das Almas, BA. The results show that ellagic acid, identified in the extract, stood out as a potential inhibitor of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Chapter 3 consists of the palynological diagnosis of the geopropolis collected in the municipality of Mata de São João, BA. The palynological profile was determined through the analysis of pollen present in the geopropolis collected over the 12 months of the year 2021. A total of 84 pollen types were found, distributed across 31 botanical families. For the analysis of the influence of the collection period, parameters such as the yield of the resinous part, phenolic content, flavonoids, and chemical profile were used. The extraction yields obtained during different collection months (January to December) varied from  $8.04 \pm 0.19\%$  to  $19.16 \pm 0.92\%$ . Using spectrophotometric techniques, total phenolic concentrations were determined to be between  $3.20 \pm 0.19$  mg EAG/100g and  $1.12 \pm 0.01$  to  $3.08 \pm 0.06$  mg QE/100g for total flavonoids. The collection period influenced the chemical composition obtained through HPLC-DAD. The results obtained allow for the standardization of geopropolis extracts and provide scientific data that demonstrate the relevance of using geopropolis. Thus, it is possible to add scientific, environmental, and economic value, reaching various sectors of society, such as farmers, meliponiculturists, and researchers. Furthermore, the data provide unprecedented information about the extraction of geopropolis using conventional and non-conventional methods.

**Keywords:** Extraction. Stingless bee. Supercritical fluid. Pollen. Meliponiculture.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                                                                                                                                                                 | <b>16</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                                                      | <b>18</b>  |
| <b>Capítulo 1: Comparação dos Métodos de Extração para Geoprópolis produzida pela <i>Melipona scutellaris</i>: Avaliação da Composição Fenólica, Rendimento, Atividade Antioxidante, Antimicrobiana e perfil químico.....</b> | <b>22</b>  |
| <b>1.1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>24</b>  |
| <b>1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                                                           | <b>25</b>  |
| 1.2.1 Coleta das amostras de geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> .....                                                                                                                                                       | 25         |
| 1.2.2 Extração por métodos convencionais e não convencionais.....                                                                                                                                                             | 27         |
| 1.2.3 Quantificação do teor de fenólicos totais através da técnica espectrofotométrica.....                                                                                                                                   | 29         |
| 1.2.4 Quantificação do teor de flavonoides totais através da técnica espectrofotométrica..                                                                                                                                    | 30         |
| 1.2.5 Avaliação da atividade antioxidante através do sequestro de radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) .....                                                                                                     | 31         |
| 1.2.6 Avaliação da atividade antioxidante através do sequestro de radical livre radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS .....                                                                     | 32         |
| 1.2.7 Avaliação da influência dos parâmetros de extração na atividade antimicrobiana.....                                                                                                                                     | 33         |
| 1.2.8 Avaliação do perfil químico através da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD) .....                                                                                                                     | 34         |
| 1.2.9 Estatística .....                                                                                                                                                                                                       | 36         |
| <b>1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                                                                                                                                                       | <b>36</b>  |
| <b>1.4 CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>83</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                                                      | <b>85</b>  |
| <b>Capítulo 2: Avaliação da Composição Química e Atividade Antimicrobiana da Geoprópolis de <i>Melipona scutellaris</i>: Investigação por HPLC-DAD e <i>In Vitro/In Silico</i> .....</b>                                      | <b>91</b>  |
| <b>2.1 INTRODUCTION .....</b>                                                                                                                                                                                                 | <b>92</b>  |
| <b>2.2 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>92</b>  |
| <b>2.3 EXPERIMENTAL .....</b>                                                                                                                                                                                                 | <b>95</b>  |
| <b>2.4 CONCLUSIONS.....</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>95</b>  |
| <b>2.5 ACKNOWLEDGMENTS:.....</b>                                                                                                                                                                                              | <b>96</b>  |
| <b>2.6 DECLARATION OF INTEREST STATEMENT: .....</b>                                                                                                                                                                           | <b>96</b>  |
| <b>REFERENCES.....</b>                                                                                                                                                                                                        | <b>96</b>  |
| <b>2.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL .....</b>                                                                                                                                                                                       | <b>99</b>  |
| <b>S1. EXPERIMENTAL .....</b>                                                                                                                                                                                                 | <b>101</b> |
| 2.8.1 Obtaining and extracting geopropolis.....                                                                                                                                                                               | 101        |
| 2.8.2 Determination of total phenolic and flavonoid contents .....                                                                                                                                                            | 101        |
| 2.8.3 Evaluation of potentially toxic elements and macronutrients .....                                                                                                                                                       | 101        |
| 2.8.4 Chromatographic profile analysis by HPLC-DAD.....                                                                                                                                                                       | 102        |
| 2.8.5 Evaluation of antioxidant activity through the scavenging of free radical 1,1-. diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) .....                                                                                                 | 103        |
| 2.8.6 Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC).....                                                                                                                                                               | 103        |

|                                                                                                                                                                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.8.7 Minimum bactericidal concentration and minimum fungicidal concentration (MBC and MFC).....                                                                                                            | 104        |
| 2.8.8 Macromolecular Target Identification using Pharmacophore Mapping Approach ..                                                                                                                          | 104        |
| <b>Capítulo 3: Influência do intervalo de coleta sobre o rendimento, composição química e características polínicas da geoprópolis de <i>Melipona scutellaris</i> coletada em Mata de São João, BA.....</b> | <b>116</b> |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                        | 117        |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                                                                                                                                | 118        |
| 3.2.1 Coleta das amostras de geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> .....                                                                                                                                     | 118        |
| 3.2.2 Preparo de amostras de geoprópolis para análise polínica .....                                                                                                                                        | 119        |
| 3.2.3 Preparo dos extratos para análise química .....                                                                                                                                                       | 121        |
| 3.2.4 Determinação do teor total de flavonoides em extratos de geoprópolis por meio da espectrofotometria .....                                                                                             | 121        |
| 3.2.5 Quantificação do teor de fenólicos totais através da técnica espectrofotométrica....                                                                                                                  | 121        |
| 3.2.6 Avaliação do perfil químico através da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD).....                                                                                                    | 122        |
| <b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                                                                                                                                     | <b>122</b> |
| 3.3.1 Estudo Fitogeográfico das Colônias de Abelhas de <i>Melipona scutellaris</i> em Mata de São João.....                                                                                                 | 122        |
| 3.3.2 Análise da Composição Química da Geoprópolis Produzida por <i>Melipona scutellaris</i> em Mata de São João, Bahia .....                                                                               | 140        |
| 3.4 Conclusão.....                                                                                                                                                                                          | 155        |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                     | <b>156</b> |

## LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1- Mapa de Localização das Coletas de Geopropolis por <i>Melipona scutellaris</i> em Cruz das Almas, Bahia. ....                                                                                                                                                   | 26 |
| Figura 1.2 - Processo de Pulverização de Geopropolis.....                                                                                                                                                                                                                   | 26 |
| Figura 1.3 - Resumo dos Parâmetros de Extração Utilizados nos Estudo .....                                                                                                                                                                                                  | 29 |
| Figura 1.4 - Curva de Calibração para Fenólicos Totais.....                                                                                                                                                                                                                 | 30 |
| Figura 1.5 - Curva de Calibração para Flavonoides Totais.....                                                                                                                                                                                                               | 31 |
| Figura 1.6 - Curva de calibração do padrão Trolox .....                                                                                                                                                                                                                     | 33 |
| Figura 1.7 - Avaliação do crescimento bacteriano através da reação colorimétrica. Tonalidades azuis indicam concentrações do extrato que inibiram o crescimento bacteriano, enquanto as tonalidades rosa representam concentrações que não foram eficazes na inibição. .... | 34 |
| Figura 1.8 - Cromatógrafo (CLAE-DAD) utilizado em análise do perfil químico .....                                                                                                                                                                                           | 35 |
| Figura 1.9 - Curvas de calibração utilizadas para quantificação dos ácidos fenólicos ( ácido gálico, <i>p</i> -cumárico e ácido elágico ) por CLAE-DAD .....                                                                                                                | 35 |
| Figura 1.10 - Rendimento das Extrações em Diferentes Métodos e Solventes da geopropolis produzida por <i>M. scutellaris</i> .....                                                                                                                                           | 37 |
| Figura 1.11 - Influência da interação da em cada nível de solvente sobre o rendimento                                                                                                                                                                                       | 38 |
| Figura 1.12 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre o rendimento.....                                                                                                                                                                         | 40 |
| Figura 1.13 - Médias dos efeitos simples: análise relevante quando a interação não é significativa .....                                                                                                                                                                    | 40 |
| Figura 1.14 - Médias das contribuições individuais dos solventes para o teor total de fenólicos. ....                                                                                                                                                                       | 43 |
| Figura 1.15 - Médias das contribuições individuais das técnicas de extração para o teor total de fenólicos.....                                                                                                                                                             | 45 |
| Figura 1.16 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre o teor de flavonoides totais .....                                                                                                                                             | 46 |
| Figura 1.17 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre o teor de flavonoides totais .....                                                                                                                                                        | 47 |
| Figura 1.18 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre a estabilização do radical DPPH.....                                                                                                                                           | 49 |
| Figura 1.19 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre a estabilização do radical DPPH.....                                                                                                                                                      | 51 |
| Figura 1.20 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre a estabilização do radical ABTS+ .....                                                                                                                                         | 52 |
| Figura 1.21 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre a estabilização do radical ABTS+ .....                                                                                                                                                    | 53 |
| Figura 1.22 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre potencial inibitório frente <i>S. mitis</i> .....                                                                                                                              | 54 |
| Figura 1.23 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre potencial inibitório frente <i>S. mitis</i> .....                                                                                                                                         | 55 |
| Figura 1.24 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre potencial inibitório frente <i>S. mutans</i> .....                                                                                                                             | 56 |
| Figura 1.25 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre potencial inibitório frente <i>S. mutans</i> .....                                                                                                                                        | 56 |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.26 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre potencial inibitório frente <i>S. aureus</i> ..... | 57 |
| Figura 1.27 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre potencial inibitório frente <i>S. aureus</i> .....            | 58 |
| Figura 1.28 - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de maceração utilizando CLAE-DAD (320 nm) .....     | 60 |
| Figura 1.29 - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de soxhlet utilizando CLAE-DAD (320 nm).....        | 60 |
| Figura 1.30 - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de ultrassom utilizando CLAE-DAD (320 nm).....      | 61 |
| Figura 1.31 - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de refluxo utilizando CLAE-DAD (320 nm).....        | 61 |
| Figura 1.32 - Espectros no UV ilustrativos das extrações por soxhlet, maceração, ultrassom e refluxo para substância A, B, C, D, E F .....      | 62 |
| Figura 1.33 - Áreas dos picos cromatográficos para suas respectivas substâncias e métodos extrativos .....                                      | 63 |
| Figura 1.34 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância A .....                                 | 64 |
| Figura 1.35 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância A.....                                             | 64 |
| Figura 1.36 - Médias das contribuições individuais dos solventes na extração substância A.....                                                  | 65 |
| Figura 1.37 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância B .....                                 | 66 |
| Figura 1.38 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância B.....                                             | 66 |
| Figura 1.39 - Médias das contribuições individuais das técnicas de extração da substância B.....                                                | 67 |
| Figura 1.40 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância C .....                                 | 68 |
| Figura 1.41 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância B.....                                             | 68 |
| Figura 1.42 - Médias das contribuições individuais dos solventes na extração substância C.....                                                  | 69 |
| Figura 1.43 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância D .....                                 | 70 |
| Figura 1.44 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância D.....                                             | 70 |
| Figura 1.45 - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância E.....                                  | 71 |
| Figura 1.46 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância F .....                                            | 72 |
| Figura 1.47 - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância F .....                                            | 72 |
| Figura 1.48 - Porcentagem de explicação dos componentes principais.....                                                                         | 73 |
| Figura 1.49 - Contribuição das variáveis para o componente principal 1.....                                                                     | 74 |
| Figura 1.50 - Contribuição das variáveis para o componente principal 2.....                                                                     | 74 |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.51 - Distribuição e Influência das Variáveis nos Componentes Principais.....                      | 75 |
| Figura 1.52 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD .....                                                     | 78 |
| Figura 1.53 - Cromatograma em 320nm, espectro no UV (amostra) e estrutura química do ácido p-cumárico..... | 78 |
| Figura 1.54 - Cromatograma em 380nm, espectro no UV (padrão) e estrutura química do ácido elágico .....    | 79 |
| Figura 1.55 - Cromatograma em 380nm, espectro no UV (amostra) e estrutura química do ácido elágico .....   | 79 |
| Figura 1.56 - Cromatograma em 320nm, espectro no UV (amostra) e estrutura química do ácido gálico.....     | 79 |
| Figura 1.57 - Cromatograma em 320nm, espectro no UV (padrão) e estrutura química do ácido gálico.....      | 80 |

## LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 2.1 Chromatogram of geopropolis extract collected in Cruz das Almas (320nm). *The chromatogram of ellagic acid is presented at the wavelength of maximum absorption for the sample (380 nm). .....                                                                                                          | 105 |
| Figure 2.2- Curve generated to calculate effective concentration for capturing 50% of free radicals (EC <sub>50</sub> ) and confidence interval of antioxidant activity by DPPH•. ....                                                                                                                             | 111 |
| Figure 2.3 Analysis system used to determine the minimum inhibitory concentration, blue wells indicate bacterial inhibition, pink wells indicate bacterial growth. ....                                                                                                                                            | 112 |
| Figure 2.4 - Yeast growth from wells, containing concentrations of 150 (1), 100 (2), 50 (3) and 25 (4) mg.mL <sup>-1</sup> , yeast growth show fungistatic action. ....                                                                                                                                            | 112 |
| Figure 2.5 - Positioning of Ellagic acid into the Lactate dehydrogenase 1 of <i>S. aureus</i> , based on PharmMapper server prediction. Yellow dashes stand for distance between ellagic atoms and residues of enzyme. White, blue, and red sticks stand for carbon, nitrogen, and oxygen atoms, respectively..... | 114 |

## LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 3.1 - Localização de coleta da geoprópolis em Mata de São João- BA .....                                                                                                   | 119 |
| Figura 3.2 - Etapas de preparo da geoprópolis para análise polínica em microscópio.....                                                                                           | 120 |
| Figura 3.3 - Tipos polínicos registrados nas amostras de Geoprópolis produzidos em uma área de Mata Atlântica do litoral norte Bahia. ....                                        | 123 |
| Figura 3.4 - Componentes estruturais da <i>M. caesalpiniiifolia</i> .....                                                                                                         | 130 |
| Figura 3.5 - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico <i>M. caesalpiniiifolia</i> encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021) .....     | 131 |
| Figura 3.6 - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico da Melastomataceae/Combretaceae encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021).....  | 132 |
| Figura 3.7 - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico <i>Apeiba</i> encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021).....                    | 133 |
| Figura 3.8 - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico Anacardiaceae ( <i>Schinus</i> ) encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021)..... | 134 |
| Figura 3.9 - Ilustração de espécie do gênero <i>Schinus</i> .....                                                                                                                 | 135 |

|                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 3.10 - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico <i>Cocus nucifera</i> encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021) ..... | 135 |
| Figura 3.11 - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico <i>Myrcia</i> encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021) .....         | 136 |
| Figura 3.12 - Variabilidade de distribuição dos tipos polínicos para as 12 coletas .....                                                                                 | 137 |
| Figura 3.13 - Níveis de conforto em umidade em 2021 no Aeroporto Internacional Dep. Luís Eduardo Magalhães.....                                                          | 139 |
| Figura 3.14 - Condições meteorológicas observadas ao longo do ano de 2021 no Aeroporto Internacional Dep. Luís Eduardo Magalhães .....                                   | 140 |
| Figura 3.15 - Histórico de temperatura em Aeroporto Internacional Dep. Luís Eduardo Magalhães em 2021 .....                                                              | 142 |
| Figura 3.16 - Resultados da interferência significativa da sazonalidade no rendimento, teor de fenólicos e flavonoides.....                                              | 143 |
| Figura 3.17 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> coletadas no verão.....                                                         | 145 |
| Figura 3.18 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> coletadas no outono.....                                                        | 146 |
| Figura 3.19 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> coletadas no inverno.....                                                       | 147 |
| Figura 3.20 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de <i>M. scutellaris</i> coletadas na primavera .....                                                    | 148 |
| Figura 3.21 - Mapa de calor (heatmap) referente as áreas dos picos obtidos através da cromatografia a líquidos de alta eficiência.....                                   | 149 |
| Figura 3.22 - Áreas dos picos (A, B, C e D) obtidos através da cromatografia a líquidos de alta eficiência .....                                                         | 151 |
| Figura 3.23 - Áreas dos picos (E, F e G) obtidos através da cromatografia a líquidos de alta eficiência .....                                                            | 152 |
| Figura 3.24 - Contribuição das variáveis para o componente principal 1 .....                                                                                             | 153 |
| Figura 3.25 - Contribuição das variáveis para o componente principal 1 .....                                                                                             | 153 |
| Figura 3.26 - Distribuição e Influência das Variáveis nos Componentes Principais .....                                                                                   | 154 |
| Figura 3.27 - Correlação entre as variáveis fenólico, flavonoides, rendimento e perfil químico.....                                                                      | 155 |

## LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1.1 - Quantidade de geoprópolis bruta coletada por caixas .....                                                                                      | 27 |
| Tabela 1.2 - Métodos de Extração Descritos em Artigos Científicos com Abelha-sem-ferrão ..                                                                  | 27 |
| Tabela 1.3 - Resultados da validação e quantificação dos padrões comparados com amostras (ICH, 1995). .....                                                 | 36 |
| Tabela 1.4 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em extratos de geoprópolis produzida por <i>M. scutellaris</i> .....                          | 42 |
| Tabela 1.5 - Potencial do extrato de geoprópolis produzida por <i>M. scutellaris</i> em estabilizar os radicais DPPH <sup>•</sup> e ABTS <sup>+</sup> ..... | 48 |
| Tabela 1.6 - Médias dos teores de ácidos fenólicos nas amostras em $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de extrato,.....                                                   | 80 |
| Tabela 1.7 - Agrupamento para o ácido <i>p</i> -cumárico usando método de Tukey e 95% de Confiança .....                                                    | 81 |
| Tabela 1.8 - Agrupamento para o ácido elágico usando método de Tukey e 95% de Confiança .....                                                               | 82 |
| Tabela 1.9 - Agrupamento para o ácido gálico usando método de Tukey e 95% de Confiança ..                                                                   | 83 |

## LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 2.1 - Chemical elements found by MIP-OES in geopropolis samples collected in the municipality of Cruz das Almas-BA.....                                                                                                 | 105 |
| Table 2.2 - Chemical profile analysis performed by high performance liquid chromatography with the retention time and absorption in UV-vis region.....                                                                        | 106 |
| Table 2.3 - Table of Quantification by HPLC-DAD and Validation Results.....                                                                                                                                                   | 110 |
| Table 2.4 - Microbiological activity of <i>Melipona scutellaris</i> geopropolis from the Recôncavo region of Bahia, expressed by the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal and fungicidal concentration..... | 111 |
| Table 2.5 - Target detected by PharmMapper server for the ellagic acid, gallic acid, trans-cinnamic acid, and p-coumaric acid with their Fit scores and Normalized fit scores.....                                            | 113 |

## LISTA DE TABELAS CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 3. 1- Frequência de distribuição (%) dos tipos polínicos encontrados na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021)..... | 124 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|



## INTRODUÇÃO GERAL

A preservação dos recursos genéticos vegetais é uma preocupação abrangente em diversas áreas de pesquisa ao redor do mundo. O Brasil é reconhecido por abrigar a maior diversidade genética de plantas do mundo, grande parte ainda desconhecida e não explorada (QUEIROZ, 2011; FERRO; ASSAD; BONACELLI, 2013; NUNES; SILVA; FERREIRA, 2019; BURLE, 2019). Nesse contexto, na maioria das estratégias estabelecidas para a conservação desses recursos genéticos destacam-se a importância dos polinizadores. Eles desempenham um papel essencial no ecossistema e na preservação dos biomas, atuando como protagonistas na reprodução de diversas espécies vegetais (ARCHER et al., 2014; BEZERRA et al., 2020; HAUTEQUESTT et al., 2020).

Estudos demonstram que a maioria das plantas depende de polinizadores para se reproduzirem e perpetuarem sua espécie, entre os quais se destacam as abelhas sem ferrão. Por conseguinte, a redução na população dessas abelhas pode acarretar perdas na preservação da flora mundial (OLLERTON et al., 2011; ZAPECHOUKA; SILVA, 2021). É relevante ressaltar a importância dos polinizadores para espécies silvestres e/ou ameaçadas de extinção, como as abelhas sem ferrão, que desempenham um papel crucial na manutenção de biomas, como a Mata Atlântica (SILVA; PAZ, 2012; VANBERGEN, 2013; VIANNA et al., 2013; MATOS; SANTOS, 2019).

Pensando na manutenção e recuperação da Mata Atlântica o Ministério do Meio Ambiente lançou o Plano Nacional de Recuperação da Vegetação Nativa - Proveg e Planaveg em 2017. O objetivo do plano é promover a recuperação da vegetação nativa da Mata Atlântica em larga escala, minimizando os custos e maximizando os esforços (BRASIL, 2017). A interação entre plantas e animais por meio da polinização favorece a manutenção e a renovação da flora (CORREIA; FRANCISCO; PERUQUETTI, 2017).

Dentre os polinizadores encontram-se as abelhas sem ferrão que apresentam característica peculiar em sua estrutura corporal, pois seus ferrões são atrofiados, o que favorece sua domesticação e a implantação de colmeias em comunidades. Essas abelhas também são conhecidas como abelhas eussociais, devido à sua facilidade de criação (CAMARGO; OLIVEIRA; BERTO, 2017; LUCENA; RABICO; SIMÕES, 2018). O Brasil abriga a maior diversidade de abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponíneos (VENTURIERE, 2008).

Entre as diversas espécies de abelhas, destaca-se a *Melipona scutellaris*, nativa da Mata Atlântica, anteriormente encontrada desde a faixa da Amazônia até a Bahia.

Contudo, devido à destruição progressiva da Mata Atlântica, sua distribuição foi restrita às regiões da Bahia até o Rio Grande do Norte. A região da Bahia é notável por suas vastas áreas de mata úmida, proporcionando um habitat ideal para a *Melipona scutellaris*. Além disso, a Bahia abriga a maior extensão territorial do bioma Mata Atlântica, o que também contribui para a presença dessa espécie de abelha (CAMARGO; PEDRO, 2007; RESENDE, 2012).

Através das colmeias das abelhas sem ferrão, é possível obter uma variedade de produtos, incluindo cera, mel, pólen e geoprópolis. Este último é resultado da mistura de barro e resinas coletadas de espécies vegetais que se encontram nas proximidades das colmeias (BARTH, 2006; CHUTTONG et al., 2023). As abelhas utilizam a própolis e geoprópolis para preencher as frestas das colmeias, com o objetivo de reduzir a entrada de vento frio e evitar a entrada de inimigos naturais, como fungos, bactérias e vírus, além de outros insetos (DUTRA, 2008; CUNHA, 2013). No entanto, a geoprópolis possui funções que vão além da proteção das colônias de abelhas sem ferrão, sendo também empregada na construção de estruturas externas (como tubos de entrada) e internas (como discos de cria, lamelas de invólucro e potes de alimento) das colônias de Melíponas (SANTOS et al., 2009).

Estudos mostram a eficácia antimicrobiana de geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelha-sem-ferrão frente patógenos como: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus Parasanguinis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (POPOVA et al., 2007; DUALIBE et al., 2007; CUNHA, 2013; LIMA, 2015; MACIEL et al., 2015; ROCHELLE et al., 2016). Além disso, outras atividades biológicas foram testadas, tais como ação anti-inflamatória, cicatrizante, toxicidade, antinociceptiva e antioxidante (FRANCHIN et al., 2012; SILVA, 2016; ARAUJO, 2016; CUNHA, 2016).

Considerando o potencial promissor da geoprópolis das abelhas sem ferrão e a escassez de trabalhos científicos disponíveis sobre a geoprópolis produzida pela espécie *M. scutellaris*, o objetivo deste trabalho é determinar as condições de extração que assegurem maior rendimento, composição química, perfil químico, atividade antioxidante e antimicrobiana. Além disso, busca-se investigar alterações no perfil palinológico e químico das amostras coletadas em diferentes períodos do ano. Assim como, apresentar possíveis alvos biológicos ligados à atividade antimicrobiana através do uso de recursos

computacionais, demonstrando as interações moleculares com metabólitos identificados na geoprópolis.

Portanto, visando facilitar a compreensão, a tese foi organizada em 3 capítulos. O primeiro e segundo capítulos abordam os resultados obtidos a partir da geoprópolis coletada no Município de Cruz das Almas, BA. Enquanto o capítulo três trata dos resultados relacionados à geoprópolis de Mata de São João, BA. A coleta em municípios distintos foi necessária devido às restrições impostas durante o período da pandemia.

## REFERÊNCIAS

ARQUEIRO, C. R.; PIRK, C. W. W.; CARVALHEIRO, L. G. C.; NICOLSON, S. W. Implicações econômicas e ecológicas do viés geográfico na ecologia de polinizadores à luz do declínio de polinizadores. **OIKOS**, v. 23, n. 4, p. 401-407, 2014.

ARAÚJO, K. S. S. *et al.* Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Botânica**, v. 46, n.1, p. 61-68, 2016.

BURLE, M. L. Conservação de recursos genéticos vegetais na Embrapa – histórico e perspectivas futuras. **EMBRAPA**, Comunicado técnico 206, Brasília, DF Março, 2019.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2007. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S.; Urban, D. & Melo, G. A. R. eds. **Catálogo de Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical**. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia. p.272-578.

CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Stingless bee honey: technical regulation proposal. **Braz. J. Food Technol**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2017.

CHUTTONG, Bajaree *et al.* Exploring the Functional Properties of Propolis, Geopropolis, and Cerumen, with a Special Emphasis on Their Antimicrobial Effects. **Foods**, v. 12, n. 21, p. 3909, 2023.

CUNHA, M. G. *et al.* Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 23, p. 1-9, 2013.

DUAİLIBE S. A.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 5, p. 420-423, 2007.

FERRO, A. F. P.; ASSAD, A. L. D.; BONACELLI, M. B. O Processo de Regulamentação do Acesso aos Recursos Genéticos: a Convenção sobre Diversidade Biológica e outros Tratados. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 23-29, 2006.

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

HAUTEQUESTTP, A. P *et al.* Pollen Load Spectrum of Tomato Pollinators. *Neotropical Entomology*, v. 49, n. 1, p. 491–500, 2020.

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 em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará. 2015.

LUCENA, L. L.; RABICO, F.; SIMÕES, Z. L. P. Reproductive capacity and castes in eusocial stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Current Opinion in Insect Science**, v. 31, n.1, p. 1-9, 2018.

MACIEL, C. R *et al.* Antimicrobial activity of bee geopropolis of jataí (*Tetragonisca angustula*) against bacteria isolated from crossbred cows milk with mastites. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 38-46, 2015.

NUNES, B. H.; SILVA, J. B.; FERREIRA, L.O.C. direito e biologia: as relações jurídicas e a Regulação de recursos genéticos vegetais para a consolidação da bioeconomia. **Revista Internacional de Direito Ambiental**, v. 8, n. 22, p. 35-52 2019.

POPOVA, M. P *et al.* Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. **Apidologie**, v. 38, n. 3, p. 306-308, 2007.

QUEIROZ, M. A. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.6, p. 1135-1150, 2011.

RESENDE, H. C. **Phylogeography and conservation of *Melipona capixaba* Moure and Camargo, 1994 and *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, and biogeography of the genus *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae)**. 2012. 155 f. Tese (Doutorado em genética animal; genética molecular e de microrganismos; genética quantitativa; genética vegetal; Me) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SILVA, J. B. *et al.* Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. Pesquisa **Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-880, 2016.

VANBERGEN, A. J. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 11, n. 5, p. 251–259, 2013.

VENTURIERI, G. C. Criação de abelhas indígenas sem ferrão. 2. ed. rev. atual. - Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2008.

VIANNA, J. L, CARVALHO, C. A. L, WALDSCHMIDT, A. M. Genetic variability in *Melipona scutellaris* from Recôncavo, Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3444–3454, 2013.

ZAPECHOUKA, A. J.; SILVA, F. F. Uma análise da teoria sobre a ação humana e suas consequências para as abelhas nativas sociais. Meio **Ambiente (Brasil)**, v.3, n.5. 81-93, 2021.

## **CAPÍTULO 1**

**Comparação dos Métodos de Extração para Geoprópolis produzida pela *Melipona scutellaris*: Avaliação da Composição Fenólica, Rendimento, Atividade Antioxidante, Antimicrobiana e Perfil químico**

## **CAPÍTULO 1: Comparação dos métodos de extração para geoprópolis produzida pela *Melipona scutellaris*: avaliação da composição fenólica, rendimento, atividade antioxidante, antimicrobiana e perfil químico**

### **RESUMO**

A definição do método de extração é considerada uma das etapas principais no estudo fitoquímico de produtos naturais, pois os parâmetros utilizados para extrair os compostos ativos podem influenciar no perfil químico e atividade terapêutica. Desta maneira, o objetivo desta pesquisa consistiu em avaliar como a extração afeta o rendimento, composição química e a atividade biológica da geoprópolis. Para tal, foram utilizadas amostras de geoprópolis coletada em 9 caixas de abelhas (*M. scutellaris*) no município de Cruz das Almas, Ba. Foram selecionadas quatro técnicas de extração, e as condições de cada método foram estabelecidas com base nos princípios de funcionamento de cada um: maceração (48 horas, 25 °C), ultrassom (1 hora, 40°C), refluxo (1 hora, 80 °C), soxhlet (2 horas, 80°C). Os rendimentos obtidos variaram de  $7,6 \pm 0,35$  a  $8,0 \pm 0,38\%$  para o método de ultrassom, de  $9,9 \pm 0,70$  a  $12,0 \pm 1,30\%$  para a maceração, de  $9,2 \pm 0,65$  a  $10,0 \pm 0,85\%$  para o refluxo e de  $11,2 \pm 0,35$  a  $17,6 \pm 0,49\%$  para o soxhlet. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando a técnica espectrofotométrica, através dos métodos de Folin-Ciocalteu ( $\lambda=760$  nm) e flavonoides por meio da complexação com cloreto de alumínio 2% ( $\lambda=415$  nm). Os teores de fenólicos totais variaram entre  $16,57 \pm 0,87$  e  $19,16 \pm 0,11$  mgEAG/100g, enquanto os teores de flavonoides totais variaram entre  $1,61 \pm 0,26$  a  $2,14 \pm 0,34$  mgQE/100g. O potencial de inibição de radicais livres foi avaliado utilizando os métodos de estabilização do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ) e do radical 2,2'-azinobis (3 - etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfônico) (ABTS $\cdot^+$ ). Pelo método de estabilização do radical ABTS $\cdot^+$ , os valores de trolox variaram de  $2,14 \pm 0,34$  a  $7,43 \pm 1,33$   $\mu$ M trolox/g, enquanto pelo método DPPH $\cdot$  variaram de  $7,09 \pm 0,32$  a  $10,88 \pm 0,41$   $\mu$ g/mL. Os dados demonstraram que a escolha do método de extração depende do propósito de uso do extrato de geoprópolis. Além disso, observou-se uma interação significativa entre a técnica de extração e o solvente extrator para rendimento, DPPH, ABTS, teor de flavonoides, perfil químico e atividade antimicrobiana. Não foi observada interação significativa entre o solvente e o método em relação ao teor de fenólicos. A análise do perfil químico foi realizada tanto qualitativamente quanto quantitativamente usando cromatografia a líquidos de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Os métodos de refluxo, maceração, ultrassom e Soxhlet não apresentaram diferenças significativas no perfil químico dos compostos majoritários. Em relação à quantificação dos ácidos fenólicos, foram identificados e quantificados ácido gálico, ácido elágico, ácido *p*-cumárico. O ácido *p*-cumárico foi o composto com a maior concentração, e a extração com fluido supercrítico mostrou-se favorável para sua obtenção. Em suma, a combinação desses fatores interfere nas variáveis estudadas. Ademais, os resultados obtidos neste capítulo podem contribuir para a comunidade científica dispondo de dados do estudo de extração, uma vez que os métodos selecionados abrangem princípios extrativos diferentes (maceração, ultrassom, soxhlet, refluxo e supercrítico), fornecendo dados que podem direcionar a seleção do método de extração e solvente mais adequados para otimizar o rendimento, composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Métodos extrativos; Abelha-sem-ferrão; Composição fenólica; Atividade antioxidante; Atividade antimicrobiana

## **Chapter 1: comparison of extraction methods for geoprópolis produced by *Melipona scutellaris*: evaluation of Phenolic composition, yield, antioxidant, antimicrobial activity, and chemical profile**

### **ABSTRACT**

The definition of the extraction method is considered one of the main steps in the phytochemical study of natural products, as the parameters used to extract the active compounds can influence the chemical profile and therapeutic activity. Thus, the objective of this research was to evaluate if extraction affects the yield, chemical composition, and biological activity of geopropolis. For this purpose, geopropolis samples collected from 9 beehives (*M. scutellaris*) in the municipality of Cruz das Almas, Bahia, were used. Four extraction techniques were selected, and the conditions of each method were established based on the operating principles of each one: maceration (48 hours, 25 °C), ultrasound (1 hour, 40°C), reflux (1 hour, 80 °C), Soxhlet (2 hours, 80°C). Yields ranged from  $7.6 \pm 0.35$  to  $8.0 \pm 0.38\%$  for ultrasound, from  $9.9 \pm 0.70$  to  $12.0 \pm 1.30\%$  for maceration, from  $9.2 \pm 0.65$  to  $10.0 \pm 0.85\%$  for reflux, and from  $11.2 \pm 0.35$  to  $17.6 \pm 0.49\%$  for Soxhlet. The quantification of phenolic compounds was performed using the spectrophotometric technique, through the Folin-Ciocalteu ( $\lambda=760$  nm) and flavonoids methods by complexation with 2% aluminum chloride ( $\lambda=415$  nm). The total phenolic contents varied between  $16.57 \pm 0.87$  and  $19.16 \pm 0.11$  mg GAE/100g, while the total flavonoid contents ranged from  $1.61 \pm 0.26$  to  $2.14 \pm 0.34$  mg QE/100g. The potential for free radical inhibition was evaluated using the methods of stabilizing the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) and the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS). By the ABTS radical stabilization method, the trolox values ranged from  $2.14 \pm 0.34$  to  $7.43 \pm 1.33$   $\mu$ M trolox/g, while by the DPPH method, they ranged from  $7.09 \pm 0.32$  to  $10.88 \pm 0.41$   $\mu$ g/mL. The data demonstrated that the choice of the extraction method depends on the intended use of the geopropolis extract. Additionally, a significant interaction was observed between the extraction technique and the extracting solvent for yield, DPPH, ABTS, flavonoid content, chemical profile, and antimicrobial activity. No significant interaction was observed between the solvent and the method regarding the phenolic content. In summary, the combination of these factors interferes with the variables studied. Furthermore, the results obtained in this chapter can contribute to the scientific community by providing data on the extraction study, since the selected methods encompass different extractive principles (maceration, ultrasound, Soxhlet, reflux), providing data that can guide the selection of the most appropriate extraction method and solvent to optimize yield, chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activity.

**Keywords:** Extraction methods; Stingless bee; Phenolic composition; Antioxidant activity; Antimicrobial activity



## 1.1 INTRODUÇÃO

O processo de extração consiste na utilização de parâmetros que favoreçam a retirada dos compostos ativos do material vegetal (PANDEY; TRIPATY, 2014). É necessário salientar que a extração dos compostos químicos da própolis e geoprópolis diferem das plantas medicinais, pois, os produtos obtidos pelas abelhas são resinas coletadas das plantas, e a geoprópolis especificamente tem sua resina misturada com o barro, ou seja, a composição química e a estrutura física da própolis e do material vegetal (folhas, caule e raiz) são diferentes (TRUSHEVA; TRUNKOVA; BANKOVA, 2007; AZWANIDA, 2015; BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2021). Sendo assim, a extração dos compostos químicos que compõe a geoprópolis fundamenta-se na solubilização dos compostos bioativos presentes nesta resina (BANKOVA; TRUSHEVA; POPOVA, 2021).

Os métodos de extração são diversos, e as condições aplicadas no sistema de extração podem favorecer ou não a extração dos metabolitos secundários de interesse. A escolha dependerá das características do material que está sendo estudado (AZWANIDA, 2015). Dentre os métodos utilizados para a obtenção dos extratos encontram-se: maceração, percolação, digestão, decocção, soxhlet, refluxo, extração em contracorrente, infusão, extração assistida por micro-ondas, ultrassom e fluido supercrítico (PANDEY; TRIPATY, 2014; FRANZEN *et al.*, 2018; MINELLO *et al.*, 2021). O delineamento experimental de um processo extrativo ainda sofre influência do tempo, temperatura, solvente, concentração do solvente extrator e polaridade. Essa etapa é fundamental para obtenção de extratos com excelentes rendimentos, perfil químico e atividade biológica (PANDEY; TRIPATY, 2014; ABUBAKAR; HAQUE, 2020).

Quando se utiliza descritores correlacionados com própolis marrom, vermelha e verde e seus métodos de extração, são obtidas informações consolidadas em artigos científicos. A geoprópolis, por sua vez, possui raros estudos fundamentados na extração específica de geoprópolis de *M. scutellaris*. Nunes e colaboradores (2018) estudaram as principais interferências dos métodos de extração na composição da própolis verde e vermelha. Seus resultados mostraram que houve diferença significativa entre as extrações, sendo que a extração etanólica se destacou com maior teor de flavonoides e fenólicos totais, resultando em melhores resultados quanto a atividade antioxidante e antimicrobiana. Segundo Suran e colaboradores (2021), o perfil químico dos extratos de própolis depende da técnica, proporção e solvente extrator utilizado.

A composição química da própolis e geoprópolis é considerada complexa devido à diversidade vegetal, podendo variar de acordo com a sazonalidade regional, época e técnica de colheita (SFORCIN *et al.*, 2000; MENEZES, 2005; CARDOZO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015). Além disso, autores também afirmaram que a composição da geoprópolis sofre influência das características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). A função protetora da própolis para colmeia, proporciona a efetividade desta resina natural contra uma variedade de patógenos humanos e animais, despertando o interesse pelas suas propriedades medicinais (SALOMÃO *et al.*, 2004).

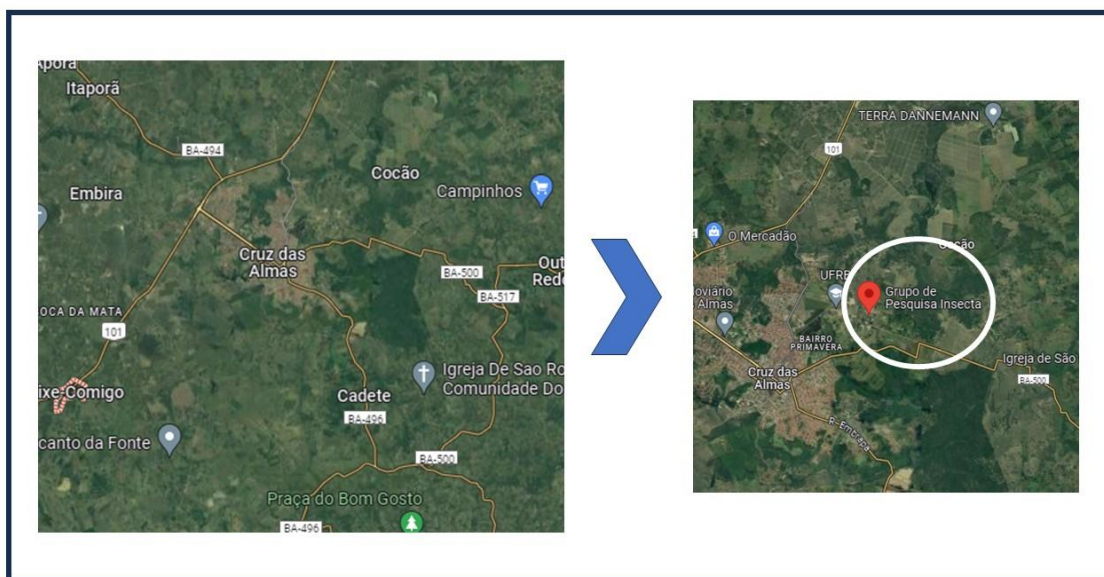
Diante deste contexto, o estudo preliminar para escolha do método de extração é essencial para definir os melhores parâmetros na obtenção de um produto com composição química que favoreça a atividade antioxidante e antimicrobiana.

Este estudo é necessário, uma vez que, artigos científicos publicados com extratos de geoprópolis de *M. scutellaris* utilizam métodos aplicados para própolis produzida pela abelha Italiana, que possuem características e composição distintas da geoprópolis de Meliponíneos, ou seja, o referido trabalho poderá contribuir com informações que ajudem outros pesquisadores a escolherem a melhor técnica extrativa que evidenciem melhor atividade antioxidante e antimicrobiana. Portanto, o propósito deste estudo é investigar como a extração influencia o rendimento, a composição química e a atividade biológica da geoprópolis da *M. scutellaris*.

## **1.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1.2.1 Coleta das amostras de geoprópolis de *M. scutellaris***

A geoprópolis foi coletada no município de Cruz das Almas, BA (Latitude: 12°40'39" S, Longitude: 39°06'23" W), no Núcleo de Estudos Insecta (INSECTA/UFRB). Optou-se pela coleta no município de Cruz das Almas devido à excelente qualidade ambiental da região, além de estar afastado de industriais e plantações agrícolas (Figura 1.1). Essa escolha foi embasada em estudos anteriores conduzidos pelo Grupo de Pesquisa em Bioprospecção vegetal (GPBV/UEFS), que confirmaram a ausência de metais potencialmente tóxicos na geoprópolis. A escolha da espécie da abelha-sem-ferrão se deu pelo porte da abelha e capacidade de propolização, bem como por poucos estudos fitoquímicos e biológicos com essa espécie.



**Figura 1.1-** Mapa de Localização das Coletas de Geoprópolis por *Melipona scutellaris* em Cruz das Almas, Bahia.

Inicialmente, foram selecionadas 9 caixas de abelha *M. scutellaris*, e a geoprópolis residual presente nas caixas foi retirada para não haver a mistura de amostras antigas, que poderiam conter compostos degradados ou oxidados. A coleta ocorreu em duas semanas consecutivas durante o mês de fevereiro de 2020. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro e conservadas sob refrigeração. Posteriormente as amostras foram trituradas com auxílio do gral e pestilo (Figura 2.2) e pesadas para mistura e obtenção do pool (Tabela 1.1).



**Figura 1.2 -** Processo de Pulverização de Geoprópolis

**Tabela 1.1** - Quantidade de geoprópolis bruta coletada por caixas

| <b>Caixas</b> | <b>Peso (g)</b> |
|---------------|-----------------|
| <b>1</b>      | 215,90          |
| <b>2</b>      | 271,77          |
| <b>3</b>      | 555,86          |
| <b>4</b>      | 311,11          |
| <b>5</b>      | 240,82          |
| <b>6</b>      | 97,98           |
| <b>7</b>      | 149,61          |
| <b>8</b>      | 100,81          |
| <b>9</b>      | 408,63          |
| <b>Total</b>  | 2352,49         |

### 1.2.2 Extração por métodos convencionais e não convencionais

A escolha dos parâmetros de extração do estudo baseou-se nos métodos e condições de extração para própolis e geoprópolis de abelha-sem-ferrão publicados em artigos científicos (Tabela 1.2). A pesquisa foi feita no banco de dados científicos PubMed, Scopus, Web of Science, SciELO e ScienceDirect. Como descritores de pesquisa “extraction, geopropolis and stingless bee”.

**Tabela 1.2** - Métodos de Extração Descritos em Artigos Científicos com Abelha-sem-ferrão

| <b>Espécie</b>           | <b>Método</b> | <b>Solvente</b> | <b>Período de extração</b> | <b>Temperatura</b> | <b>Autor</b>                   |
|--------------------------|---------------|-----------------|----------------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>M. fasciculata</i>    | Maceração     | Etanol 70%      | 48h                        | Ambiente           | Dultra <i>et al.</i> , 2019    |
| <i>M. fasciculata</i>    | Maceração     | Etanol 70%      | 24h                        | Ambiente           | Oliveira <i>et al.</i> , 2019  |
| <i>M. fasciculata</i>    | Maceração     | Etanol 70%      | 7 dias                     | Ambiente           | Hochheim <i>et al.</i> , 2019  |
| <i>M. fasciculata</i>    | Maceração     | Etanol 70%      | 24h                        | Ambiente           | Araujo <i>et al.</i> , 2016    |
| <i>M. quadrifasciata</i> | Ultrassom     | Metanol 100%    | 30 min                     | Ambiente           | Piccinini <i>et al.</i> , 2022 |
| <i>M. scutellaris</i>    | Agitação      | Etanol 80%      | 1h                         | 70 °C              | Silva <i>et al.</i> , 2020     |
| <i>M. orbignyi</i>       | Agitação      | Etanol 70%      | 24h                        | Ambiente           | Santos <i>et al.</i> , 2018    |

|                     |           |                |                  |          |                            |
|---------------------|-----------|----------------|------------------|----------|----------------------------|
| <i>M. subnitida</i> | Ultrassom | Etanol<br>100% | Não foi descrito | Ambiente | Silva <i>et al.</i> , 2014 |
|---------------------|-----------|----------------|------------------|----------|----------------------------|

Os métodos definidos abrangeram os convencionais e não convencionais, a Figura 1.3 apresenta um resumo dos parâmetros aplicados para cada técnica de extração. A maceração foi escolhida devido ao seu amplo uso e poder ser realizada em temperatura ambiente. O ultrassom apresenta vantagens de otimização do tempo de extração pelo uso de ondas sonoras de alta frequência, enquanto o refluxo consiste em um sistema fechado e utiliza a temperatura para aumentar a eficiência de extração. Quanto ao soxhlet, sua vantagem consiste na renovação constante do solvente no sistema, e o uso de fluido supercrítico foi adotado por ser um método alinhado aos princípios da química verde (PANDEY; TRIPATY, 2014; FRANZEN *et al.*, 2018; MINELLO *et al.*, 2021).

Para os quatro métodos de extração empregados (maceração, ultrassom, refluxo e soxhlet) foram utilizados 3 sistemas de solventes (etanol 70%, etanol 95% e metanol 100%). A partir dessa etapa, foram estabelecidos códigos de identificação para os extratos (Etanol – EtOH; Metanol – MeOH) de acordo com suas proporções (70%, 95% e 100%).

O volume de solvente foi padronizado para maceração, ultrassom e refluxo, com 100 mL de solvente. No entanto, para o soxhlet, o volume foi dobrado para 200 mL, uma vez que o sistema requer uma quantidade suficiente de solvente para preencher a câmara do soxhlet e permanecer no balão durante o processo.

A duração da extração foi de 48 horas para a maceração, 1 hora para o ultrassom e o refluxo, enquanto para o soxhlet foi necessário dobrar o tempo de extração, pois o solvente precisa preencher todo o sistema para entrar em contato com a amostra.

A temperatura aplicada para o refluxo e soxhlet foi definida de acordo com a temperatura de ebulição dos solventes (64,7 °C metanol e 78,37 °C etanol) sendo assim padronizou-se o sistema em uma temperatura de 80 °C para os dois solventes. E a extração por ultrassom 40 °C, temperatura padrão do equipamento. As extrações foram realizadas em triplicata.

A extração com fluido supercrítico também foi selecionada como uma técnica não convencional. A extração por fluido supercrítico foi conduzida a uma temperatura de 40 °C e uma pressão de 350 bar. Um volume total de 0,540 m<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> e 7,5% de álcool etílico como cossolvente foram aplicados ao sistema.

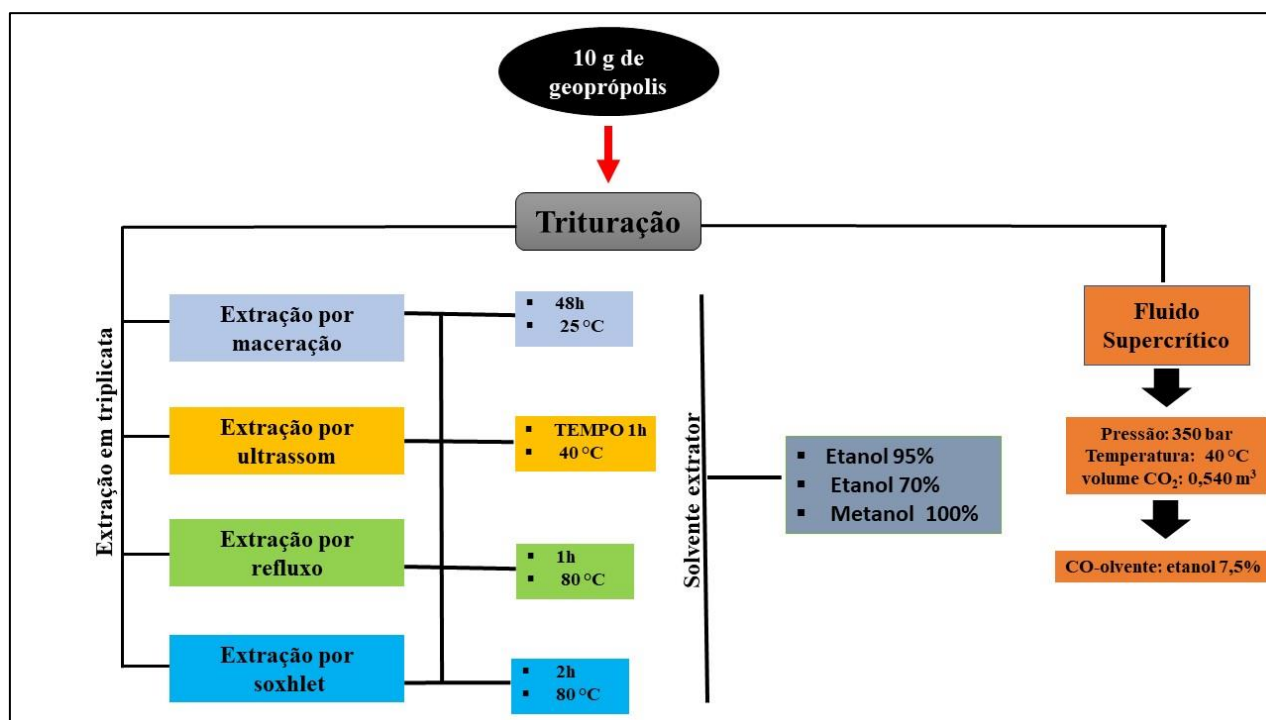
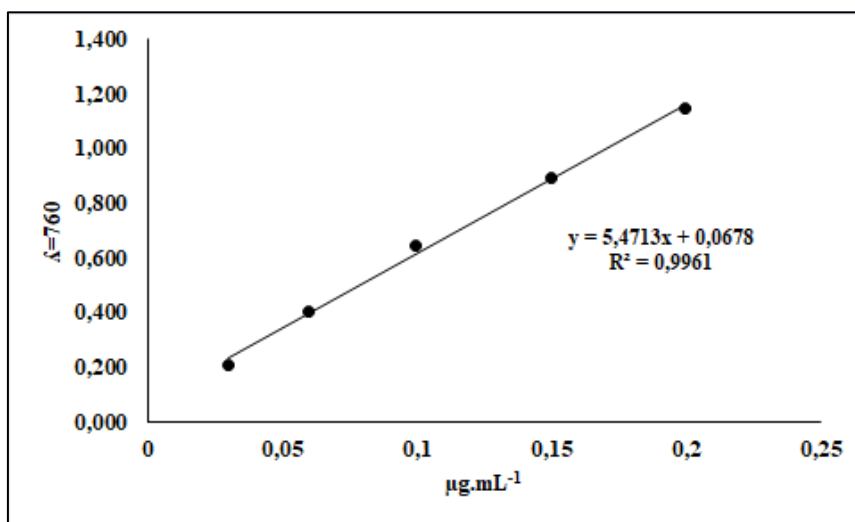


Figura 1.3 - Resumo dos Parâmetros de Extração Utilizados nos Estudo

### 1.2.3 Quantificação do teor de fenólicos totais através da técnica espectrofotométrica

A quantificação de fenólicos totais foi realizada através do método de FolinCiocalteu (FC) proposto por Oliveira (2009). Foram preparadas a solução-reagente FC 1:10 (v/v) em água destilada e a solução de carbonato de sódio a 7,5%. Além disso, foram preparadas soluções dos extratos em concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL das diferentes concentrações de ácido gálico e das soluções dos extratos de geoprópolis. Em seguida acrescentou-se 2,5 mL da solução-reagente de FC a cada tubo de ensaio. Após três minutos de incubação foram acrescentados 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5% aos tubos, aquecidos a 50°C, em banho-maria por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo, por 3 minutos. A reação resultante, foi avaliada em Multiskan GO (Skinit software 3.2) em comprimento de onda de  $\lambda = 760 \text{ nm}$ .

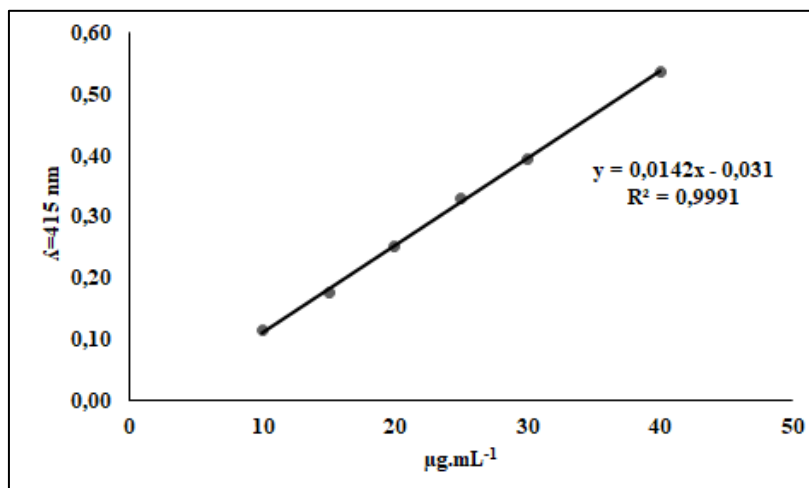
A curva de calibração do padrão ácido gálico foi construída utilizando as absorbâncias de cada concentração que variou entre 30 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 1.4). A partir da equação da reta ( $y = 5,4713x + 0,0678$ ;  $r^2 = 0,9961$ ) foi possível avaliar o teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato ( $\text{mgEAG.100g}^{-1}$ ).



**Figura 1.4 -** Curva de Calibração para Fenólicos Totais

#### **1.2.4 Quantificação do teor de flavonoides totais através da técnica espectrofotométrica**

O teor de flavonoides totais foi determinado com base na metodologia descrita por Pothitirat e colaboradores (2009). Foram utilizadas soluções metanólicas dos extratos de geoprópolis em concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras com dificuldades de solubilização foram colocadas em banho de ultrassom por 5 minutos, para total solubilização. Inicialmente foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  da solução de cloreto de alumínio 2% e acrescido o mesmo volume das soluções metanólicas dos extratos. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão quercetina (QE). A reação dos extratos e padrão com a solução de cloreto de alumínio 2% foi avaliada após 10 min em espectrofotômetro Multiskan GO (Skanit software 3.2) com comprimento de onda de  $\lambda = 415\text{nm}$ . Para calcular a concentração de flavonoides foi preparada uma curva analítica da quercetina na faixa de  $5,0$  a  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . As absorbâncias obtidas foram utilizadas na regressão linear (Figura 1.5), gerando a equação da reta ( $y = 0,0142x - 0,031$ ;  $r^2 = 0,9991$ ), a qual foi empregada no cálculo das amostras, o resultado foi expresso em mg de quercetina equivalente por 100 g de extrato ( $\text{mg QE.}100\text{g}^{-1}$ ).



**Figura 1.5** - Curva de Calibração para Flavonoides Totais

### 1.2.5 Avaliação da atividade antioxidante através do sequestro de radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Para avaliação da atividade antioxidante foi empregada a metodologia proposta por Malterud (1993). Foi preparada uma solução de DPPH• concentrada, utilizando 45mg de DPPH e 100 mL de álcool etílico. Foi usada alíquota de 10 mL do concentrado de DPPH• para o preparo de uma nova solução do radical em 45,00 µg.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente as soluções foram armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz. O padrão propilgalato foi utilizado como controle positivo na concentração de 20 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram empregadas diferentes concentrações do extrato, variando de 1,71 a 20,6 µg mL<sup>-1</sup>. Esse intervalo foi estabelecido através de um teste inicial que avaliou o potencial antioxidante nas concentrações alta, média e baixa (60, 20 e 1 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Já para determinar a concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) dos padrões quercetina e ácido gálico, as concentrações utilizadas foram de 0,34 a 6,87 µg mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de 4,2 µL das amostras foram adicionadas a 240 µL de DPPH• e o mesmo procedimento foi realizado com os padrões. A análise da reação foi feita com auxílio de leitor de multiplicas (Multiskan GO Skanit software 3.2), sendo a leitura realizada em comprimento de onda (λ) de 517 nm.

A primeira leitura foi feita com a microplaca contendo somente a solução do DPPH• sendo a segunda leitura realizada após 30 minutos de reação. Todos os testes foram realizados em triplicata em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para determinar a quantidade suficiente para estabilizar 50% dos radicais foram utilizadas as equações da reta geradas através da correlação da concentração e porcentagem de inibição. O potencial antioxidante dos extratos foi expresso com base no índice de



atividade antioxidante descritos por Scherer e colaboradores (2009). Considerando a ação antioxidante baixa quando o índice de atividade antioxidante  $IAA < 0,5$ , ação moderada quando o IAA estiver entre 0.5 e 1.0, ação antioxidante forte quando o IAA for de 1,0 a 2,0 e ação muito forte para valor de  $IAA > 2,0$ .

**Equação 1:** Cálculo do índice de atividade antioxidante (IAA)

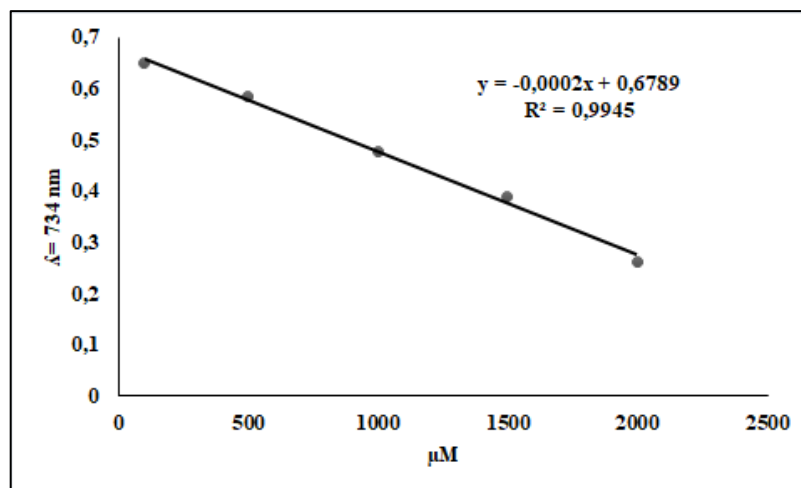
$$IAA = [DPHH](\mu\text{g/mL}) / CE_{50}(\mu\text{g/mL})$$

#### **1.2.6 Avaliação da atividade antioxidante através do sequestro de radical livre radical 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS**

Inicialmente foram preparadas as soluções de ABTS e persulfato de potássio nas concentrações de 7 mM e 140 mM respectivamente. Posteriormente adicionados 5 mL da solução estoque de ABTS e 88  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de potássio em um frasco de vidro âmbar mantido no escuro e em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , por 16h para obtenção do radical  $ABTS^{\cdot+}$ . Após o período de incubação, a solução reagente foi calibrada adicionando álcool etílico até obtenção da absorbância de 0,700 nm.

Foi definido um intervalo adequado de concentrações para a amostra por meio de um teste preliminar, no qual o potencial antioxidante foi avaliado em concentrações alta, média e baixa (15, 5 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Com base nessa análise, o intervalo de concentrações da amostra foi estabelecido entre 1 e 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto o padrão Trolox foi utilizado em concentrações de 100 a 2000  $\mu\text{M}$ . A reação foi realizada em microplaca, onde foram utilizados 170  $\mu\text{L}$  da solução reagente e 16  $\mu\text{L}$  das amostras e padrão. Após 6 minutos reação as microplacas foram analisadas com leitor de multiplicas (Multiskan GO Skanit software 3.2) em comprimento de onda de  $\lambda = 734 \text{ nm}$ .

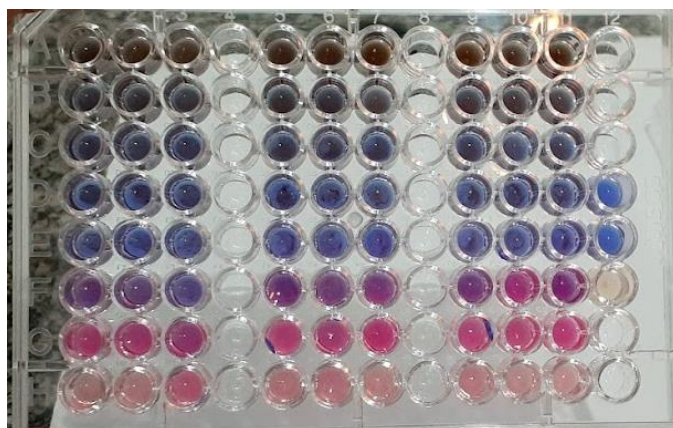
Posteriormente foi plotada uma curva padrão (Figura 1.6) para obtenção da equação da reta ( $y = -0,0002x + 0,6789$ ) e  $R^2 = 0,9945$ . Através desta, foi possível determinar a absorbância de 0,4789 nm referente a 1.000 M de trolox. O valor de 0,4789 foi utilizado para calcular a concentração  $\mu\text{M trolox.g}^{-1}$ .



**Figura 1.6** - Curva de calibração do padrão Trolox

### 1.2.7 Avaliação da influência dos parâmetros de extração na atividade antimicrobiana

As bactérias de referência utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 00402), *Streptococcus mutans* (ATCC 00456) e *Streptococcus mitis* (ATCC 00456). Essas cepas foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), localizado no Rio de Janeiro. As culturas, mantidas em condições refrigeradas, foram inoculadas em placas contendo BHI (brain heart infusion) e incubadas a uma temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após esse período, foram preparadas suspensões microbianas com turbidez utilizando a escala de 0,5 McFarland como referência (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Para preparo das soluções dos extratos foi utilizado água estéril e dimetilsulfóxido 10% como agentes solubilizantes. Após adição dos solubilizantes ao extrato, estes foram homogeneizados em vortex e mantidos em banho maria a  $60^\circ\text{C}$  até completa solubilização. Foram testadas concentrações do extrato que variaram entre 0,12 a 15,00 mg.mL<sup>-1</sup>. O antibiótico cloranfenicol (200 mg.mL<sup>-1</sup>) foi utilizado como controle positivo para bactérias. Já o controle negativo consistiu em uma solução de dimetil sulfóxido 10% em meio de cultura. Foi utilizado o método de microdiluição em placa, adaptando-se a técnica proposta por Santos e colaboradores (2007). Em microplaca de 96 poços foram acrescentados 100µL de meio BHI, 100µL do extrato e 16 µL do microrganismo, após 24 h de incubação. Posteriormente 50 µL dos reagentes foram adicionados aos poços, resasurina 0,01% (VETEC) para bactérias. As concentrações finais do extrato variaram de 15,00 a 0,12 mg.mL<sup>-1</sup>. A atividade inibitória foi avaliada quanto a reação colorimétrica (Figura 1.7).



**Figura 1.7** - Avaliação do crescimento bacteriano através da reação colorimétrica. Tonalidades azuis indicam concentrações do extrato que inibiram o crescimento bacteriano, enquanto as tonalidades rosa representam concentrações que não foram eficazes na inibição.

### 1.2.8 Avaliação do perfil químico através da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD)

O cromatógrafo utilizado foi o Thermoscientific Ultimate 3000, Software version 7.2.8 (Figura 1.8), composto por injetor automático e detector de arranjo de diodo (DAD). Os solventes utilizados para as análises de CLAE-DAD foram metanol (SigmaAldrich®) grau HPLC, ácido acético (Vetec®) reagente de grau analítico, e água purificada em sistema Milli-Q® a 18,2 MΩcm. A separação cromatográfica foi realizada em coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5μm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck. O fluxo de vazão foi 1mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção 10 μL, e foram utilizados metanol e ácido acético 1% como eluentes. Para detecção por DAD utilizou-se faixa de aquisição em 210 à 400 nm. Método de separação consistiu em um gradiente de eluição, iniciando com 3% de fase B (metanol) e aumentando gradualmente até 80% de metanol ao longo de 40 minutos.

A tabela 1.3 apresenta os parâmetros de validação do método cromatográfico utilizado para quantificação e validação dos compostos fenólicos. Primeiramente, padrões de ácidos fenólicos foram preparados em diferentes concentrações para construir curvas de calibração (Figura 1.8). A identificação foi conduzida comparando os tempos de retenção e os espectros no UV-vis de cada amostra com os padrões conhecidos de flavonoides. Para confirmar essa identificação, as amostras foram enriquecidas com os padrões de referência. Após a injeção, os tempos de retenção, os espectros e as áreas dos

picos de interesse foram reavaliados. A quantificação foi realizada correlacionando as áreas das amostras com a curva de calibração do padrão externo.



Figura 1.8 - Cromatógrafo (CLAE-DAD) utilizado em análise do perfil químico

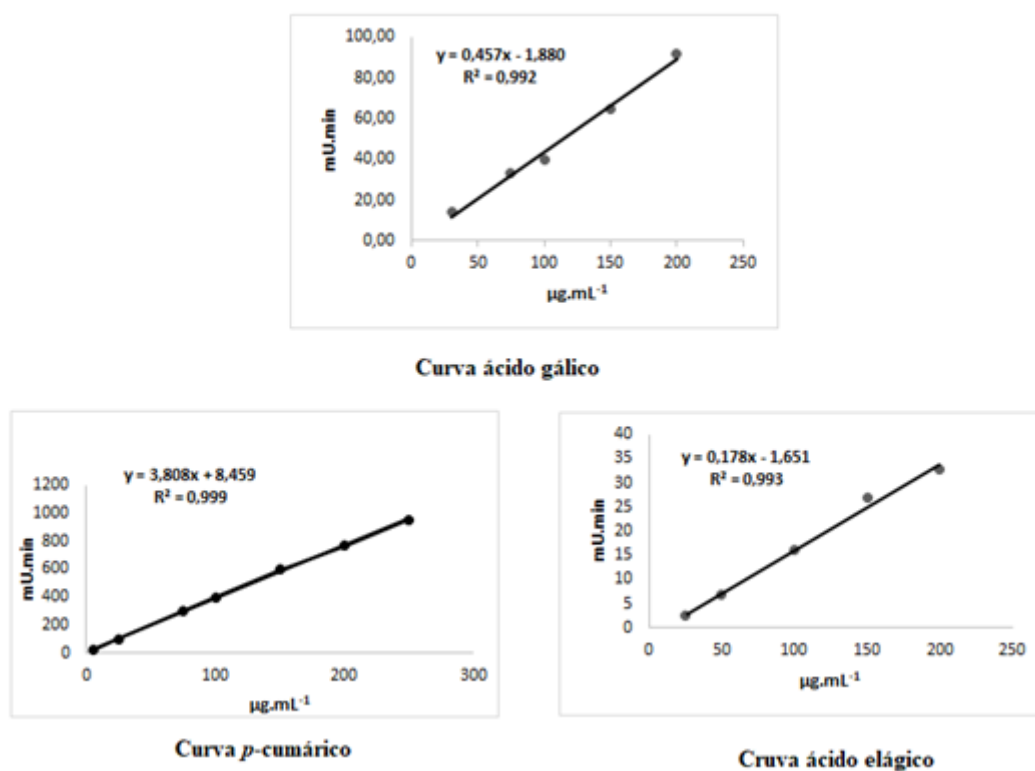


Figura 1.9 - Curvas de calibração utilizadas para quantificação dos ácidos fenólicos (ácido gálico, *p*-cumárico e ácido elágico) por CLAE-DAD

**Tabela 1.3** - Resultados da validação do método cromatográfico (ICH, 1995).

| ICH, 1995                               | Ácido <i>p</i> -cumárico | Ácido gálico         | Ácido elágico        |
|-----------------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Linearidade ( $R^2$ )                   | 0,999                    | 0,992                | 0,993                |
| Precisão $\leq 5\%$                     | 0,32                     | 0,07                 | 0,89                 |
| Exatidão (80-120%)                      | 96,1- 106                | 90,5-97,1            | 95,5-107             |
| LD ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) | 1,7                      | 2,1                  | 3,0                  |
| LQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) | 5,8                      | 7,0                  | 10,1                 |
| Robustez                                | $<5\%$                   | $<5\%$               | $<5\%$               |
| Equação                                 | $Y = 1,397x - 2,149$     | $Y = 0,457x - 1,880$ | $Y = 0,178x - 1,651$ |

### 1.2.9 Estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística fatorial no software RStudio, sendo aplicada a técnica multivariada para explorar e identificar as relações entre as variáveis. O intuito é compreender a interação entre a técnica de extração e solvente. Inicialmente, foram conduzidos testes para verificar a suposição de homogeneidade de variâncias dos resíduos em relação aos tratamentos. Para que os resíduos apresentassem a mesma variabilidade, o valor-p deveria ser superior ao nível de significância, indicando que a suposição de homocedasticidade foi atendida. Em seguida, foram realizadas as análises de interação, em que o valor-p menor que o nível de significância foi considerado para rejeitar a hipótese nula e indicar uma interação significativa. As interações do solvente foram consideradas dentro das técnicas, bem como as técnicas dentro de cada nível de solvente.

Para as variáveis em que o valor-p foi maior que o nível de significância, a hipótese nula não foi rejeitada, indicando uma interação não significativa. Portanto, o solvente e o método foram avaliados separadamente. Os dados também foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) com o intuito de identificar agrupamentos que pudessem evidenciar a similaridade nos processos extrativos

## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

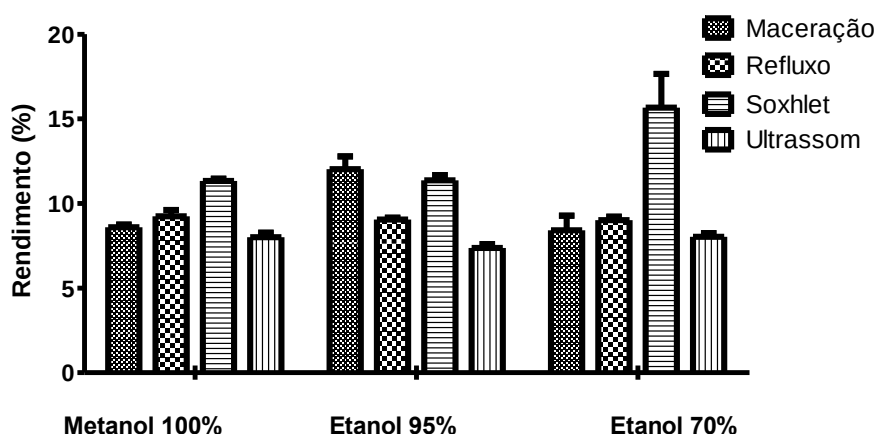
Atualmente, os estudos envolvendo produtos naturais são de grande importância, abrangendo tanto a esfera científica quanto a econômica. Cada vez mais, as indústrias farmacêuticas buscam produtos com valor terapêutico baseados em substâncias naturais. É sabido que a composição de um extrato obtido a partir desses produtos é influenciada por diversos fatores, como período da coleta, local e o ambiente, maturidade da planta, fatores genéticos, fisiológicos, e não menos importante, o método de extração dos

compostos bioativos (ATANASOV, 2021; CALIXTO, 2019; HARVEY et al., 2015). Quando se trata de produtos produzidos pelas abelhas, como própolis e geoprópolis, é importante ressaltar que a composição desses produtos depende da espécie de abelha, do seu porte, capacidade de voo e da fitogeografia que cerca as colmeias. Esses fatores podem influenciar significativamente na composição química dos produtos obtidos (WOŻNIAK, 2022).

Ao realizar pesquisa em artigos científicos sobre a geoprópolis, nota-se a escassez de estudos que fundamentem a seleção do método de extração para otimizar a composição química, rendimento e a atividade terapêutica. Nesse contexto, o presente estudo resalta a importância da investigação dos métodos de extração para a geoprópolis de *M. scutellaris*.

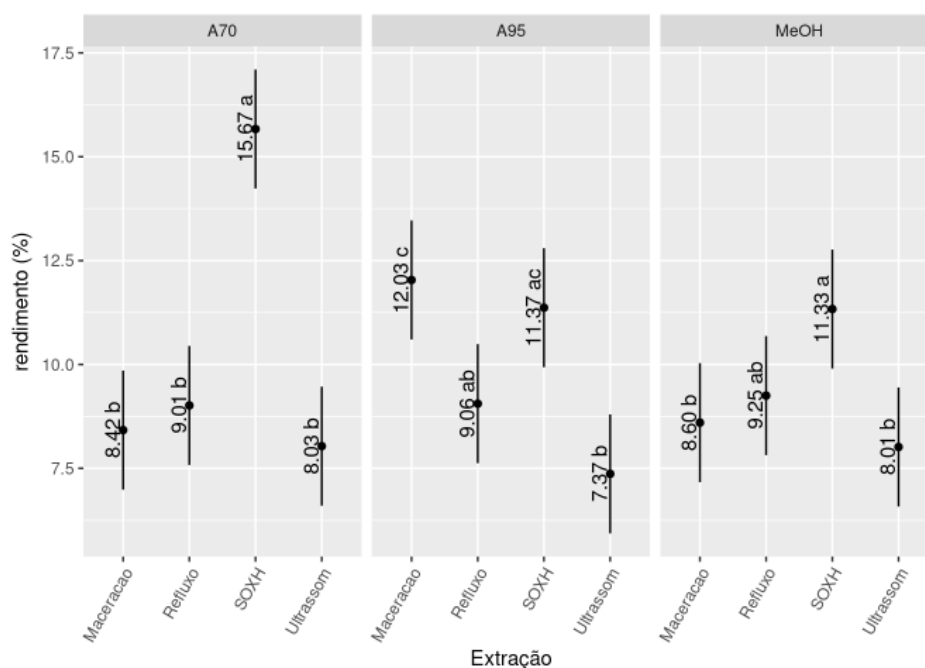
### 1.3.1 Efeito dos Parâmetros de Extração (Método e Solvente) sobre a variável Rendimento

Avaliar o rendimento dos métodos permite determinar quão eficaz é cada técnica na extração dos compostos desejados. Isso é fundamental para garantir que a maior quantidade possível de compostos seja recuperada da amostra matriz. Além de otimizar o processo de extração, ajustando variáveis como tempo, temperatura e solvente para maximizar a eficiência da extração. Permite a utilização mais eficiente de recursos, como solventes e energia. Isso é especialmente importante em larga escala, onde pequenas diferenças no rendimento podem ter um grande impacto nos custos de produção (FAÇA et al., 2013; DHANANI et al., 2022). A figura 1.10 apresenta os teores de rendimentos obtidos.



**Figura 1.10** - Rendimento das Extrações em Diferentes Métodos e Solventes da geoprópolis produzida por *M. scutellaris*.

A estatística mostra que o valor-*p* foi inferior ao nível de significância, resultando na rejeição da hipótese nula e indicando uma interação significativa entre a combinação de solvente e técnica para a variável rendimento. Ao avaliar a extração dentro de cada nível de solvente, observou-se que, para o solvente etanol 70%, o método de extração Soxhlet obteve o maior rendimento, enquanto os métodos de refluxo, maceração e ultrassom não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, ao aumentar o teor alcoólico para Etanol 95%, o padrão de rendimento variou, com o método de ultrassom sendo menos eficiente. Por outro lado, o metanol 100% demonstrou um comportamento distinto em relação à eficiência de extração: os métodos de maceração, refluxo e ultrassom não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, enquanto os métodos Soxhlet e refluxo foram os mais eficientes em termos de rendimento. Notavelmente, os métodos que se destacaram compartilham o uso da temperatura, sugerindo que a associação do metanol com técnicas que envolvem o controle da temperatura no processo de extração pode potencializar a obtenção dos compostos. Sugere-se que esse fenômeno esteja associado à teoria que o aumento da temperatura auxilia na solubilização dos compostos presentes na geoprópolis analisada (Figura 1.11).



**Figura 1.11** - Influência da interação da em cada nível de solvente sobre o rendimento

Os resultados mostram variações significativas na eficiência da extração dependendo do tipo de solvente utilizado. O metanol 100% mostrou resultados diferentes

em comparação com o etanol 70% e 95%. Isso pode ser atribuído às propriedades específicas de cada solvente, como polaridade, capacidade de solvatação e afinidade com os compostos alvo.

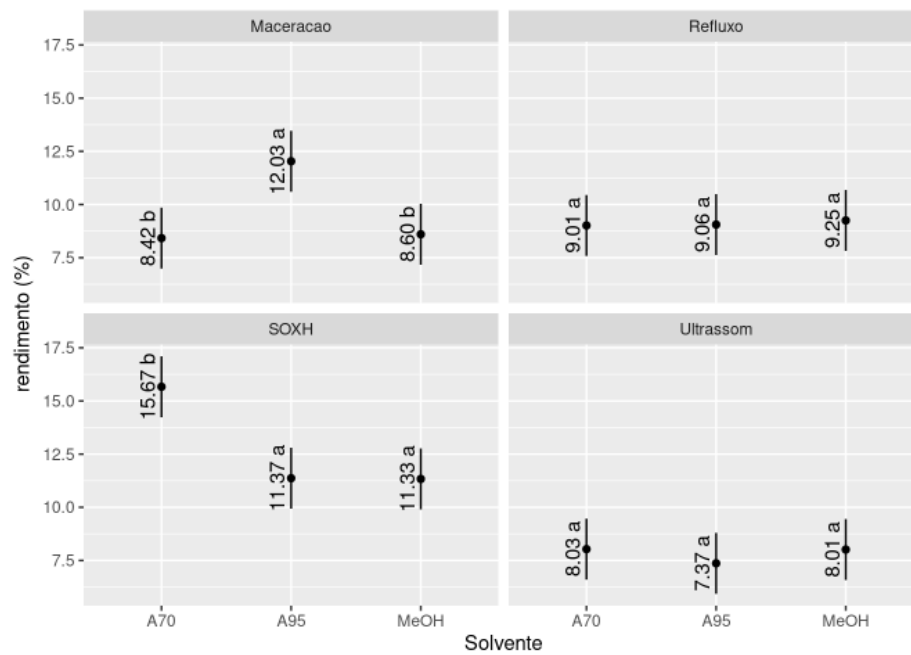
Ambos o metanol e etanol são solventes polares devido à presença do grupo hidroxila (-OH) em suas moléculas. No entanto, o metanol é considerado um solvente mais polar do que o etanol devido à diferença nas características de polaridade de seus grupos alquila (metil e etil). O metanol tem uma maior capacidade de solvatar compostos polares e íons do que o etanol, devido à sua maior polaridade e menor tamanho da cadeia carbônica. Isso pode afetar a solubilidade e a eficiência da extração de certos compostos (GALVÃO *et al.*, 2014).

A comparação entre diferentes técnicas de extração (Soxhlet, refluxo, maceração e ultrassom) fornece dados sobre a eficácia relativa de cada técnica. Embora o método de ultrassom seja amplamente utilizado devido à sua eficiência e rapidez, os resultados indicam que pode não ser tão eficaz quanto outros métodos em determinadas condições, como a utilização de solventes específicos. Compreender quais métodos e condições de extração são mais eficientes pode ter implicações importantes para aplicações práticas, como o desenvolvimento de produtos à base de geoprópolis para uso terapêutico. A escolha do método de extração adequado pode influenciar a qualidade e o rendimento dos produtos.

Ao analisar os resultados dentro de cada nível de extração, nota-se que, no caso da maceração, o solvente mais eficiente em relação ao rendimento é o etanol 95%, enquanto os solventes etanol 70% e metanol 100% não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Quanto aos métodos de refluxo e ultrassom, não foram observadas diferenças estatísticas, e o método Soxhlet demonstrou extração mais eficiente quando o solvente utilizado foi o etanol 70% (Figura 1.12).

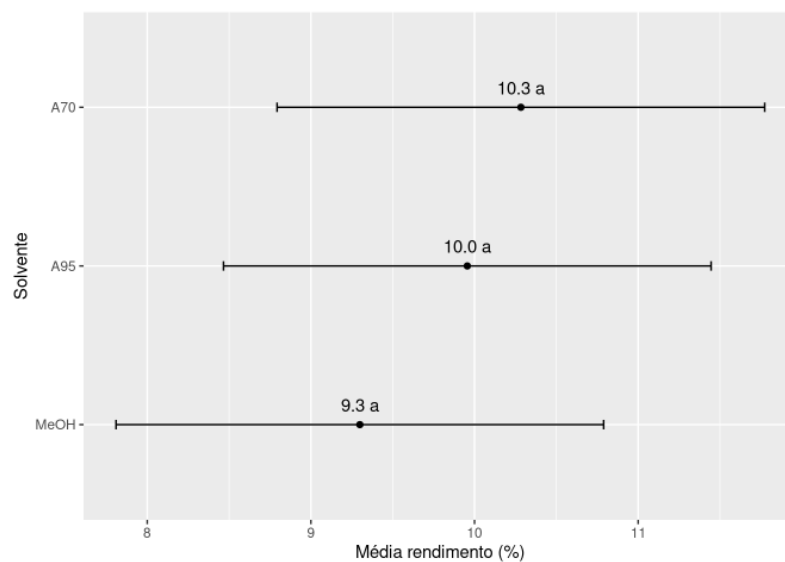
Com base nos resultados obtidos para o rendimento, a melhor escolha para extração da amostra estudada seria o método de Soxhlet utilizando etanol 70%. Isso porque esse método apresentou o maior rendimento de extração em comparação com os outros métodos testados, indicando sua eficiência para essa finalidade específica. Além disso, o etanol 70% foi o solvente mais eficiente para esse método. Portanto, considerando os resultados experimentais do rendimento, o Soxhlet com etanol 70% seria a opção mais adequada para extrair os compostos da amostra em questão.





**Figura 1.12** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre o rendimento

A Figura 1.13 evidencia a relevância de avaliar a interação entre a técnica de extração e o solvente. Na análise inicial, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os solventes utilizados.



**Figura 1.13** - Médias dos efeitos simples: análise relevante quando a interação não é significativa

Ao aprofundar a análise para avaliar a interação, tornou-se evidente a importância do rigor estatístico nos estudos. Embora a figura não revele disparidades notáveis entre os solventes, a análise detalhada da extração dentro dos diferentes níveis de solventes indica que o etanol 70% demonstrou maior eficiência no processo de extração. Entretanto, outros fatores devem ser considerados e serão abordados nos próximos tópicos.

Cunha e colaboradores (2009) conduziram estudo sobre a extração de geoprópolis de *Melipona fasciculata*, empregando métodos de maceração e Soxhlet com diferentes concentrações de etanol e água a 100%. Eles observaram que o maior rendimento foi obtido com o uso de etanol a 100%, enquanto para o método de Soxhlet, tanto o etanol a 100% quanto o etanol a 70% foram eficazes, respectivamente. O presente trabalho também demonstrou que o aumento do teor alcoólico resultou em maior eficiência de extração, com um aumento de 3,98% na eficiência em comparação com o etanol a 70%. No entanto, para o método de Soxhlet, o resultado foi inverso, etanol a 70% apresentou o maior rendimento, com 4,30% a mais de compostos em comparação com o etanol a 95%, o que difere do resultado encontrado por Cunha e colaboradores (2009).

Zin e colaboradores (2018) descreveram maiores rendimentos na extração da própolis por Soxhlet em comparação com os métodos de maceração e ultrassom, resultados que corroboram com os dados encontrados no presente estudo. Além disso, os autores afirmaram que o uso de álcool etílico a 95% promoveu um aumento significativo no rendimento da extração.

Jaramillo e colaboradores (2022) conduziram uma investigação sobre a influência da extração em geoprópolis coletadas em localidades distintas. Os resultados obtidos revelaram que o método de ultrassom apresentou achados promissores quando comparado à maceração, que é um método convencional. Eles observaram um rendimento superior para as três amostras analisadas. Esses resultados diferem do presente trabalho, onde o ultrassom se mostrou o método menos eficiente para a geoprópolis de *M. scutellaris*.

Alguns resultados obtidos neste estudo diferiram dos observados na literatura. Esse aspecto pode estar associado à abordagem estatística adotada, uma vez que o presente estudo não se limitou a avaliar apenas o método e solvente de extração em si, mas também considerou a interação entre a técnica e o solvente utilizado.

### 1.3.2 Efeito dos Parâmetros de Extração (Método e Solvente) sobre as Variáveis Teor de Fenólicos e Flavonoides

A tabela 1.4 apresenta os efeitos da extração na composição química da geoprópolis, em relação aos fenólicos e flavonoides. Essas classes de compostos têm sido extensivamente investigadas devido ao seu potencial terapêutico. Na literatura, já são descritos seus efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, cicatrizantes e antioxidantes. O objetivo deste estudo é ressaltar o potencial econômico da geoprópolis, destacando a importância de avaliar a influência dos métodos de extração na composição fenólica. De acordo com a pesquisa de Franchin *et al.* (2012), a presença de fenólicos em extratos de geoprópolis é associada à ação antinociceptiva. Os resultados do estudo mostraram que as frações mais ativas apresentavam maior concentração de fenólicos

Para o teor de fenólicos o valor-p foi maior que o nível de significância, a hipótese nula não foi rejeitada e a interação não foi significativa. Por tanto, não foi avaliada a interação entre solvente e técnica, os parâmetros foram comparados separadamente em seus respectivos grupos (método e solvente).

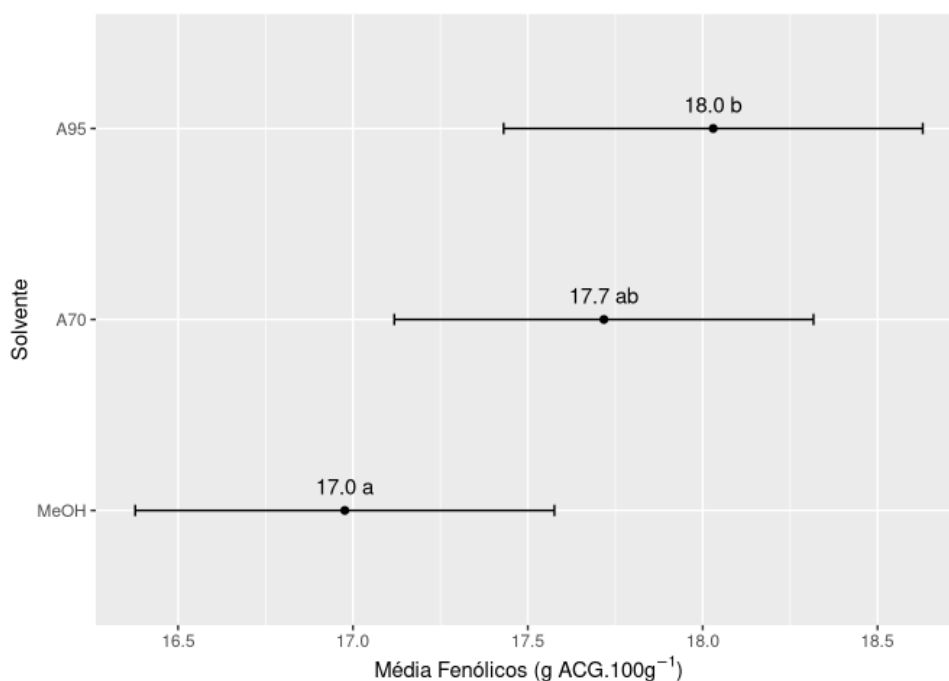
**Tabela 1.4** - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em extratos de geoprópolis produzida por *M. scutellaris*.

| Extração<br>(método: solvente) | COMPOSIÇÃO QUÍMICA       |                        |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------|
|                                | Fenólico<br>(mgEAG.100g) | Flavonoide<br>(mgQE.g) |
| <b>Ultrassom:</b> Etanol 95%   | 16,69 ± 0,55             | 2,03 ± 0,04            |
| <b>Ultrassom:</b> Etanol 70%   | 17,25 ± 0,06             | 2,01 ± 0,02            |
| <b>Ultrassom:</b> Metanol 100% | 17,06 ± 0,70             | 1,63 ± 0,01            |
| <b>Maceração:</b> Etanol 95%   | 17,91 ± 0,06             | 1,77 ± 0,03            |
| <b>Maceração:</b> Etanol 70%   | 16,8 ± 1,15              | 1,98 ± 0,09            |
| <b>Maceração:</b> Metanol 100% | 16,69 ± 1,31             | 1,92 ± 0,06            |
| <b>Refluxo:</b> Etanol 95%     | 19,06 ± 0,30             | 1,94 ± 0,02            |
| <b>Refluxo:</b> Etanol 70%     | 19,16 ± 0,11             | 2,04 ± 0,04            |
| <b>Refluxo:</b> Metanol 100%   | 17,99 ± 1,03             | 1,94 ± 0,09            |

|                              |              |             |
|------------------------------|--------------|-------------|
| <b>Soxhlet:</b> Etanol 95%   | 18,3 ± 1,03  | 2,14 ± 0,34 |
| <b>Soxhlet:</b> Etanol 70%   | 17,64 ± 1,11 | 1,61 ± 0,26 |
| <b>Soxhlet:</b> Metanol 100% | 16,57 ± 0,87 | 1,71 ± 0,03 |

A partir da figura 1.14, que apresenta os resultados da influência do solvente no teor de fenólicos totais do extrato de geoprópolis, pôde-se observar que não houve diferença significativa entre os extratos obtidos com etanol 95% e 70%. No entanto, quando comparado com o extrato de metanol, o etanol 95% conseguiu extrair maior quantidade de compostos fenólicos.

A seletividade do solvente se refere à sua capacidade de extrair compostos específicos da amostra. Sugere-se que o etanol apresentou seletividade para extração dos fenólicos presentes na geoprópolis, o que leva a maior eficiência de extração. Além disso, a matriz da geoprópolis, que é a estrutura na qual os compostos estão inseridos, pode interagir de maneiras diferentes com o etanol e o metanol. Essas interações podem afetar a liberação e a solubilização dos compostos fenólicos durante a extração.



**Figura 1.14** - Médias das contribuições individuais dos solventes para o teor total de fenólicos.

Oroian e colaboradores (2020) mostraram que o aumento da concentração etanólica de 40% para 80% possibilitou a otimização na extração dos fenólicos totais em 42,87%. Através de uma pesquisa conduzida por Masak e colaboradores (2018), focada em própolis coletada em distintas regiões, foi constatado que, ao empregar o método de refluxo, o aumento na concentração de álcool promoveu maior extração de compostos fenólicos.

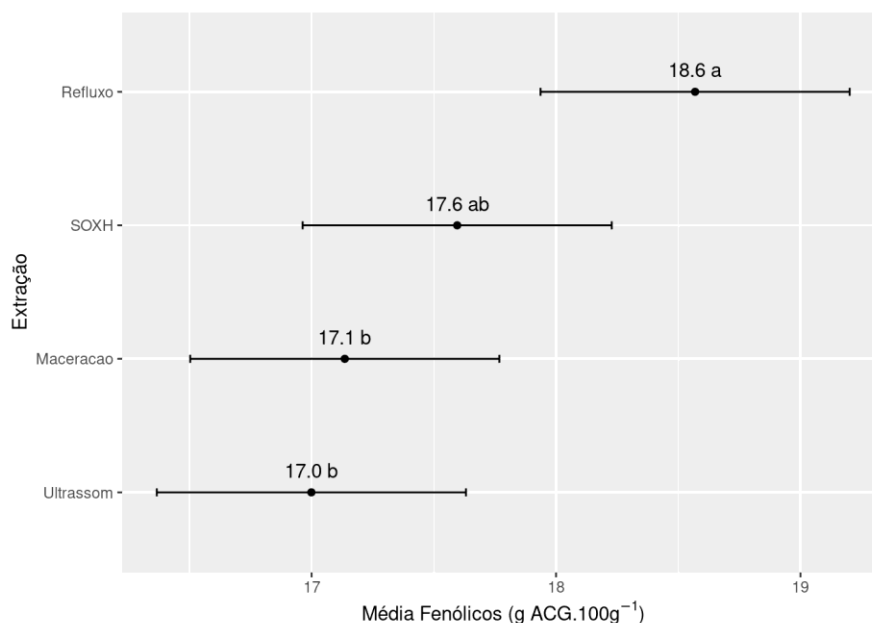
Dentre os solventes orgânicos comumente utilizados na extração de compostos fenólicos da própolis, podemos mencionar o etanol, mistura de etanol/água e metanol (SUN *et al.*, 2015; NARINAME *et al.*, 2017). De acordo com os resultados obtidos por Miguel e colaboradores (2014), o solvente utilizado para a extração tem um impacto significativo nos componentes fenólicos extraídos, os fenóis presentes na própolis da *Apis mellifera* L coletada no sul de Portugal foram eficientemente extraídos com metanol do que com água. É importante destacar que, no estudo atual, a água pura não foi empregada para a extração, uma vez que não apresentou boa capacidade de solubilização para a amostra de geoprópolis analisada. Sabe-se que a solubilização é um processo que pode ser definido pela quantidade que o soluto dissolve em uma determinada quantidade de solvente, em equilíbrio, sendo, portanto, dependente da interação entre o soluto e o solvente (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013).

Para o resultado da estatística apresentado pela figura 1.15, observa-se que não há diferença estatística entre os métodos de extração por refluxo e soxhlet em relação ao teor de fenólicos. Isso implica que, para a variável fenólicos, ambos os métodos demonstraram eficácia equivalente. Por outro lado, foram encontradas diferenças significativas entre refluxo, maceração e ultrassom. Para a variável teor de fenólicos, o método de extração por refluxo apresenta-se como a melhor opção.

É relevante ressaltar que pesquisas indicam algumas limitações associadas ao método de refluxo, incluindo a possível degradação de compostos devido à elevação da temperatura (SHI *et al.*, 2022). Entretanto, os resultados obtidos demonstram que, para a amostra de geoprópolis, a temperatura contribuiu positivamente para a extração dos compostos fenólicos.

Sugere-se que a superioridade do método de refluxo em relação aos métodos de maceração e ultrassom possa estar correlacionada com a utilização da temperatura na extração. O refluxo é um método de extração que opera em um sistema fechado, onde o solvente é aquecido, permitindo sua ebulição e circulação repetida através da amostra. Esse processo de aquecimento e refluxo contribui para aprimorar a eficácia da extração,

uma vez que a elevada temperatura facilita a solubilização dos compostos desejados presentes na amostra.



**Figura 1.15** - Médias das contribuições individuais das técnicas de extração para o teor total de fenólicos.

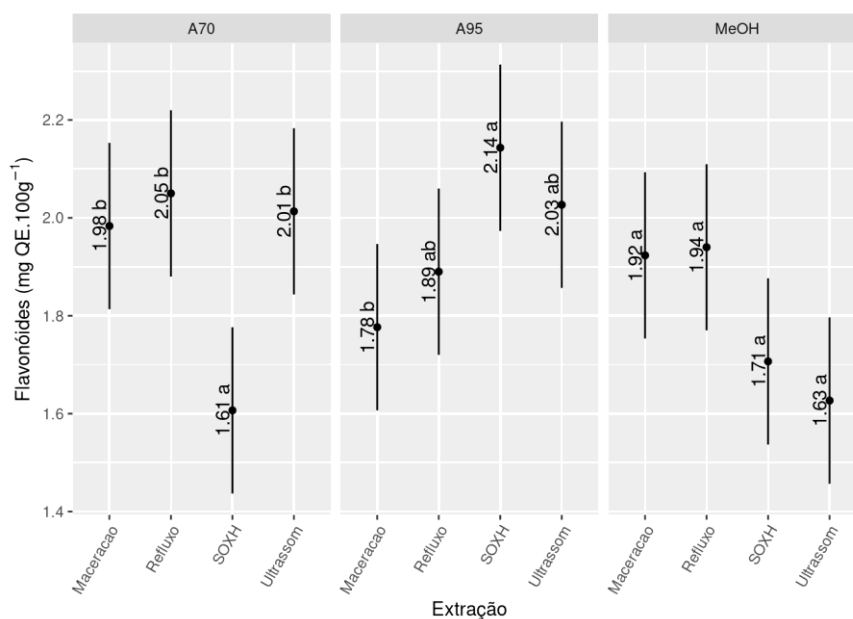
As extrações por maceração e ultrassom foram realizadas em 25°C e 40 °C, respectivamente. Esses métodos podem ser menos eficazes em comparação ao refluxo, especialmente quando se trata de compostos que necessitam de temperaturas elevadas para melhor extração. Portanto, a utilização da temperatura no método de refluxo pode ser um fator relevante que contribui para sua maior eficácia em relação aos outros métodos analisados. Contudo, é importante ressaltar que podem existir outros fatores não mencionados que também podem influenciar nos resultados e não foram alvo de investigação da pesquisa.

Sendo assim, sugere-se mais estudos para entender melhor as razões das diferenças observadas entre os métodos de extração. A ciência é um processo contínuo, e a busca pela melhor técnica de extração requer investigações adicionais que analise todos os fatores que influenciam no sistema de extração.

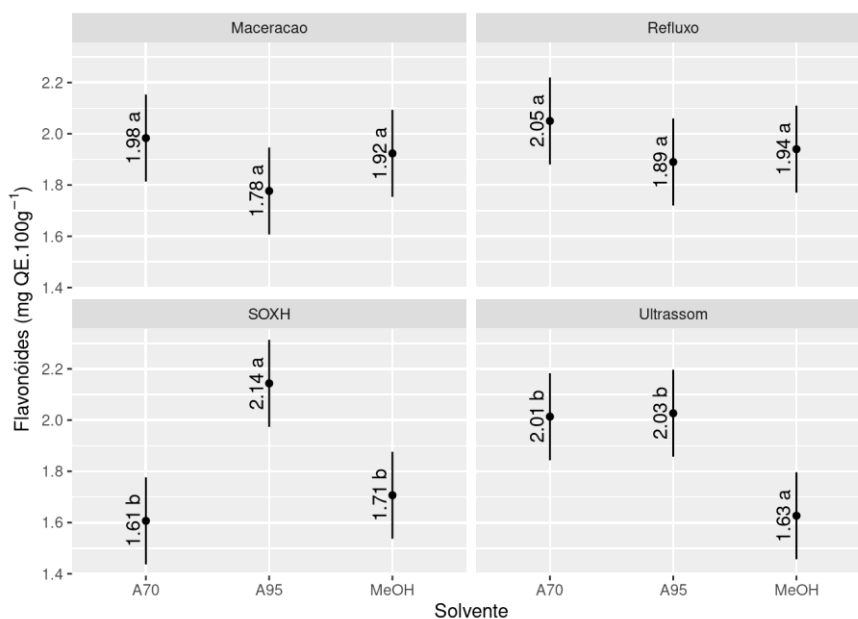
Para a variável flavonoides, houve interação significativa entre o método de extração e o solvente utilizado. A figura 1.16 mostra que a combinação entre etanol a 70% e Soxhlet resultou em menor extração de flavonoides, enquanto não foi observada diferença estatística significativa entre os demais métodos avaliados. Sendo assim, para

o etanol a 70%, o método pode ser escolhido pelo custo-benefício. Associando os resultados encontrados para fenólicos, o método de escolha seria o refluxo. Para o etanol a 95%, o método de Soxhlet foi mais eficiente, resultando em maior teor de flavonoides, enquanto o metanol não apresentou diferença significativa. Portanto, sugere-se que a escolha seja feita levando em consideração as vantagens e desvantagens dos solventes e da técnica. Ao avaliar separadamente o solvente e o método, não foi observada diferença significativa. No entanto, ao combiná-los, foram obtidos resultados promissores que contribuem para o avanço do conhecimento sobre a geoprópolis.

Ao avaliar o solvente em cada nível de extração, observa-se que a combinação do soxhlet com etanol 70% e metanol 100% resultou em baixo teor de flavonoides (Figura 1.17). Por outro lado, a maceração com etanol 95% permitiu a extração de aproximadamente 25% e 20% a mais de flavonoides em comparação com o etanol 70% e metanol 100%, respectivamente. O ultrassom associado ao metanol foi o pior sistema para extração de flavonoide.



**Figura 1.16** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre o teor de flavonoides totais



**Figura 1.17** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre o teor de flavonoides totais

O estudo conduzido por Hochheim e colaboradores (2019) sobre a geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* revelou que o metanol foi capaz de extrair maiores quantidades de flavonoides totais em comparação com o etanol a 70% e água. No entanto, no presente trabalho, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os solventes analisados nos métodos de maceração, refluxo e soxhlet. Para o método de ultrassom, o metanol foi identificado como o menos eficaz na extração de flavonoides. Essas descobertas ressaltam a importância de considerar não apenas o tipo de solvente, mas também o método de extração utilizado, o que pode influenciar significativamente os resultados da pesquisa.

### 1.3.3 Efeito dos Parâmetros de Extração (Método e Solvente) na Atividade Antioxidante

Nos últimos anos, o potencial antioxidante dos produtos naturais tem sido amplamente comprovado e estudado. As pesquisas científicas têm revelado o notável potencial antioxidante dos produtos produzidos pelas abelhas, como a própolis e a geoprópolis. É importante destacar que os parâmetros de extração desempenham um papel crucial na composição e, consequentemente, em sua capacidade de estabilizar os radicais livres. Portanto, torna-se essencial definir os melhores parâmetros de extração a fim de otimizar o potencial antioxidante desses compostos. Os resultados médios para o



potencial antioxidante dos extratos de geoprópolis frente os radicais DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>+</sup> estão disponíveis na tabela 1.5.

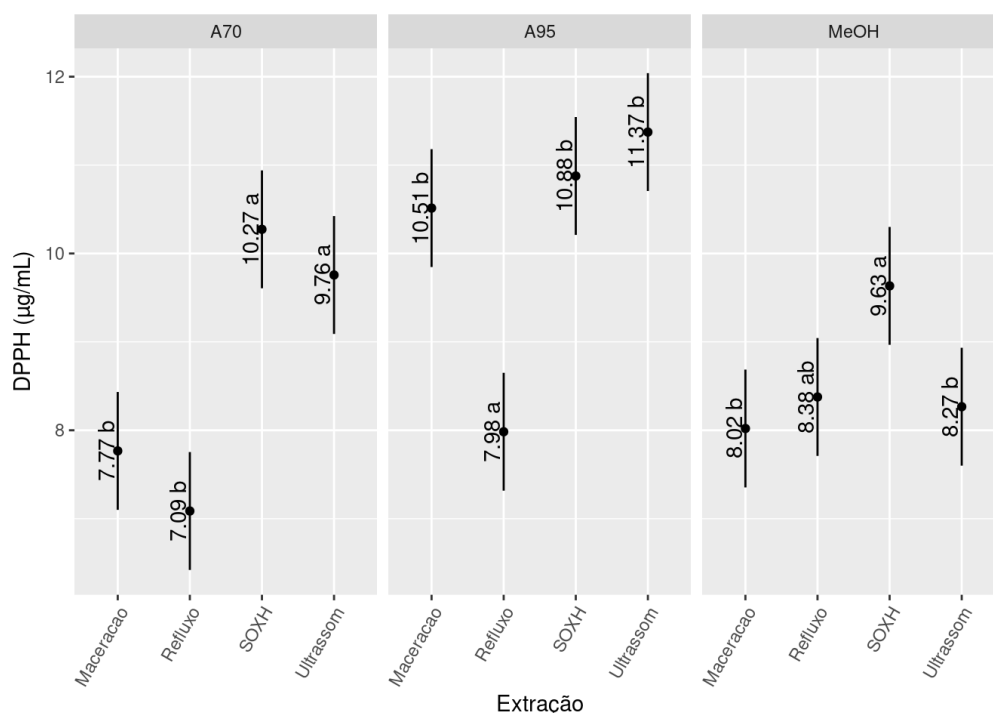
**Tabela 1.5** - Potencial do extrato de geoprópolis produzida por *M. scutellaris* em estabilizar os radicais DPPH<sup>·</sup> e ABTS<sup>+</sup>

| Extração<br>(método: solvente)          | Potencial antioxidante                     |                                         |                     |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|
|                                         | CE <sub>50</sub><br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) | AAI                                     | µM trolox/g extrato |
| <b>Ultrassom:</b> Etanol 95%            | 10,88 ± 0,41                               | 3,96 ± 0,15                             | 6,96 ± 0,50         |
| <b>Ultrassom:</b> Etanol 70%            | 9,76 ± 0,37                                | 4,62 ± 0,18                             | 6,34 ± 0,79         |
| <b>Ultrassom:</b> Metanol 100%          | 8,27 ± 0,30                                | 5,45 ± 0,20                             | 6,38 ± 0,47         |
| <b>Maceração:</b> Etanol 95%            | 10,51 ± 0,34                               | 4,28 ± 0,14                             | 6,94 ± 0,84         |
| <b>Maceração:</b> Etanol 70%            | 7,82 ± 0,72                                | 5,72 ± 0,52                             | 5,31 ± 0,41         |
| <b>Maceração:</b> Metanol 100%          | 8,02 ± 0,38                                | 5,62 ± 0,27                             | 7,02 ± 0,66         |
| <b>Refluxo:</b> Etanol 95%              | 8,38 ± 0,19                                | 6,36 ± 0,20                             | 5,1 ± 0,77          |
| <b>Refluxo:</b> Etanol 70%              | 7,09 ± 0,32                                | 6,36 ± 0,14                             | 5,66 ± 0,70         |
| <b>Refluxo:</b> Metanol 100%            | 7,98 ± 0,20                                | 5,37 ± 0,13                             | 7,43 ± 1,33         |
| <b>Soxhlet:</b> Etanol 95%              | 10,88 ± 0,28                               | 4,14 ± 0,11                             | 3,28 ± 0,19         |
| <b>Soxhlet:</b> Etanol 70%              | 10,27 ± 0,82                               | 5,4 ± 0,34                              | 2,71 ± 0,05         |
| <b>Soxhlet:</b> Metanol 100%            | 9,63 ± 1,29                                | 5,1 ± 0,72                              | 7,25 ± 0,52         |
| <b>Padrão DPPH</b>                      |                                            |                                         |                     |
| <b>Quercetina</b>                       |                                            | <b>Ácido gálico</b>                     |                     |
| CE <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> ) | AAI                                        | CE <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> ) | AAI                 |
| 3,71 ± 0,26                             | 12,12 ± 0,82                               | 1,41 ± 0,04                             | 30,03 ± 0,92        |

CE<sub>50</sub>: concentração mínima para estabilizar 50% do radical DPPH<sup>·</sup> AAI: índice da atividade antioxidante

Através da análise multivariada utilizando o teste fatorial, foi observada uma interação significativa no potencial antioxidante dos extratos avaliados para os dois tipos de radicais estudados. Ao analisar os valores da concentração inibitória mínima obtidos pelo método DPPH, conforme ilustrado na Figura 1.18, pode-se notar que o tipo de solvente e método de extração utilizado afeta o potencial antioxidante. A interação foi

avaliada a dois níveis, o método dentro de cada nível de solvente e solvente dentro de cada nível do método.



**Figura 1.18** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre a estabilização do radical DPPH.

A utilização combinada do refluxo com etanol 70% como solvente extrator apresentou-se como uma abordagem vantajosa para potencializar a atividade antioxidante, resultando em uma redução de 50% dos radicais livres em baixa concentração do extrato. Além disso, observou-se que, no caso do etanol 70%, não há uma diferença significativa entre as técnicas de extração por Soxhlet e ultrassom, assim como entre maceração e refluxo (Figura 1.19).

A perspectiva de otimização que considera fatores como economia de tempo, custos e facilidade de implementação aponta para o método de ultrassom como a escolha mais indicada para o solvente etanol 70% em relação aos demais técnicas. Tal método demanda um tempo de extração menor, utiliza menor quantidade de solvente e não requer a aplicação de calor na amostra, quando comparado ao Soxhlet.

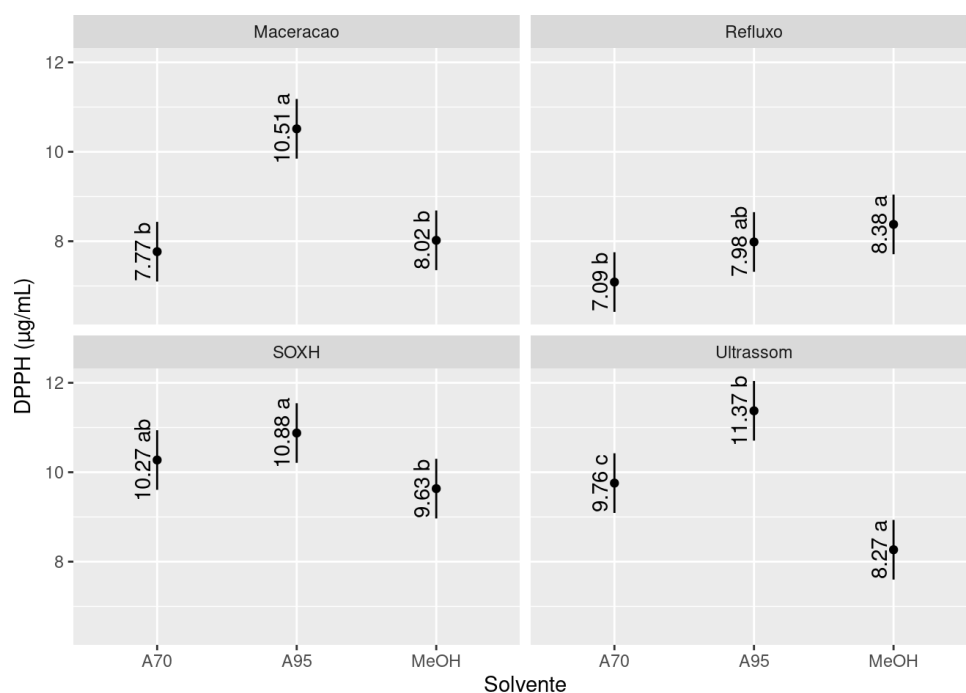
No entanto, nos casos das abordagens de maceração e refluxo, a análise dos parâmetros de tempo, custo e sustentabilidade se faz necessária. Enquanto a maceração não requer o consumo de energia, o refluxo otimiza o processo de extração. Quando se considera o aspecto econômico em relação aos meliponários, o método de maceração

emerge como a alternativa mais favorável, uma vez que dispensa a necessidade de equipamentos e o gasto de energia associado à obtenção de extratos com potencial antioxidante promissor.

Ao examinar a interação entre o etanol 95% e os métodos de extração, fica evidente que o refluxo exibiu uma atividade antioxidante superior, diferindo estatisticamente dos outros métodos empregados. Em contrapartida, não se observaram discrepâncias significativas entre os processos de maceração, ultrassom e Soxhlet. No que tange à relação entre o solvente metanol e os métodos de extração, nota-se que não houve variações significativas quando o metanol foi empregado nos procedimentos de maceração, refluxo e ultrassom. Adicionalmente, percebe-se que o método Soxhlet apresentou a  $CE_{50}$  mais elevada, indicando menor atividade (Figura 1.19).

Analisando a performance do solvente dentro de cada nível de extração no contexto da maceração, verifica-se que não há diferenças estatísticas entre o etanol 70% e o MeOH 100%, os quais exibiram um potencial antioxidante mais elevado. Dado que não se observou distinção entre esses dois solventes, sugere-se que a escolha mais indicada recaia sobre o etanol 70%, devido à sua menor toxicidade e custo mais acessível. Vale salientar que o metanol é dotado de elevada toxicidade, podendo induzir à cegueira, danos ao sistema nervoso e até mesmo óbito se ingerido, inalado ou absorvido pela pele (ASHURST; NAPPE, 2022; KRAUT, 2016)

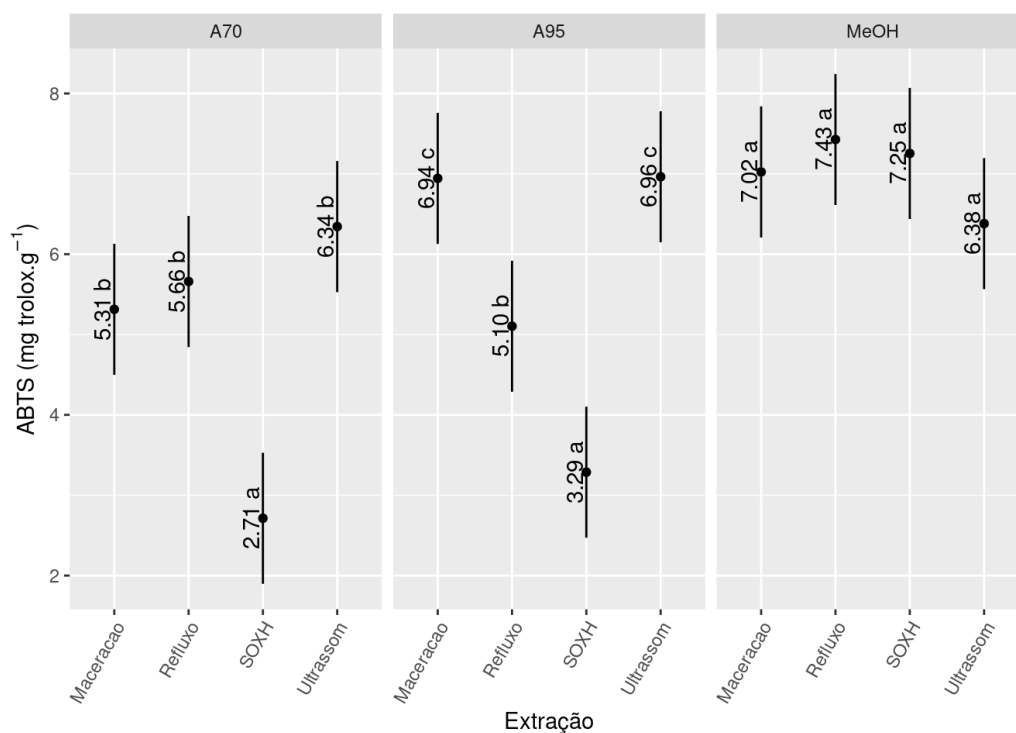
Dentro do método refluxo os solventes etanol 70% e 95% se destacaram e diferiram estatisticamente. Para o soxhlet a melhor atividade foi a extração por MeOH. Para o ultrassom houve diferença significativa para os três solventes utilizados sendo o metanol mais ativo. Percebe-se que não houve um padrão de atividade antioxidante para os extratos quando se avalia a interação solvente dentro de cada nível de método, sendo necessário avaliar os níveis de interação, vantagens, desvantagens dos métodos e solventes.



**Figura 1.19** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre a estabilização do radical DPPH

A pesquisa conduzida por Santini e colaboradores em 2021 revelaram que a diminuição da concentração alcoólica está associada ao aumento no potencial antioxidante das amostras de própolis vermelha provenientes de *A. mellifera*. Ao empregar uma solução de etanol a 50%, eles identificaram um valor de  $23,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto a concentração de etanol a 90% resultou em  $36,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados relativos ao potencial antioxidante pelo método ABTS também evidenciaram uma interação significativa entre o solvente e a técnica empregada. A figura 1.20 ilustra que o método de extração Soxhlet associado ao etanol a 70% não se apresenta como a melhor opção, uma vez que resultou no menor equivalente de trolox. A interpretação dos resultados relativos ao radical ABTS é diretamente proporcional, sendo que um valor mais alto de Equivalente Trolox (TEAC) indica uma maior capacidade antioxidante da amostra (Figura 1.20).

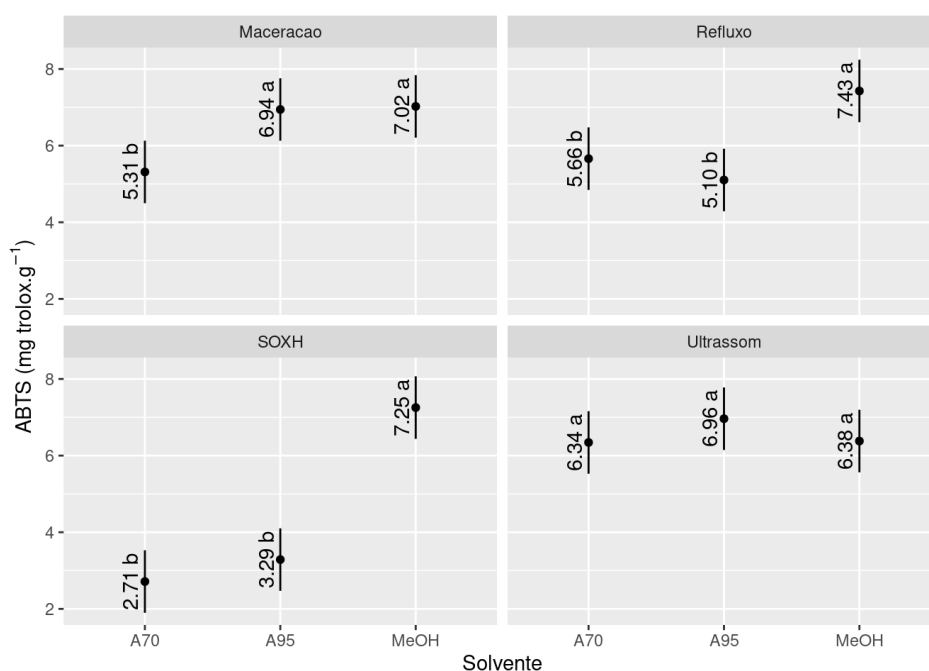


**Figura 1.20** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre a estabilização do radical ABTS+

Somente o etanol 70% apresentou um padrão de atividade similar ao radical DPPH. Neste contexto, o método Soxhlet demonstrou ser o menos eficaz. Porém, em relação ao solvente etanol 95%, os resultados demonstraram um cenário inverso, em que os métodos de ultrassom e metanol sobressaíram como os mais efetivos. No caso do MeOH, não se observou diferença estatisticamente relevante. Essa discrepância provavelmente está associada à complexidade e heterogeneidade inerente às composições dos extratos avaliados (Figura 1.21).

É pertinente ressaltar que o radical DPPH apresenta uma sensibilidade inferior à presença de prótons em comparação ao radical ABTS. Tal diferença implica que o radical DPPH reage com uma variedade mais ampla de compostos antioxidantes. Contrariamente, o radical ABTS demonstra maior suscetibilidade à neutralização por prótons, conferindo-lhe maior adequação para substâncias dotadas de propriedades antioxidantes específicas (OLIVEIRA, 2015). Os testes DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) são métodos empregados para mensurar a atividade antioxidante de substâncias. No entanto, suas distinções primordiais residem nos reagentes e reações utilizadas em suas aplicações.

Através do estudo da interação entre o solvente e os parâmetros de extração, foi observado que o metanol 100% se destacou quando associado aos métodos que envolvem o controle da temperatura durante a extração (soxhlet e refluxo). Além disso, foi notório que as variações nos níveis de álcool etílico não exerceram influência significativa na etapa de extração, uma vez que seus valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativa, e já para a técnica a frio (maceração), o etanol 70% e 95% diferiram estatisticamente.



**Figura 1.21** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre a estabilização do radical ABTS<sup>+</sup>

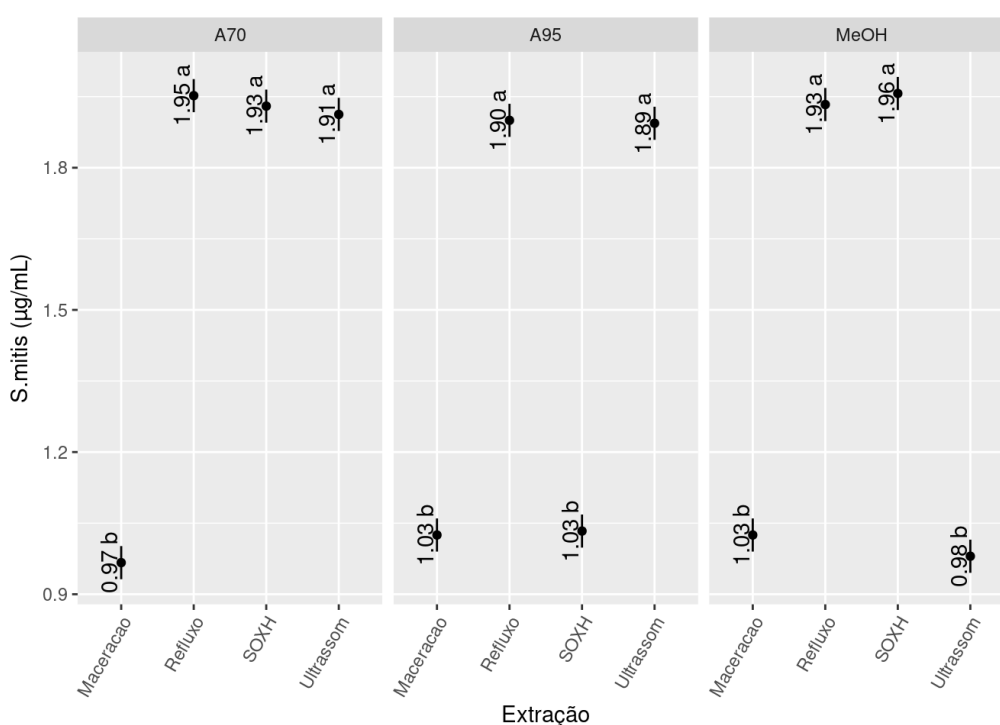
No estudo conduzido por Masek e colaboradores (2018), foi realizada avaliação das concentrações do álcool etílico para métodos de maceração, refluxo e micro-ondas. Os autores descrevem que o teor alcoólico influenciou na atividade antioxidante dos extratos.

#### 1.3.4 Efeito dos Parâmetros de Extração (Método e Solvente) na Atividade Antimicrobiana

Para avaliar a influência do método de extração no potencial antimicrobiano da geoprópolis, foram utilizados os microrganismos *S. aureus*, *S. mutans* e *S. mitis*. O valor-

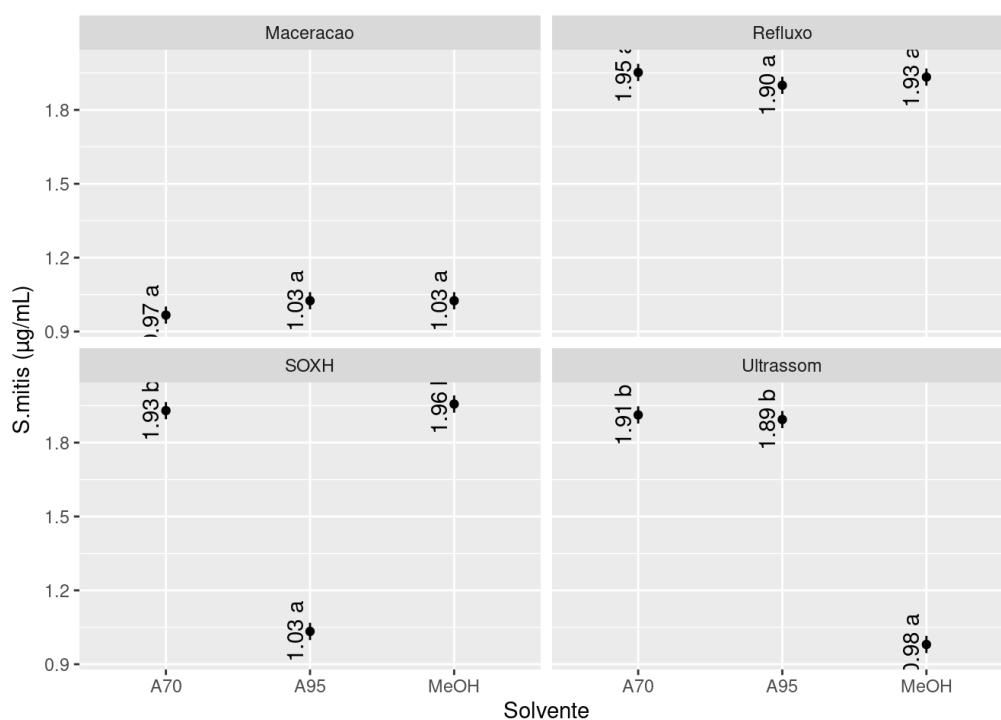
p foi inferior ao nível de significância, resultando na rejeição da hipótese nula devido à considerando a interação significativa.

No que diz respeito ao *S. mitis*, a análise da interação entre o método de extração e os diferentes solventes revelou que, para o etanol a 70%, a maceração foi mais eficaz do que os demais métodos avaliados, resultando em menor concentração inibitória mínima. Os métodos de ultrassom, refluxo e Soxhlet não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Com etanol a 95%, observou-se um padrão similar, no entanto, o Soxhlet mostrou eficácia comparável à maceração. Por fim, para o metanol 100%, a maceração continuou sendo eficaz na inibição do *S. mitis*, juntamente com o método de ultrassom (Figura 1.22).



**Figura 1.22** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre potencial inibitório frente *S. mitis*

Para a interação entre os solventes dentro dos métodos para maceração e refluxo, não houve diferença significativa. Ou seja, pode-se utilizar qualquer um dos sistemas de solventes estudados. Já para o soxhlet, deve-se utilizar o etanol 95%, e para o ultrassom, o metanol 100% (Figura 1.23).

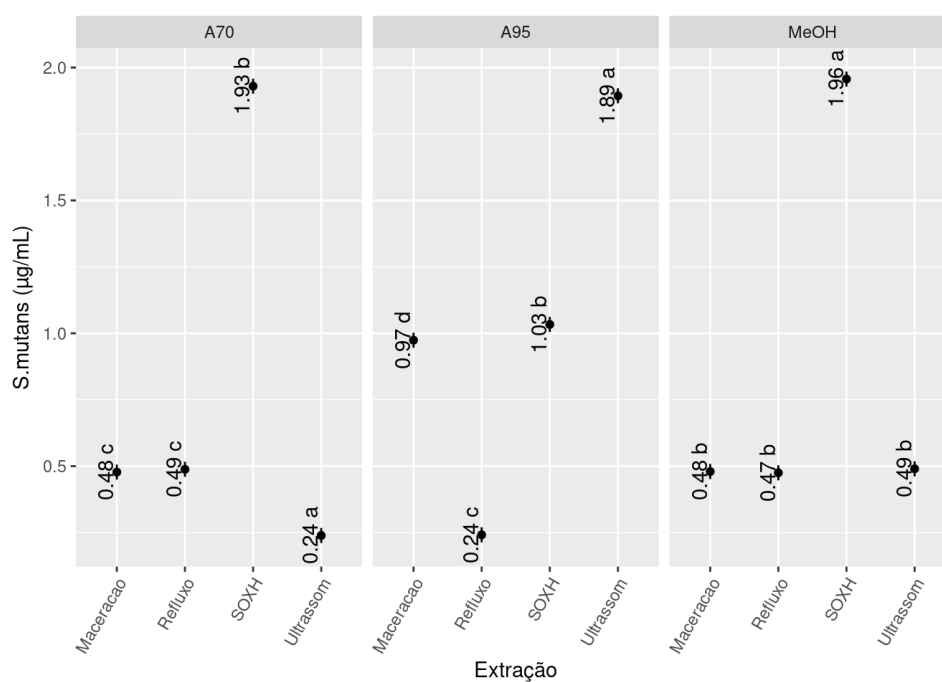


**Figura 1.23** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre potencial inibitório frente *S. mitis*

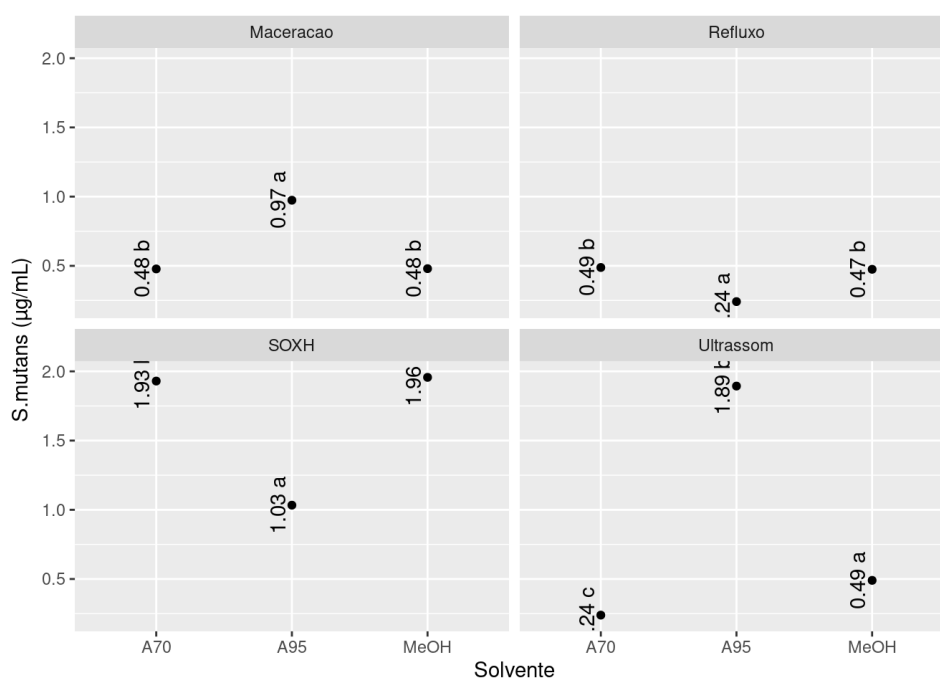
O extrato de geoprópolis mais ativo frente ao *S. mutans*, ao considerar a interação da técnica dentro do solvente etanol a 70%, revelou que o extrato obtido por ultrassom é capaz de inibir a bactéria com maior eficácia. Para o etanol a 95%, o refluxo mostrou-se mais ativo, enquanto o ultrassom foi o método menos eficaz associado a este solvente. Quanto ao metanol, observou-se que o método menos eficaz foi o Soxhlet, resultando em uma maior concentração inibitória (Figura 1.24).

Ao avaliar os solventes dentro de cada método separadamente, observou-se que os métodos que incorporam a temperatura no sistema apresentaram resultados semelhantes para o etanol a 95%, sendo menos eficazes na inibição do *S. mutans*. Por outro lado, a maceração e o ultrassom apresentaram resultados positivos quando associados ao etanol a 95%. Também é relevante destacar que o etanol a 70% demonstrou ser mais eficaz apenas no método de ultrassom (Figura 1.25).





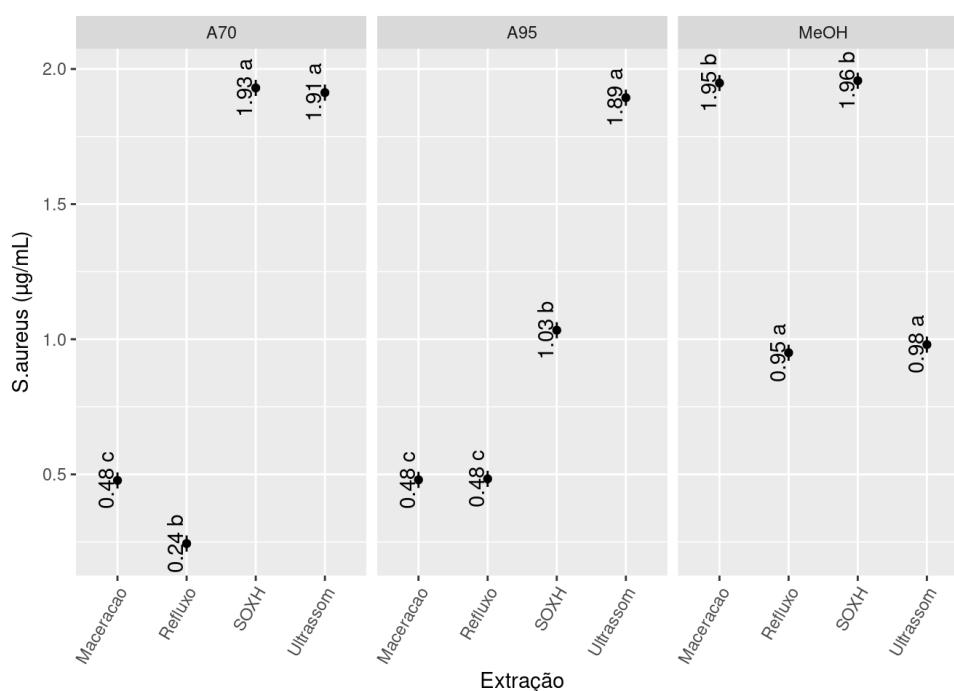
**Figura 1.24** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre potencial inibitório frente *S. mutans*



**Figura 1.25** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre potencial inibitório frente *S. mutans*

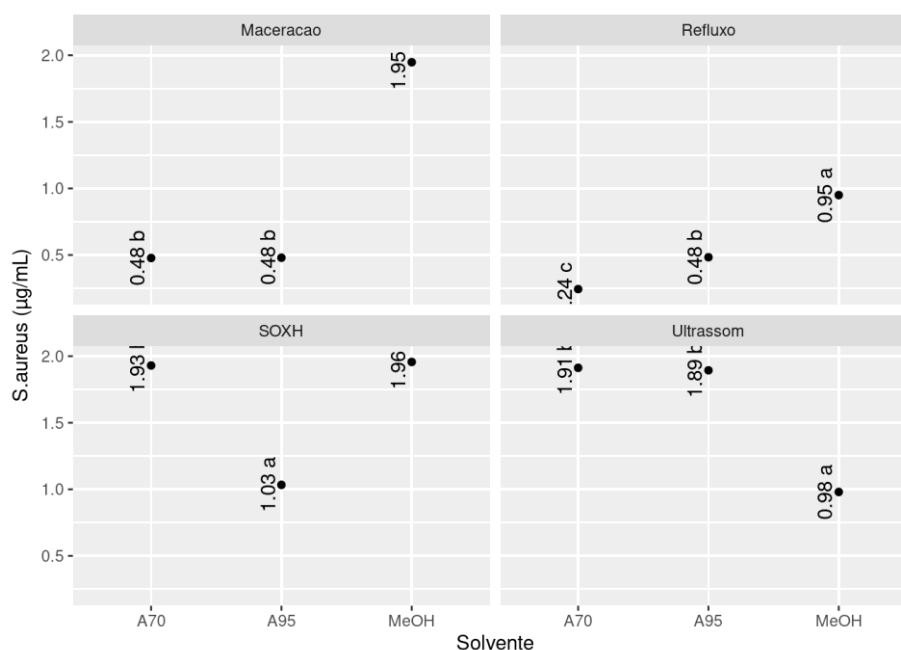
A inibição do *S. aureus* mostra-se mais eficaz quando o refluxo é empregado em conjunto com o etanol a 70%. Com o aumento na concentração etanólica, observa-se que

os métodos mais ativos são a maceração e o refluxo. Por outro lado, o metanol se destaca nos métodos de refluxo e ultrassom. Apesar dos diferentes perfis inibitórios apresentados, o refluxo é o método comum aos três sistemas de solventes. Portanto, sugere-se que, para o *S. aureus*, o método de refluxo seja utilizado para obter extratos de geoprópolis mais ativos (Figura 1.26).



**Figura 1.26** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre potencial inibitório frente *S. aureus*

Quando a interação entre o solvente e o método é considerada, torna-se evidente que os solventes mostram eficácia variada dependendo do método de extração utilizado. Especificamente, para o método de refluxo, o etanol a 70% se destaca como o solvente mais eficaz, enquanto o metanol é preferível para o ultrassom. No caso do Soxhlet, o etanol a 95% demonstra ser o mais eficiente, e tanto o etanol quanto o metanol são eficazes para a maceração. Esses resultados sugerem que a escolha do solvente pode influenciar significativamente a eficácia do método de extração. No entanto, quando a interação entre solvente e método não é considerada, não há diferença estatística entre os solventes. No geral, com base nos resultados para o *S. aureus*, o método de refluxo com etanol a 70% se destaca como o mais eficaz entre os sistemas de extração testados (Figura 1.27).



**Figura 1.27** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre potencial inibitório frente *S. aureus*

Sugere-se que a relação entre solventes e métodos de extração pode variar significativamente dependendo da espécie bacteriana em análise. Os resultados destacam a complexidade dessa interação e ressaltam a importância de adaptar a escolha do método e do solvente de acordo com o microrganismo alvo.

Estudos demonstraram que as condições de extração têm influência no potencial inibitório dos extratos de própolis e geoprópolis (Pobiega *et al.*, 2019). Jug e colaboradores (2017) descreveram que os extratos obtidos por ultrassom foram menos ativos contra os microrganismos em comparação com outros métodos, em estudo realizado com própolis de *A. mellifera*. Em consonância, Gonzalez e colaboradores (2022) evidenciaram que a extração por ultrassom exerce influência na inibição do *S. aureus*, destacando-se quando comparada à maceração. Nichitoi e colaboradores (2021) constataram que o aumento do teor alcoólico de 50% para 70% não potencializou o efeito antimicrobiano do extrato de própolis de *A. mellifera* em suas amostras. Santos e colaboradores (2017) realizaram a extração da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* utilizando etanol a 70% e alcançaram resultados significativos na inibição do *S. aureus*. Buriol e colaboradores (2009) observaram que a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis está associada tanto ao tipo de microorganismo testado quanto

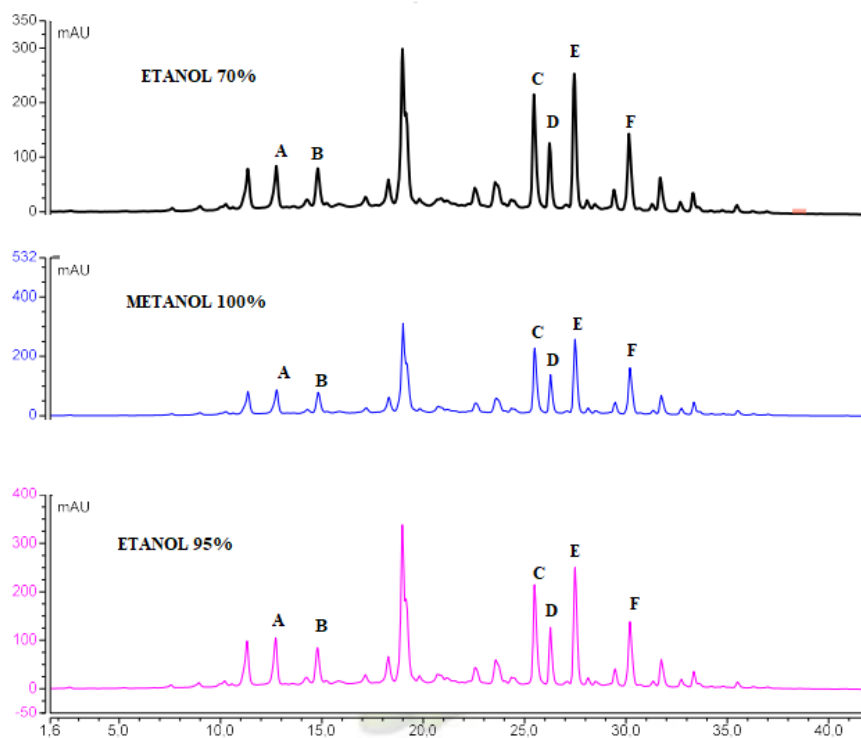
ao solvente utilizado na extração. Notadamente, o etanol a 95% mostrou-se mais eficaz contra o *S. aureus*.

Pesquisas conduzidas com geoprópolis proveniente de diversas espécies de abelhas sem ferrão, em relação a vários microrganismos, como *S. mutans*, *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, destacam a promissora natureza desse produto (CUNHA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2019; CIBANAL *et al.*, 2022; SCHELLIN *et al.*, 2021; KORU *et al.*, 2024). No entanto, são escassos os estudos que abordam a influência das técnicas e solventes empregados na extração da geoprópolis. O presente estudo é fundamental para avaliar quais parâmetros impactam no potencial antimicrobiano, buscando alcançar extratos mais ativos e promissores. Além disso, visa disponibilizar dados que orientem pesquisadores envolvidos no isolamento, permitindo a obtenção de extratos ricos em substâncias ativas.

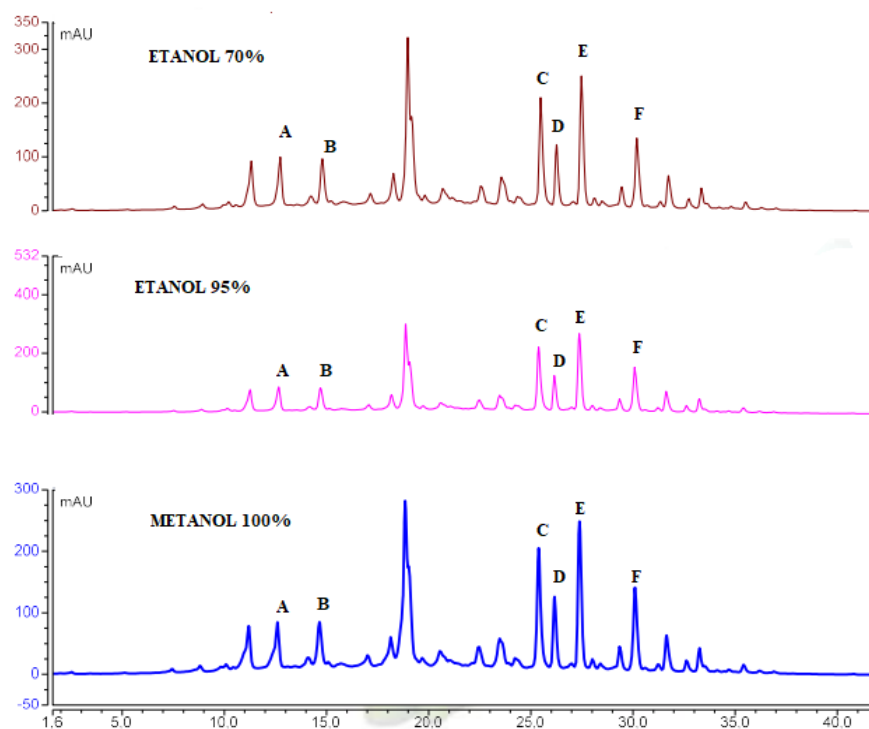
### **1.3.5 Efeito dos Parâmetros de Extração (Método e Solvente) na variável composição química**

Para analisar a influência do sistema de extração no perfil químico, empregou-se a cromatografia à líquidos de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A avaliação foi conduzida mediante a comparação dos cromatogramas, levando em consideração o tempo de retenção e os espectros (UV) dos picos majoritários. Esses picos, designados como A, B, C, D, E, e F exibiram uma área superior a 5 mU/min e demonstraram melhores resoluções cromatográficas. Seus respectivos espectros estão representados na figura 1.32.

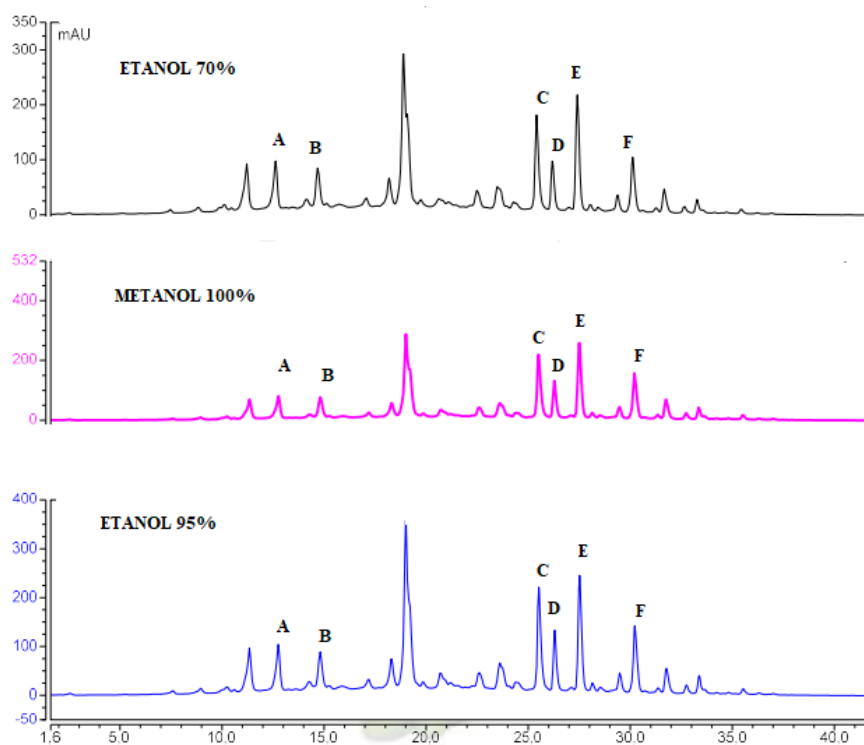
Ao realizar uma comparação qualitativa dos cromatogramas, constatou-se que os sistemas de extração não alteraram a composição química dos extratos, mantendo um padrão cromatográfico uniforme (Figura 1.28, 1.29, 1.30 e 1.31). Nesta fase da análise, não se procedeu com a identificação e quantificação, limitando-se à comparação das áreas dos picos selecionados. Considerando que a área é diretamente proporcional à concentração, foi avaliada a interferência do sistema de extração sobre as áreas dos picos.



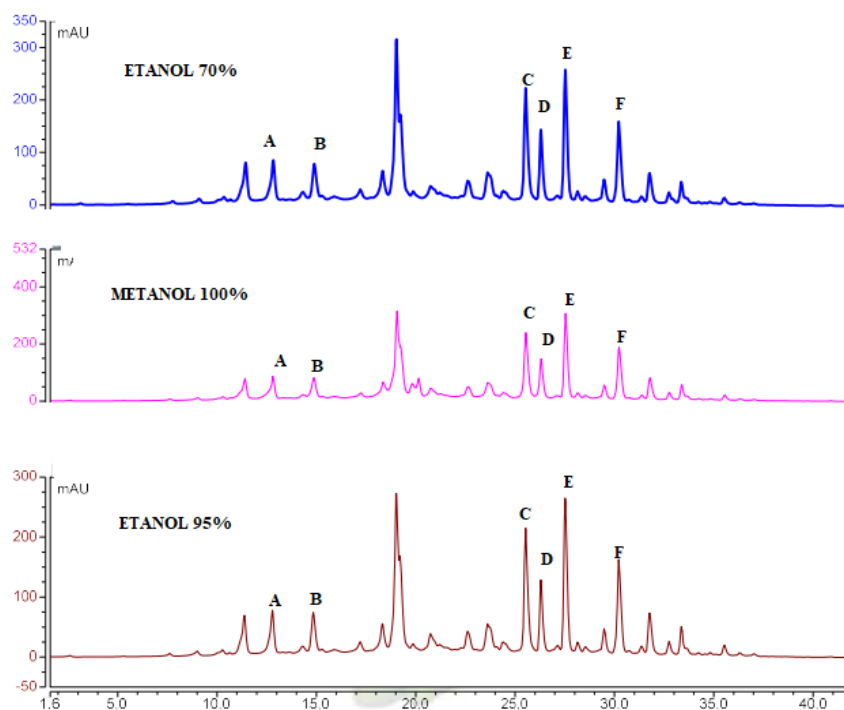
**Figura 1.28** - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de maceração utilizando CLAE-DAD (320 nm)



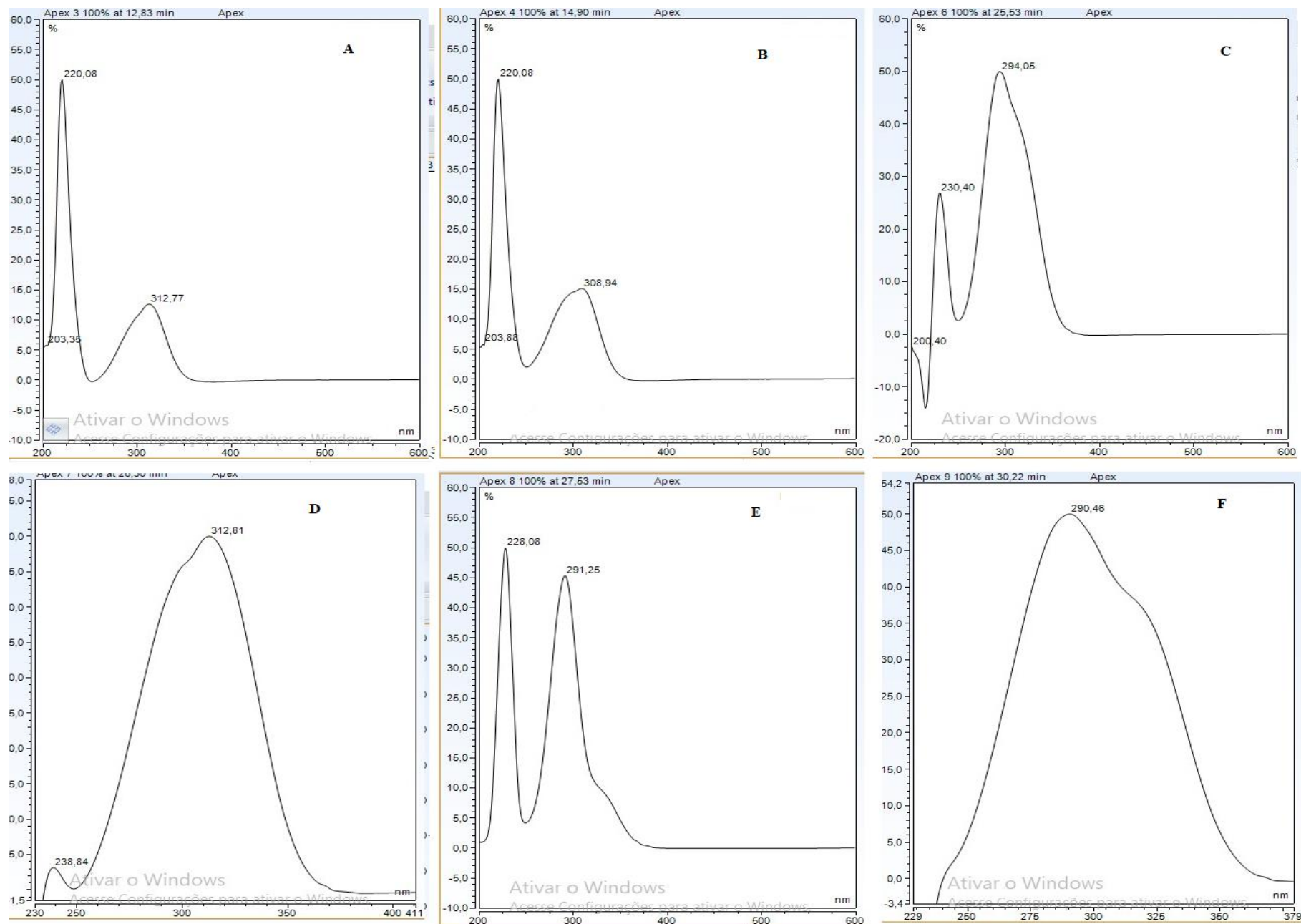
**Figura 1.29** - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de soxhlet utilizando CLAE-DAD (320 nm)



**Figura 1.30** - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de ultrassom utilizando CLAE-DAD (320 nm)

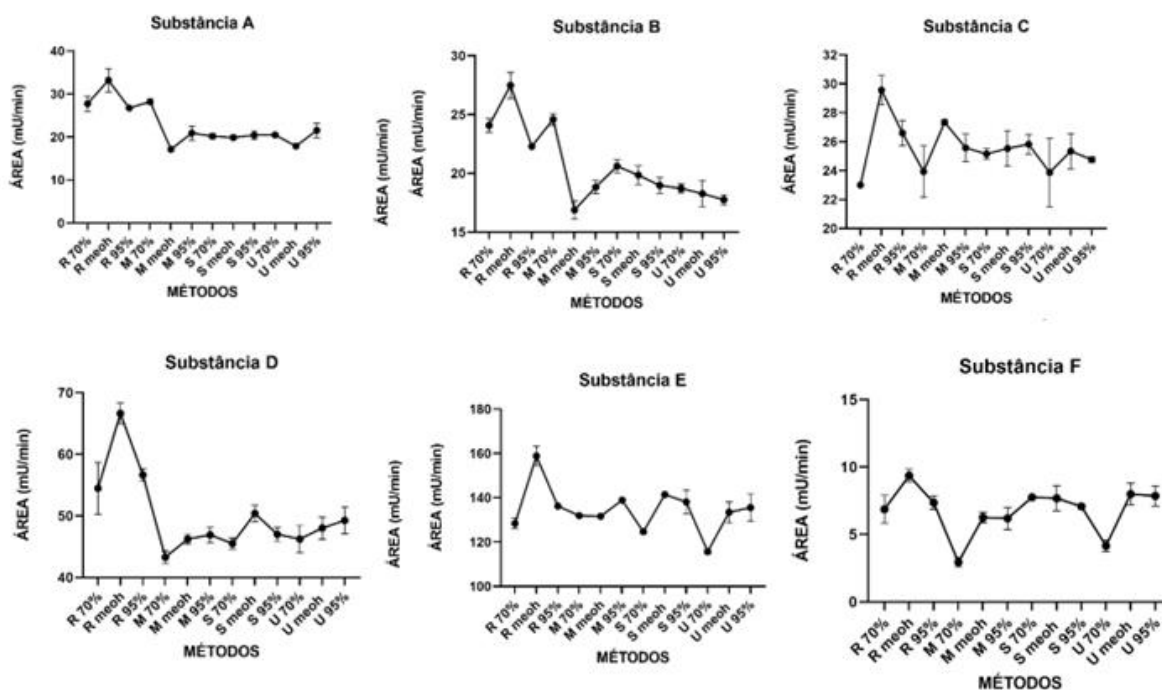


**Figura 1.31** - Comparação dos cromatogramas dos extratos de geoprópolis obtidos pela técnica de refluxo utilizando CLAE-DAD (320 nm)



**Figura 1.32** - Espectros no UV ilustrativos das extrações por soxhlet, maceração, ultrassom e refluxo para substância A, B, C, D, E F

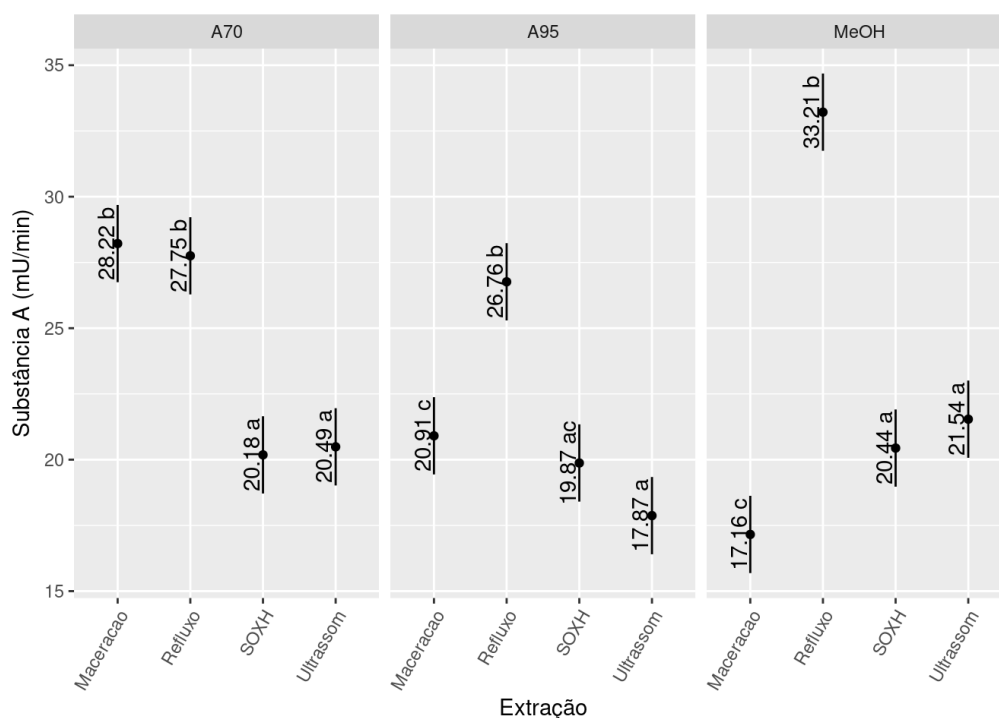
Ao avaliar as áreas dos picos majoritários com melhor resolução (A, B, C, D, E e F), observou-se que o valor-p foi inferior ao nível de significância, resultando na rejeição da hipótese nula (interação significativa). As áreas estão representadas na figura 1.33.



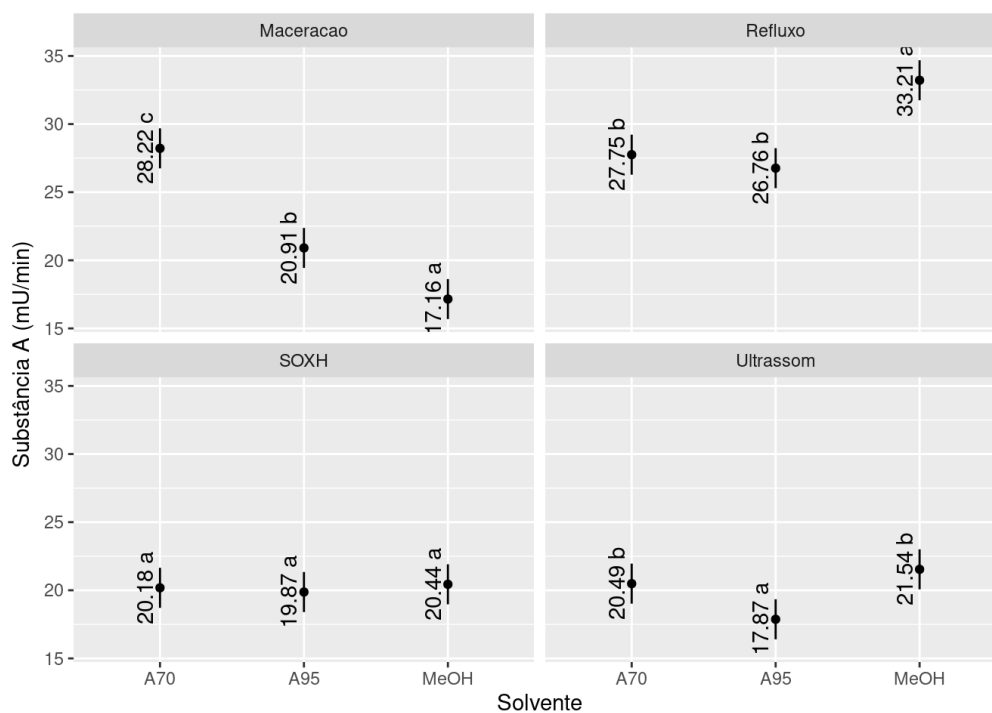
**Figura 1.33** - Áreas dos picos cromatográficos para suas respectivas substâncias e métodos extrativos

Os resultados estatísticos indicam uma interação significativa entre o método de extração e o solvente. Ao analisar a extração dentro de cada nível de solvente, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos de maceração e refluxo quando empregados com etanol na proporção de 70%, sendo que ambos demonstraram maior área para a substância A (Figura 1.34). Por outro lado, ao empregar o etanol 95% no método de refluxo, foi possível alcançar uma extração mais eficiente, contrastando com o método de ultrassom, que proporcionou uma extração menos eficaz. Notavelmente, a associação da maceração com metanol 100% resultou na menor concentração, em contraste com o método de refluxo, que se destacou neste aspecto. É evidente que o refluxo associado ao etanol 70%, 95% e metanol 100% permitiu uma extração mais eficiente da substância A em comparação com os demais métodos (Figura 1.35).



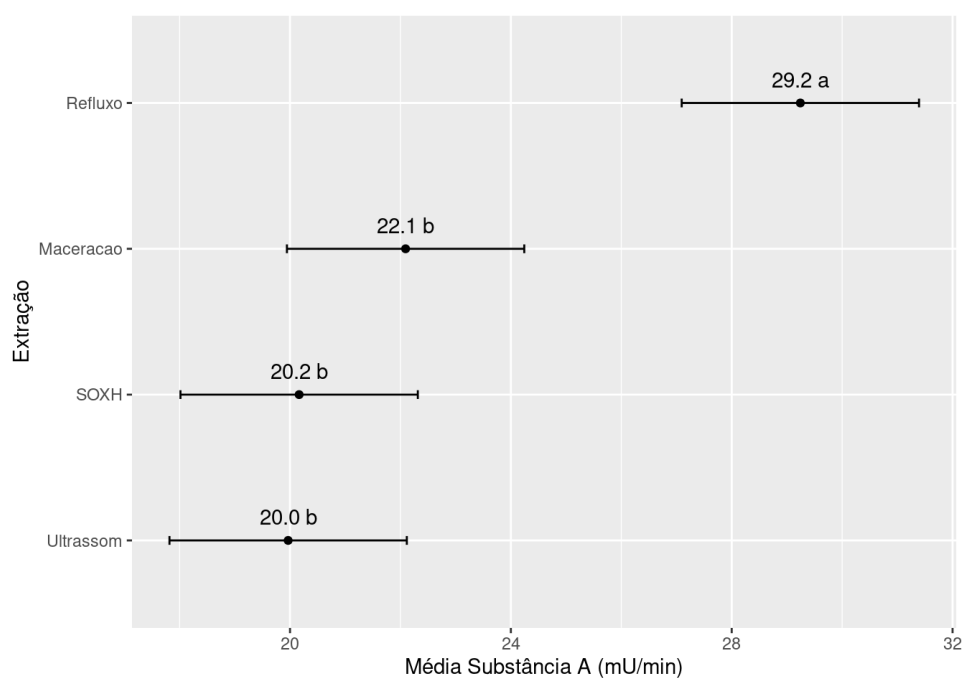


**Figura 1.34** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância A



**Figura 1.35** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância A

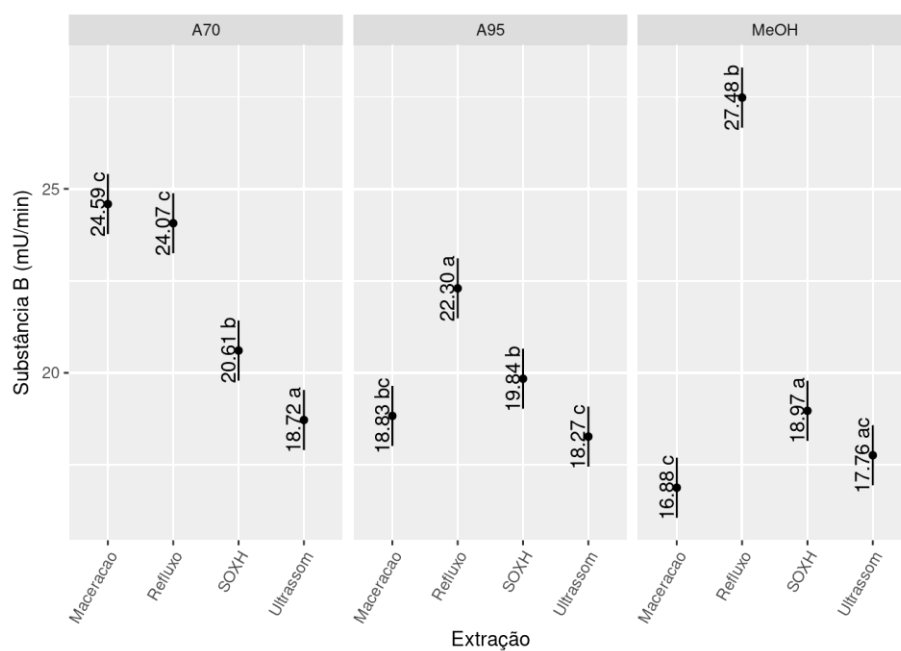
Ao analisar a diferença estatística entre os métodos, sem considerar a interação entre método e solvente, observou-se que o método de refluxo se destacou em relação aos demais métodos empregados (Figura 1.36).



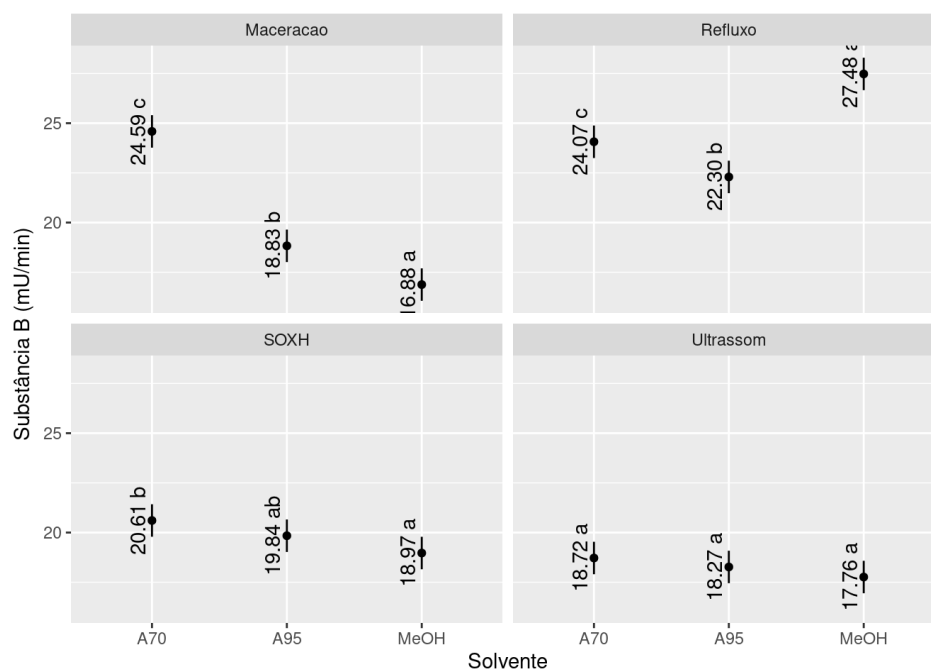
**Figura 1.36** - Médias das contribuições individuais dos solventes na extração substância A

A substância B demonstrou um padrão semelhante ao componente A, sendo notável o desempenho do método de refluxo quando associado ao uso de etanol 70% como solvente extrator. A análise dos solventes em cada nível de extração revelou que, para os métodos de maceração e Soxhlet, a escolha preferencial é o uso de etanol 70%. Em contrapartida, para o método de refluxo, a opção recomendada é o metanol 100% (Figura 1.37).

Ao analisar os solventes utilizados nos métodos de extração, observou-se que, para a maceração, o etanol 70% demonstrou maior eficácia, enquanto o metanol foi menos eficiente na extração. Por outro lado, no refluxo, o metanol mostrou-se mais eficaz. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para o Soxhlet. Quanto ao ultrassom, notou-se que a utilização do etanol 95% não promoveu uma extração favorável (Figura 1.38).

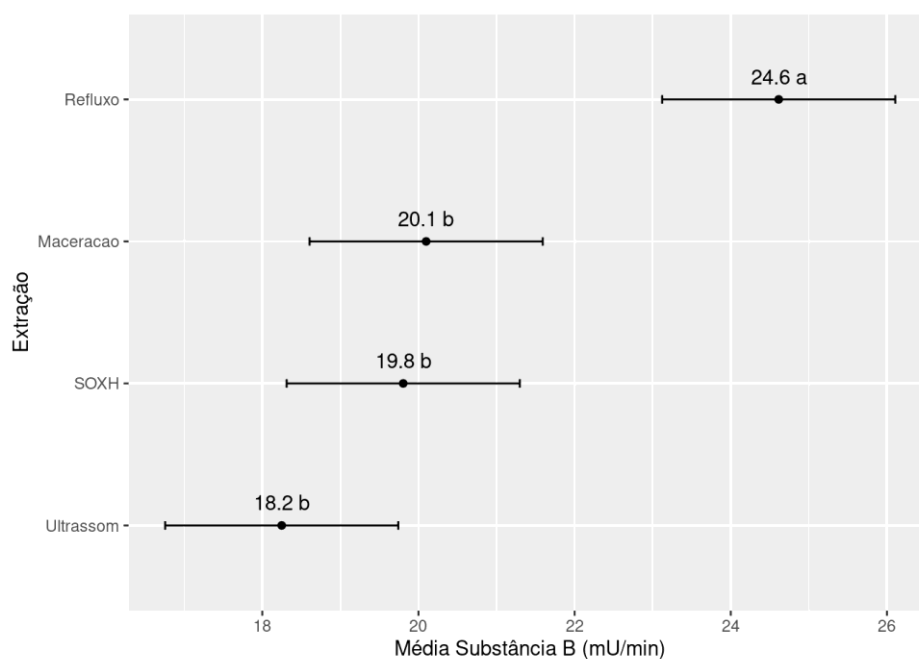


**Figura 1.37** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância B



**Figura 1.38** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância B

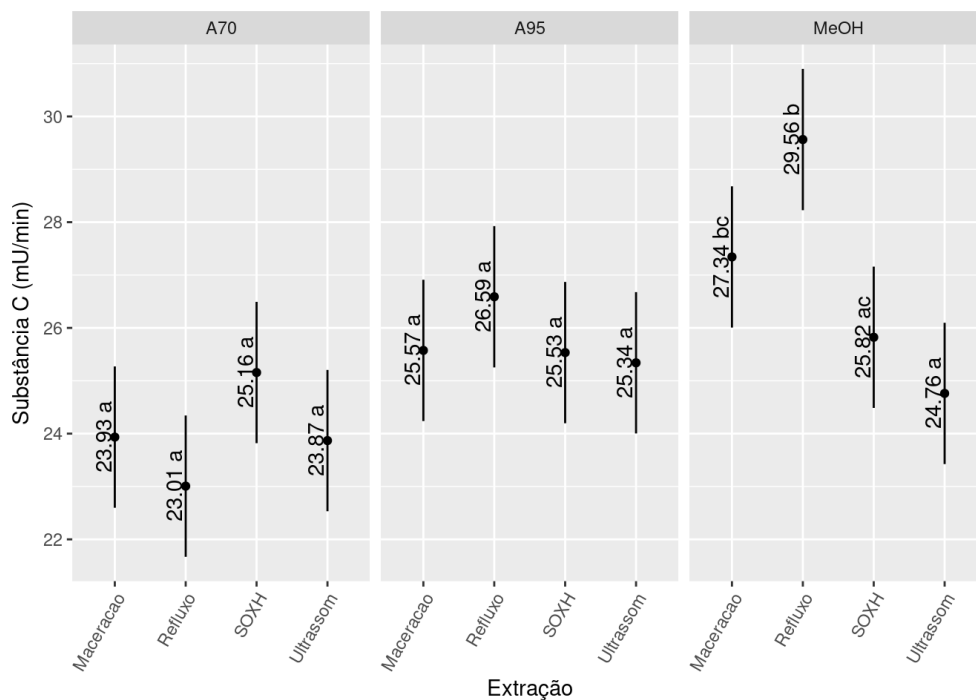
Ao desconsiderar a interação (solvente x método) e avaliar a diferença estatística entre os métodos de extração empregados, também se destaca o refluxo para o componente B, enquanto não se observa diferença significativa entre Soxhlet, maceração e ultrassom (Figura 1.39).



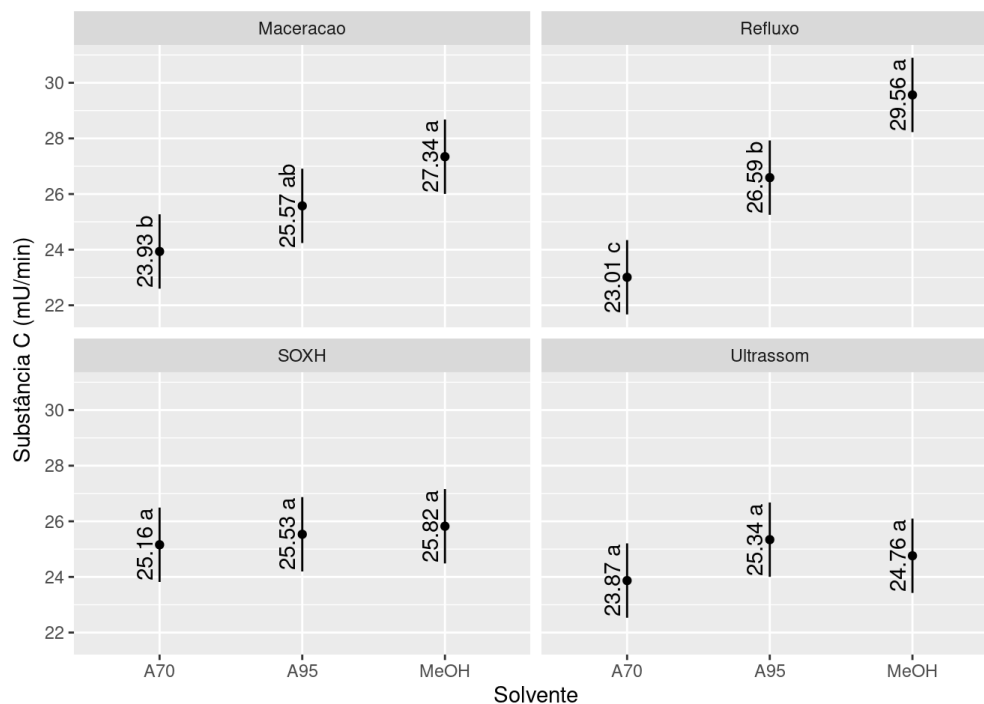
**Figura 1.39** - Médias das contribuições individuais das técnicas de extração da substância B

A Figura 1.40 revela que não houve diferença estatística entre os métodos para os solventes etanol 70% e 95% para a substância C. Ao avaliar a interação das extrações dentro de cada nível de solvente, torna-se evidente que a escolha da técnica deve ser baseada em outros fatores associados ao custo-benefício. Observa-se uma diferença apenas no caso do metanol 100%, onde o método de refluxo se destacou, apresentando concentração maior, enquanto o ultrassom demonstrou menor concentração.

No entanto, ao avaliar a interação dos solventes dentro de cada técnica, observa-se que não há diferença significativa na interação dos solventes com o soxhlet e ultrassom, ao contrário do que ocorre com a maceração e refluxo. Notavelmente, o etanol a 70% resultou em uma concentração inferior para ambas as técnicas, enquanto o metanol a 100% e o etanol a 95% obtiveram maiores rendimentos dessa substância (Figura 1.41).



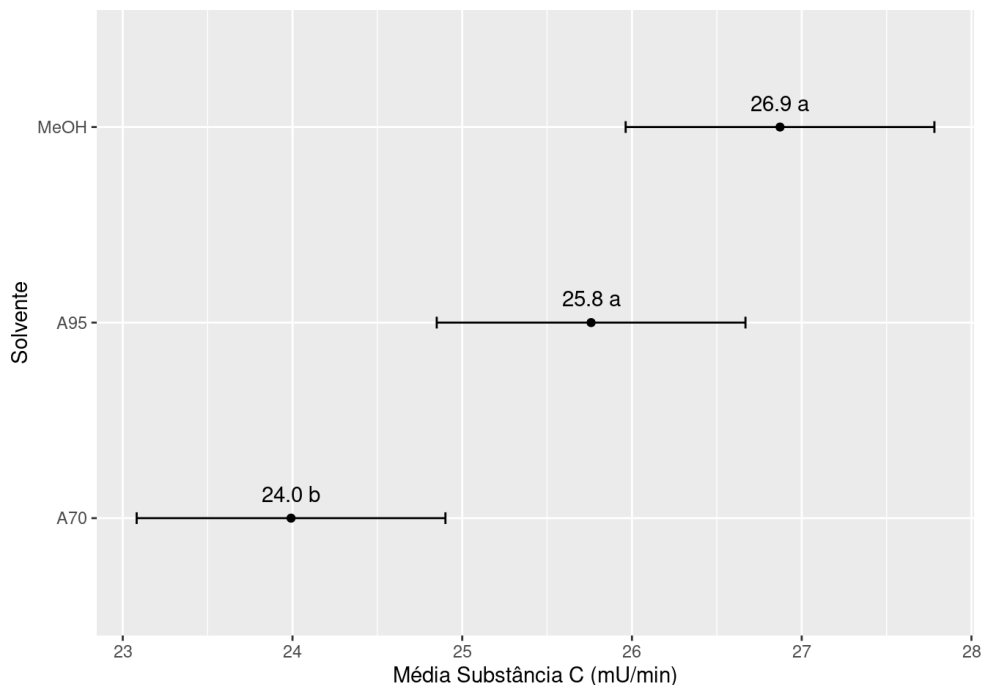
**Figura 1.40** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância C



**Figura 1.41** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância B

Isso sugere que solventes com maior poder extrativo, como o metanol a 100% e o etanol a 95%, podem ser mais eficazes na extração da substância alvo. Essa hipótese é corroborada pela observação de que o rendimento desses solventes foi estatisticamente

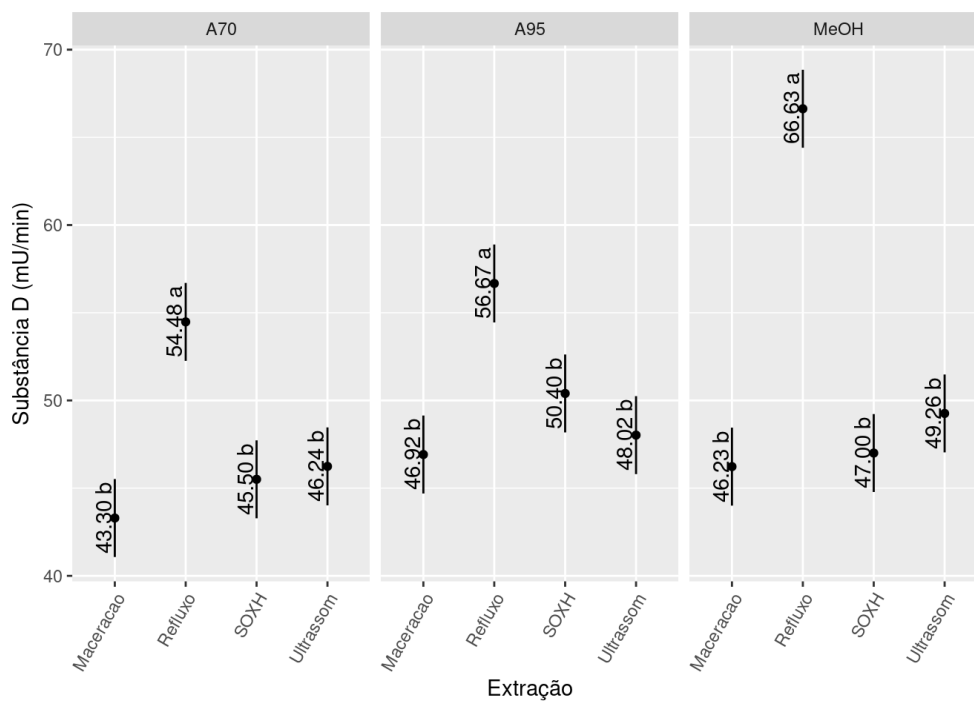
superior ao do etanol a 70% (Figura 1.42). Esses resultados destacam a importância da escolha criteriosa do solvente na extração, pois pode influenciar diretamente no teor dos componentes.



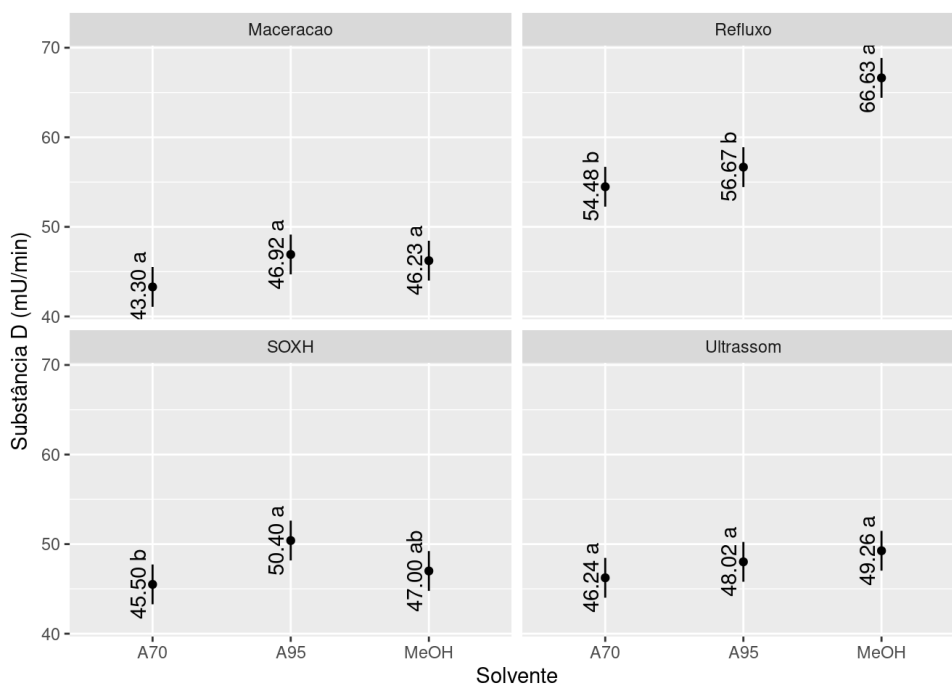
**Figura 1.42** - Médias das contribuições individuais dos solventes na extração substância C

Além disso, a diferença na interação dos solventes com as técnicas de extração pode indicar que cada método possui suas especificidades e pode ser mais adequado para diferentes tipos de amostras ou compostos. Esses resultados destacam a importância de uma abordagem cuidadosa na escolha do solvente e da técnica de extração para garantir a máxima eficiência na obtenção da substância desejada.

A interação entre o etanol 70% associado ao refluxo mostrou-se promissora para o componente D, que está, entre os picos majoritários, juntamente com a substância E. Esse resultado é significativo, uma vez que o componente D é uma substância encontrada em maior concentração no extrato de geoprópolis de *M. scutellaris* (Figura 1.43). Avaliando a interação solvente com o método, percebe-se que para maceração e ultrassom não houve diferença estatística, para refluxo o metanol 100% foi mais eficiente, já o soxhlet deve ser associado ao etanol 95% (Figura 1.44).



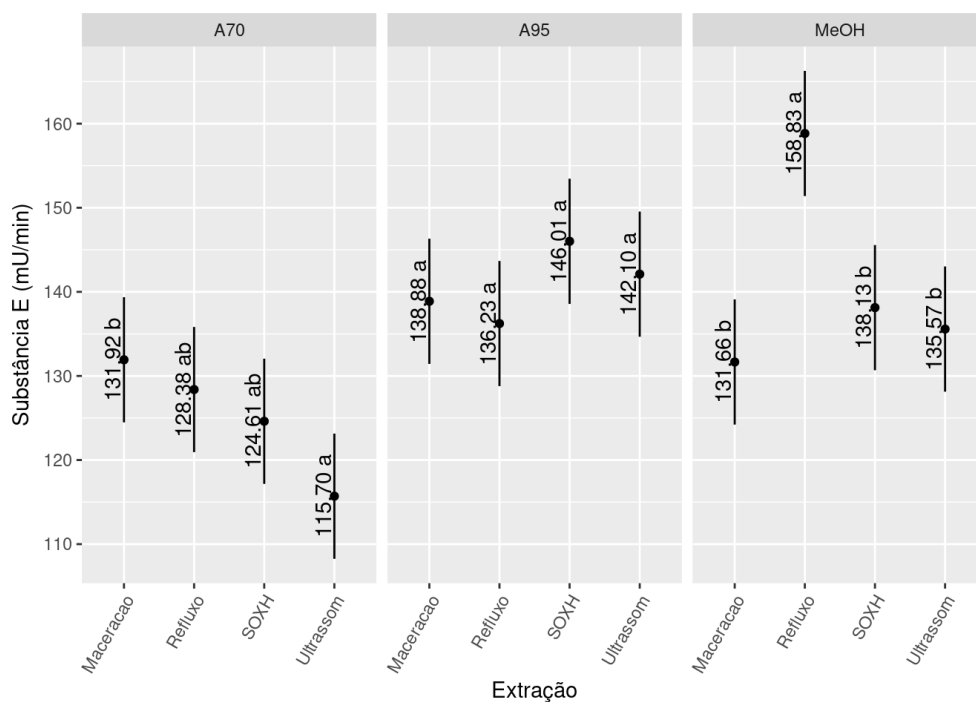
**Figura 1.43** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância D



**Figura 1.44** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância D

Para a substância E, a interação das técnicas com o etanol a 70% revelou que o ultrassom associado a esse solvente foi a técnica que extraiu a menor quantidade da substância E. No caso do etanol a 95%, não foi observada diferença estatística entre as

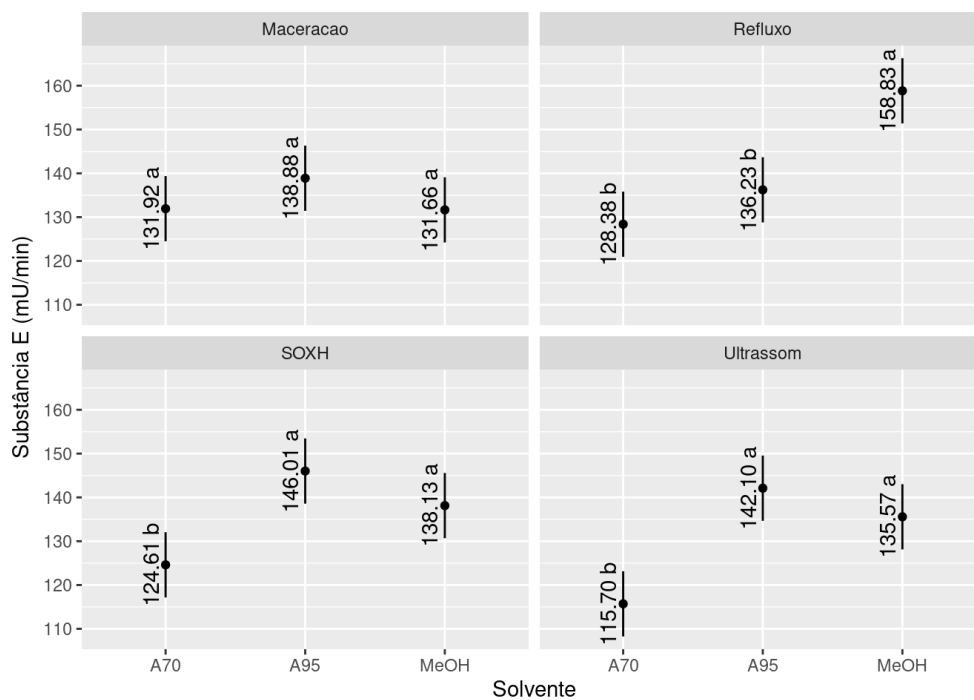
técnicas, sendo a escolha determinada pela viabilidade econômica, tempo e facilidade de execução, sugerindo-se a maceração e o ultrassom nesse sentido. Quanto ao metanol, a técnica de refluxo se destacou, resultando em maior concentração da substância (Figura 1.45).



**Figura 1.45** - Influência da interação da técnica de extração em cada nível de solvente sobre substância E

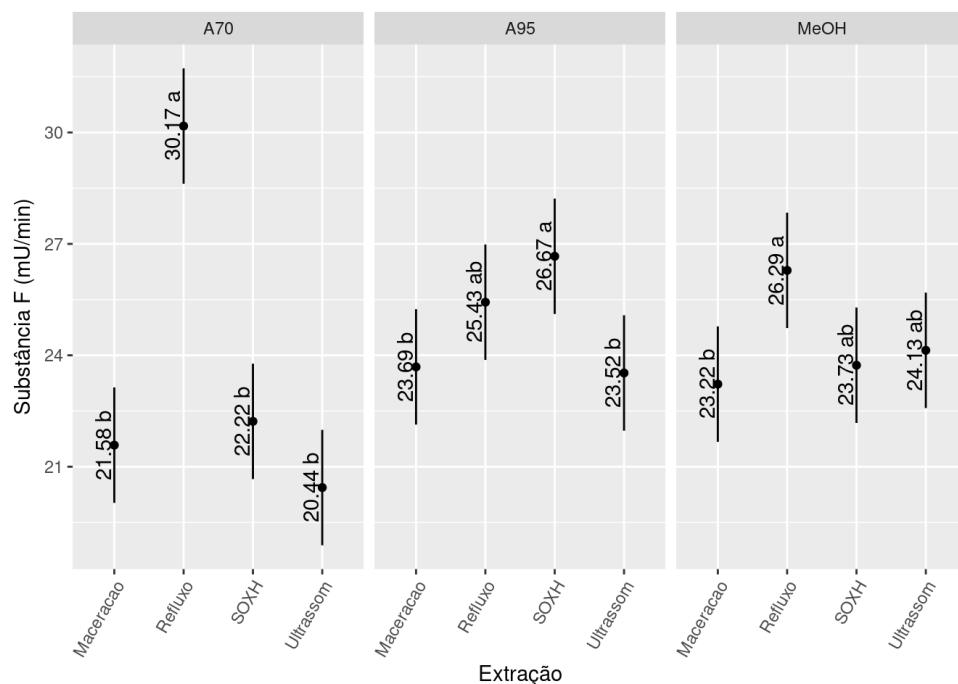
Analisando os resultados das interações do solvente com as técnicas, observa-se que, para a maceração, não houve diferença estatística entre os solventes, independentemente do sistema utilizado. No entanto, para o refluxo, o metanol mostrou-se mais eficaz na extração da substância E. No caso do Soxhlet, quando associado ao etanol a 95%, foi mais eficiente, enquanto o etanol a 70% associado ao ultrassom não deve ser utilizado, pois sua performance foi inferior em comparação com os demais solventes (Figura 1.46)





**Figura 1.46** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância F

A figura 1.47 mostra que a associação do etanol a 70% com o refluxo resultou em maior extração da substância F, enquanto o ultrassom apresentou menor desempenho nesse contexto.



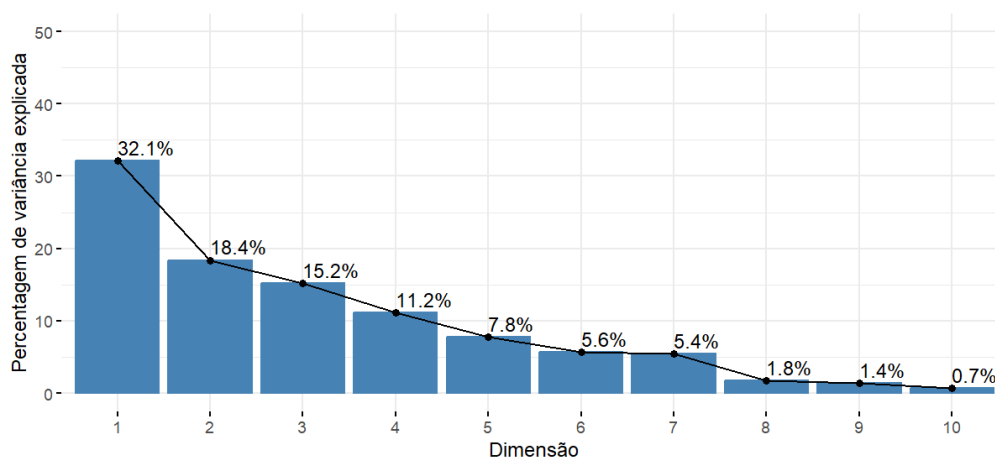
**Figura 1.47** - Influência da interação do solvente em cada nível de extração sobre substância F

Já o etanol a 95% mostrou uma interação diferente, com destaque para o Soxhlet; no entanto, o ultrassom também foi menos eficaz. O metanol se destacou no método de refluxo em comparação com a maceração. É importante notar que, para os três solventes, os métodos que empregam temperatura no sistema de extração se destacaram (Figura 1.47).

### 1.3.6 Análise Comparativa das Variáveis por Meio da Análise dos Componentes Principais

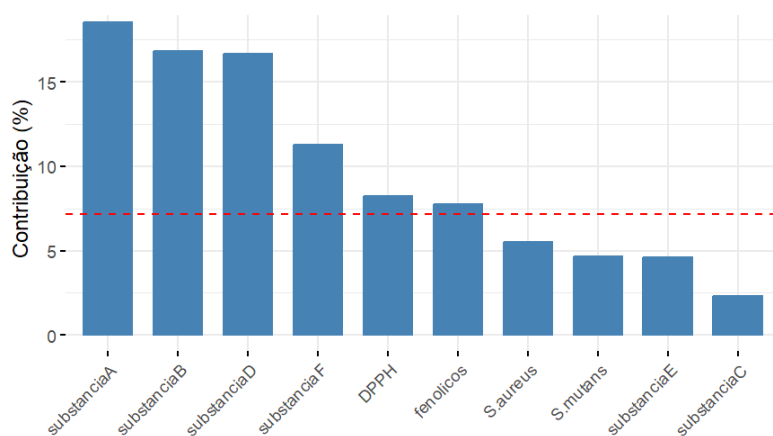
A análise de componentes principais é uma técnica estatística utilizada para reduzir a dimensionalidade dos dados, enquanto mantém o máximo de informação possível. Nessa abordagem, os dados originais são transformados em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas de componentes principais. Cada componente principal captura uma parcela da variabilidade total dos dados, com o primeiro componente principal explicando a maior parte dessa variabilidade, seguido pelos componentes subsequentes em ordem decrescente de importância. Os componentes principais são escolhidos de forma a maximizar a variância dos dados ao longo de cada componente, permitindo uma representação mais compacta e simplificada dos padrões presentes nos dados originais. Essa técnica é frequentemente utilizada em diversas áreas, como análise de dados, reconhecimento de padrões e modelagem estatística, para explorar a estrutura subjacente dos dados e identificar relações importantes entre as variáveis.

Como pode ser observado na Figura 1.48, a primeira componente principal (PC1) e a segunda (PC2) foram capazes de descrever 32,1% e 18,4% da variância dos dados, respectivamente, somando 50,5% da variância total.

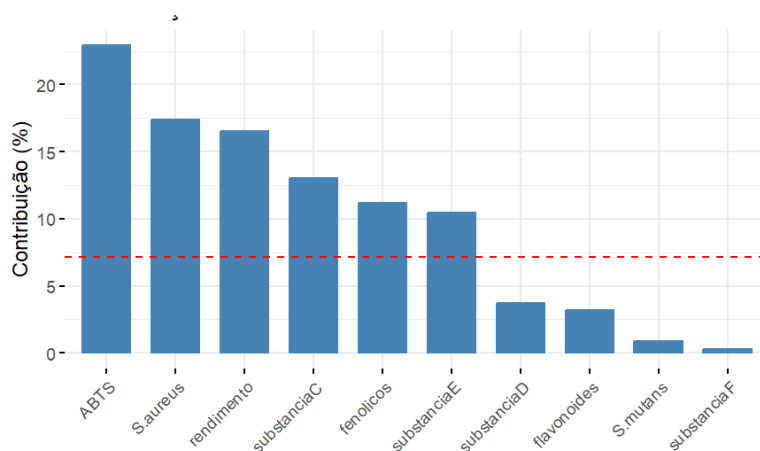


**Figura 1.48** - Porcentagem de explicação dos componentes principais

Na discussão dos resultados da análise de componentes principais, observa-se que a primeira componente principal é capaz de explicar a variação nas variáveis DPPH e na composição química das substâncias A, B, D e F (Figura 1.49). Esses resultados sugerem que há uma relação forte entre essas variáveis, indicando uma possível associação entre a atividade antioxidante medida pelo método DPPH e a presença ou concentração das substâncias A, B, D e F na amostra. Por outro lado, a segunda componente principal explica a variação nas variáveis ABTS, rendimento, inibição frente ao de *S. aureus* e nas substâncias C e E (Figura 1.50). Isso sugere que essas variáveis podem estar relacionadas de maneira distinta das variáveis influenciadas pela primeira componente principal, possivelmente indicando diferentes aspectos da composição ou atividade da amostra.

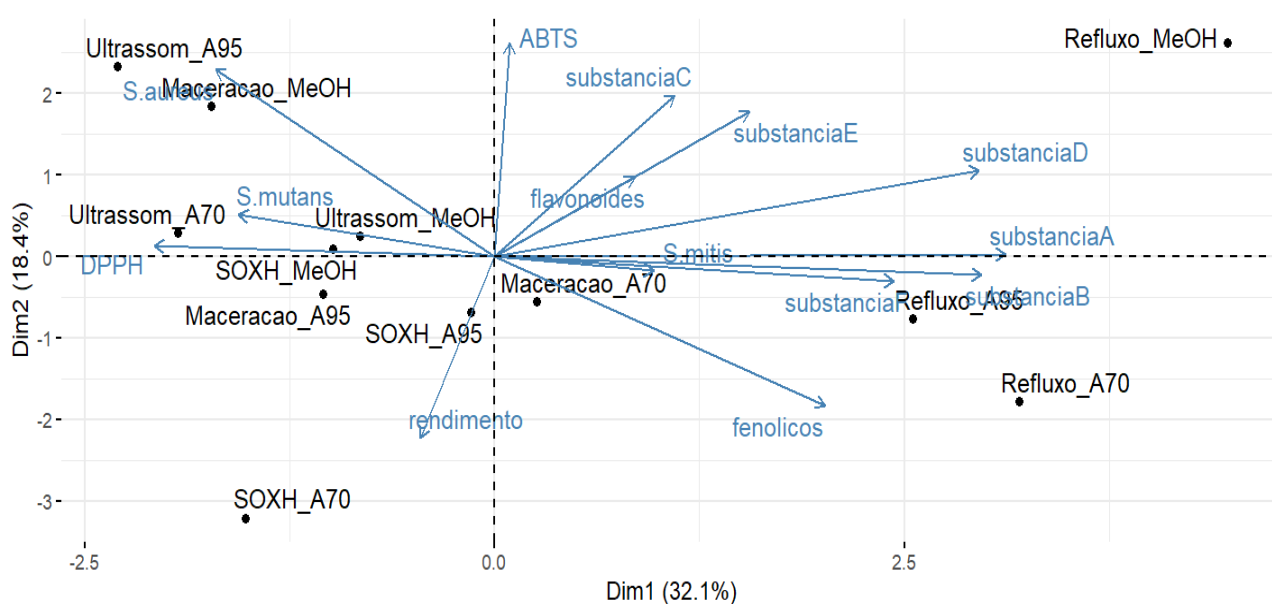


**Figura 1.49** - Contribuição das variáveis para o componente principal 1



**Figura 1.50** - Contribuição das variáveis para o componente principal 2

A dispersão dos pontos no gráfico indica a variabilidade dos dados. Pontos que estão próximos uns dos outros têm perfis de variáveis semelhantes, enquanto pontos distantes indicam perfis diferentes (SOUZA; POPPI, 2012). A observação de que as variáveis ABTS (atividade antioxidante), flavonoides totais, inibição do microrganismo *S. mitis* e as substâncias A, C, D e E compartilham o mesmo quadrante positivo no gráfico de PCA sugere que elas estão positivamente correlacionadas entre si. Isso significa que, à medida que uma dessas variáveis aumenta, as outras também tendem a aumentar, e vice-versa. Essa relação pode indicar que as substâncias presentes na geoprópolis que contribuem para a atividade antioxidante (ABTS) também estão relacionadas à presença de flavonoides totais e à capacidade de inibição dos microrganismos *S. mitis*. Além disso, as substâncias A, C, D e E também parecem estar associadas a esses efeitos (Figura 1.51).



**Figura 1.51** - Distribuição e Influência das Variáveis nos Componentes Principais

Esses resultados são importantes, pois sugerem que a geoprópolis pode ter propriedades antioxidantes e antimicrobianas devido à presença dessas substâncias específicas. Isso pode ter implicações significativas para seu potencial uso terapêutico ou como ingrediente em produtos de saúde e bem-estar.

A presença das variáveis no quadrante negativo da segunda componente principal sugere uma relação inversa entre essas variáveis e a atividade biológica medida. Ou seja, quanto maior a pontuação no eixo da segunda componente principal (quadrante

negativo), menor tende a ser a atividade biológica observada. Isso sugere que essas variáveis estão associadas a uma menor capacidade de inibição dos microrganismos e radicais livres, em comparação com as variáveis localizadas em outros quadrantes. Portanto, as extrações realizadas por ultrassom e maceração etanol 95% e metanol, que mostraram maior proximidade com essas variáveis no quadrante negativo, podem ter um desempenho menos eficaz em relação à atividade antimicrobiana e antioxidante (DPPH). Além disso, é interessante observar que as extrações realizadas por soxhlet utilizando metanol 100%, etanol 70% e 95% estão distantes das variáveis explicadas pela segunda componente principal.

Sugere-se que a substância E também possa ter influência na atividade antimicrobiana, visto que o extrato com maior teor dessa substância demonstrou atividade para os microrganismos estudados. Moncayo e colaboradores (2018) observaram que a presença de compostos fenólicos nas amostras de própolis explica sua atividade antimicrobiana. Altuntas e colaboradores (2023) afirmaram que a atividade antimicrobiana da própolis é geralmente associada a compostos fenólicos hidrofílicos e hidrofóbicos, tais como flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos, os quais podem atuar nas paredes celulares das bactérias.

Deve-se ressaltar que, ao correlacionar algumas variáveis, observou-se que o ensaio de DPPH foi mais eficaz para os extratos que apresentaram maior teor de fenólicos. Na análise da interação entre a técnica de extração e o solvente utilizado, observou-se que o método de refluxo se destacou para o etanol a 70% e 95%, em comparação com o ultrassom, Soxhlet e maceração. Além disso, sugere-se que as substâncias A, D e F também possam ter influenciado na atividade antioxidante, uma vez que o refluxo resultou em uma maior concentração desses componentes. A correlação do potencial antioxidante com o teor de fenólicos já era esperada, uma vez que estudos fundamentam o potencial antioxidante dos compostos fenólicos (ZEB, 2020; JOSHI *et al.*, 2022).

Os dados fornecidos destacam os desafios enfrentados na análise da geoprópolis, uma substância complexa composta por uma variedade de componentes, incluindo resinas vegetais, cera, pólen e barro. Essa composição heterogênea pode influenciar significativamente nos resultados obtidos, especialmente na eficácia dos métodos de extração e na interpretação dos parâmetros analisados. A observação da resistência da geoprópolis, que se assemelha a uma cola devido à presença de barro, sugere que a amostra pode ser difícil de homogeneizar, o que pode afetar a precisão das análises. Mesmo com todos os cuidados tomados durante a coleta e o processamento da amostra,

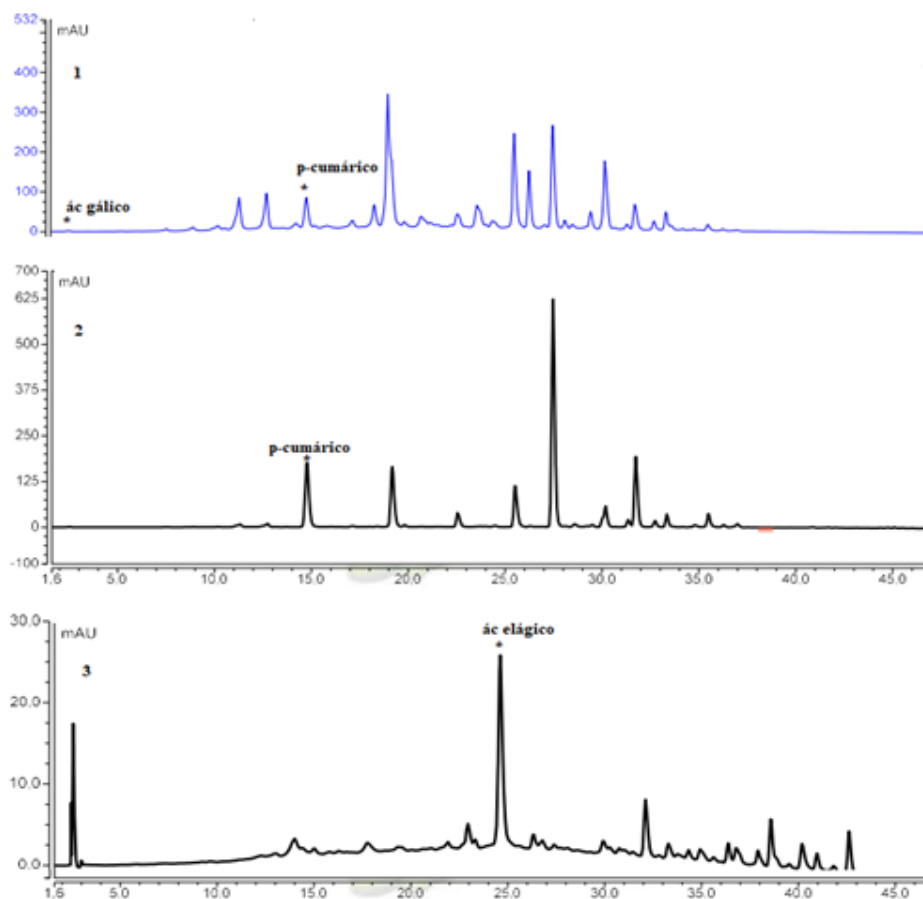
essa dificuldade pode levar a variações nos resultados entre as amostras e influenciar a interpretação dos dados.

A análise do perfil químico revelou que, embora não tenha havido diferença qualitativa entre as amostras, foram observadas variações nas áreas dos picos identificados como majoritários, indicando modificações nas concentrações. É sabido que em amostras complexas como a geoprópolis, as substâncias podem interagir de forma sinérgica para gerar efeitos terapêuticos desejados. Essas variações nas concentrações podem ter implicações importantes para a atividade terapêutica e as propriedades da geoprópolis. Uma compreensão mais aprofundada dessas modificações é essencial para identificar os compostos ativos responsáveis pelos efeitos terapêuticos observados e para otimizar os métodos de extração e processamento da geoprópolis. Esses resultados destacam a importância de uma abordagem integrada que leve em consideração não apenas a presença das substâncias, mas também suas concentrações relativas e possíveis interações, para uma avaliação mais precisa do potencial terapêutico da geoprópolis.

### **1.3.7 Avaliação do perfil químico através da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD)**

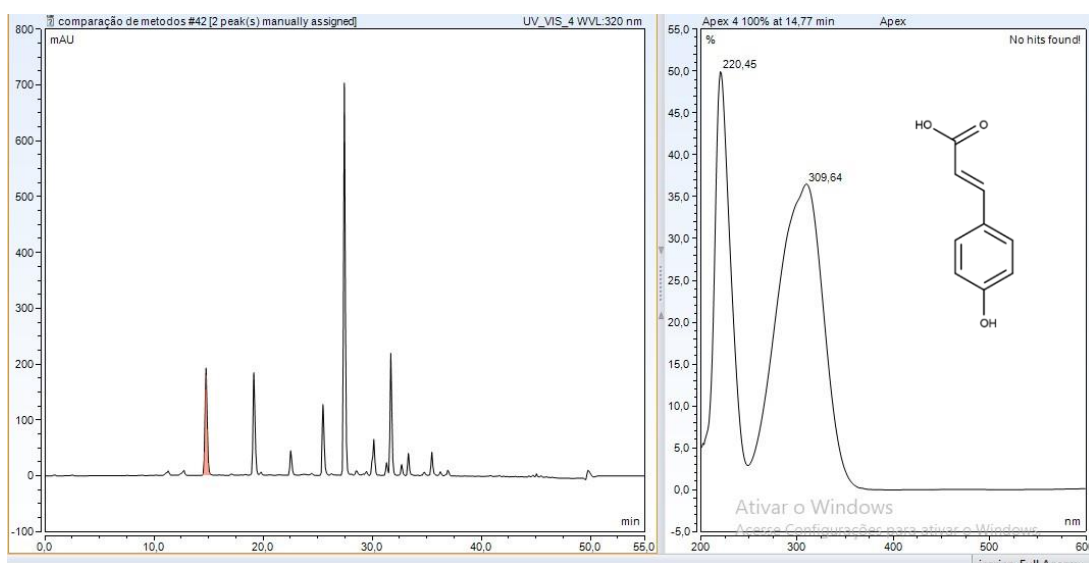
Os extratos obtidos por refluxo, Soxhlet, maceração, ultrassom e supercrítico foram submetidos à análise cromatográfica. É importante destacar que o extrato obtido por fluido supercrítico não foi utilizado nas análises de fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante e antimicrobiana devido ao baixo rendimento obtido (0,7%). Portanto, optou-se por utilizá-lo apenas na quantificação de compostos fenólicos através da análise cromatográfica.

Reis e colaboradores (2020) destacam que a etapa extrativa da própolis é complexa e desempenha um papel crucial na obtenção dos compostos de interesse. Esta observação é evidenciada na figura 1.52 e tabela 1.6, que apresenta os resultados de identificação e quantificação dos métodos de extração convencionais e não convencionais. Foi possível identificar e quantificar o ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido transcinâmico e ácido elágico (Figura 1.52, Figura 1.53, 1.54, 1.55, 1.56 e 1.57). Os resultados indicam que a etapa de extração exerce influência na composição dos ácidos fenólicos presentes na própolis produzida por *M. scutellaris*.

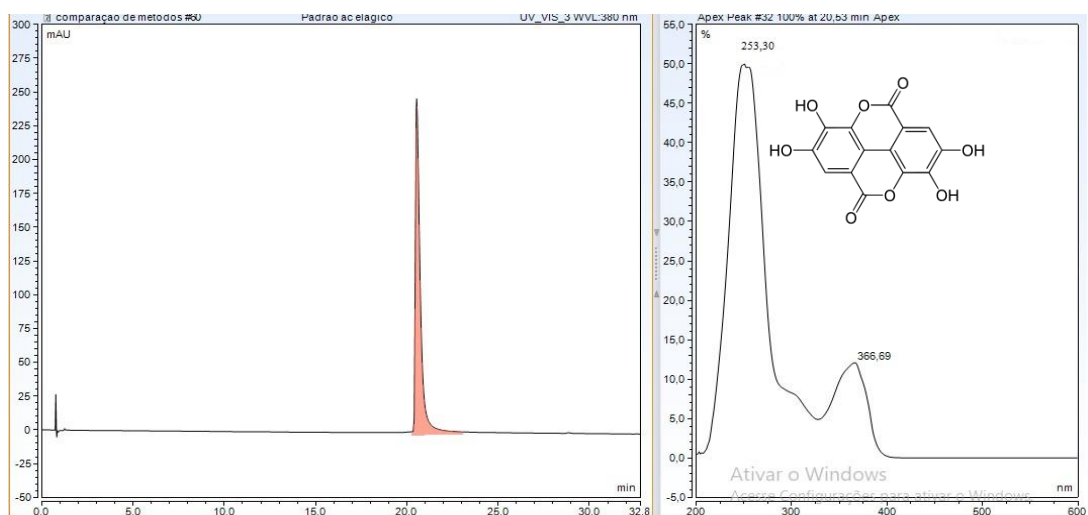


**Figura 1.52** – Cromatograma obtido por cromatografia à líquidos de alta eficiência

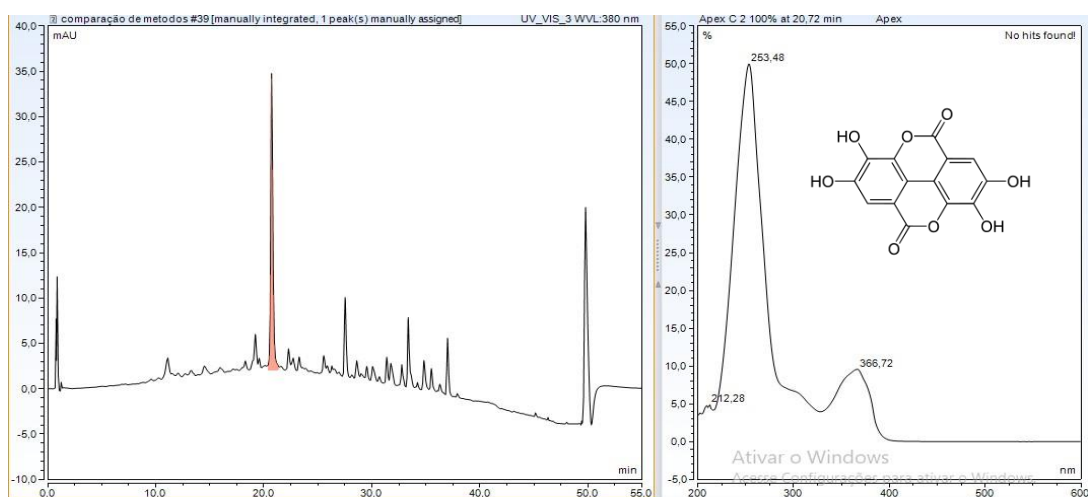
- 1: Representação do cromatograma para maceração, ultrassom, refluxo e soxhlet (320nm)
- 2: Fluido supercrítico (320nm)
- 3: Representação do cromatograma para maceração, ultrassom, refluxo e soxhlet (380 nm)



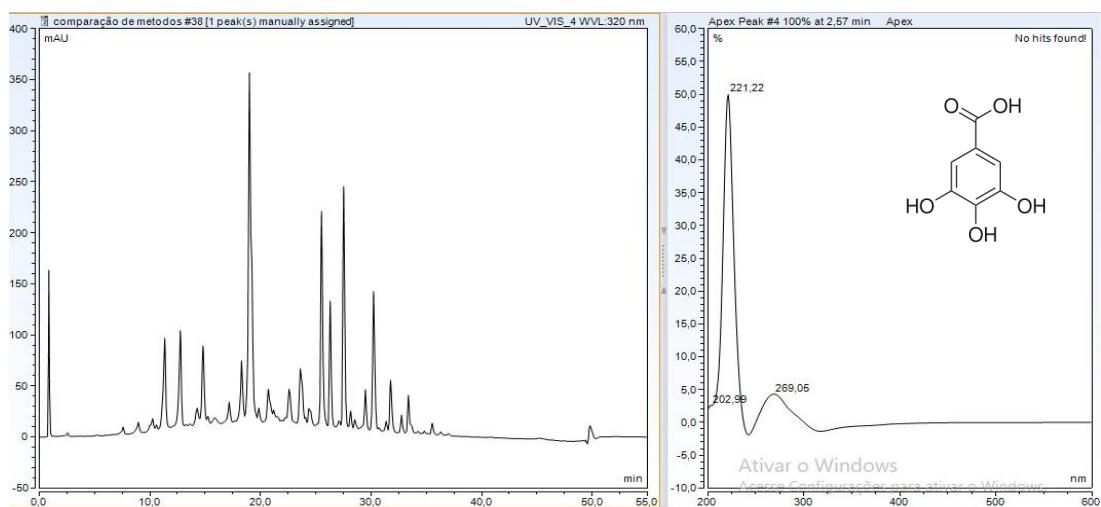
**Figura 1.53** - Cromatograma em 320nm, espectro no UV (amostra) e estrutura química do ácido p-cumárico



**Figura 1.54** - Cromatograma em 380nm, espectro no UV (padrão) e estrutura química do ácido elágico

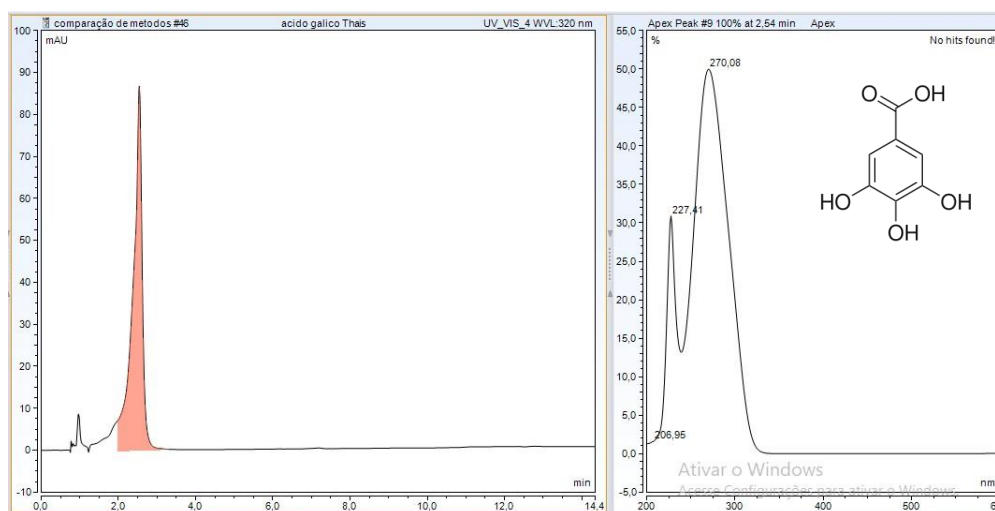


**Figura 1.55** - Cromatograma em 380nm, espectro no UV (amostra) e estrutura química do ácido elágico



**Figura 1.56** - Cromatograma em 320nm, espectro no UV (amostra) e estrutura química do ácido gálico





**Figura 1.57** - Cromatograma em 320nm, espectro no UV (padrão) e estrutura química do ácido gálico

**Tabela 1.6** - Médias dos teores de ácidos fenólicos nas amostras em  $\mu\text{g.mg}^{-1}$  de extrato, acompanhado do desvio padrão

| Amostras       | p-cumárico<br>( $\mu\text{g.mg}^{-1}$ ) | ác elágico<br>( $\mu\text{g.mg}^{-1}$ ) | ác gálico<br>( $\mu\text{g.mg}^{-1}$ ) |
|----------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| Refluxo 70%    | 73,35 $\pm$ 4,28                        | 41,15 $\pm$ 0,99                        | 16,90 $\pm$ 0,39                       |
| Refluxo MeOH   | 82,98 $\pm$ 2,83                        | 55,88 $\pm$ 0,23                        | 20,37 $\pm$ 0,47                       |
| Refluxo 95%    | 87,23 $\pm$ 3,04                        | 51,78 $\pm$ 0,84                        | 17,40 $\pm$ 0,25                       |
| Maceração 70%  | 80,55 $\pm$ 1,72                        | 24,91 $\pm$ 0,86                        | 16,60 $\pm$ 0,19                       |
| Maceração MeOH | 76,98 $\pm$ 3,32                        | 38,79 $\pm$ 0,80                        | 17,32 $\pm$ 0,86                       |
| Maceração 95%  | 109,79 $\pm$ 5,91                       | 44,74 $\pm$ 2,56                        | 19,25 $\pm$ 1,30                       |
| Soxhlet 70%    | 109,46 $\pm$ 5,36                       | 51,99 $\pm$ 1,62                        | 22,65 $\pm$ 0,06                       |
| Soxhlet MeOH   | 79,65 $\pm$ 1,63                        | 49,58 $\pm$ 0,70                        | 16,57 $\pm$ 0,47                       |
| Soxhlet 95%    | 129,39 $\pm$ 4,42                       | 55,79 $\pm$ 0,62                        | 15,90 $\pm$ 1,13                       |
| Ultrassom 70%  | 76,00 $\pm$ 0,19                        | 32,62 $\pm$ 1,78                        | 18,01 $\pm$ 0,05                       |
| Ultrassom MeOH | 80,26 $\pm$ 1,83                        | 53,38 $\pm$ 4,20                        | 19,67 $\pm$ 0,07                       |
| Ultrassom 95%  | 94,35 $\pm$ 4,57                        | 53,17 $\pm$ 4,51                        | 18,83 $\pm$ 0,10                       |
| Supercrítico   | 222,22 $\pm$ 4,33                       | -                                       | -                                      |

Os resultados indicam que a extração mais eficiente do ácido *p*-cumárico foi obtida utilizando a técnica de fluido supercrítico (Tabela 1.7). Por outro lado, a extração por refluxo 70% mostrou-se menos eficaz na extração do ácido *p*-cumárico em comparação com as outras técnicas utilizadas. A tabela 1.6 também revela que o método de fluido supercrítico foi menos eficaz na extração dos outros ácidos fenólicos avaliados (ácido gálico e ácido elágico).

Sugere-se que as condições empregadas no método supercrítico foram determinantes para a eficiência da extração do ácido *p*-cumárico. Uma das características distintivas da extração por fluido supercrítico é a manipulação da temperatura e pressão acima do ponto crítico (ROSTAGNO *et al.*, 2013). Esses fatores combinados podem ter impactado na solubilidade do ácido *p*-cumárico, o que resultou em maior concentração.

Machado e colaboradores (2016) também observaram resultados semelhantes em amostras de própolis marrom, verde e vermelha em relação ao ácido *p*-cumárico. Eles constataram que a extração supercrítica resultou em maiores concentrações de ácido *p*-cumárico em comparação com os métodos convencionais.

O ácido *p*-cumárico, pertencente à classe dos ácidos fenólicos, apresenta diversas atividades biológicas descritas na literatura, como antioxidante, analgésica, antimicrobiana, anticancerígena, antitrombótica e inibidora da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Estudos também demonstraram que o ácido *p*-cumárico é promissor em testes hepatoprotetores e antiparasitários, especialmente contra *Entamoeba histolytica* (BOZ *et al.*, 2015; MURATO *et al.*, 2021; VENKATEZAN *et al.*, 2023).

**Tabela 1.7** - Agrupamento para o ácido *p*-cumárico usando método de Tukey e 95% de Confiança

| EXTRAÇÕES      | Média  | Agrupamento |   |   |
|----------------|--------|-------------|---|---|
| Supercrítico   | 222,22 | A           |   |   |
| Soxhlet 95%    | 129,4  | B           |   |   |
| Maceração 95%  | 109,79 | B           | C |   |
| Soxhlet 70%    | 109,46 | B           | C |   |
| Ultrassom 95%  | 94,34  |             | C | D |
| Refluxo 95%    | 87,23  |             | C | D |
| Refluxo MeOH   | 82,98  |             |   | D |
| Maceração 70%  | 80,547 |             |   | D |
| Ultrassom MeOH | 80,26  |             |   | D |
| Soxhlet MeOH   | 79,653 |             |   | D |
| Maceração MeOH | 76,98  |             |   | D |
| Ultrassom 70%  | 75,999 |             |   | D |
| Refluxo 70%    | 73,35  |             |   | D |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Avaliando os teores obtidos para o ácido elágico, observa-se que as extrações por refluxo com metanol 100% proporcionaram a maior concentração deste ácido fenólico, seguidas pelo método de Soxhlet com etanol a 95%. Por outro lado, as técnicas de ultrassom e maceração utilizando etanol a 70%, resultaram em menor concentração do ácido elágico.

Sugere-se que, para as condições utilizadas no sistema de extração, o etanol a 70% não foi favorável para a extração do ácido elágico (Tabela 1.8). Nesse contexto, a técnica de Refluxo MeOH Soxhlet EtOH 95%, que emprega temperatura em seu sistema, podem ter proporcionado solubilização da substância em questão. Além disso, o fato de o sistema de Soxhlet não saturar o solvente extrator também pode ter favorecido a extração.

É relevante salientar que o ácido elágico é considerado termoe estável e tem baixa solubilidade em água (BALA *et al.*, 2006; RAD *et al.*, 2022). Esses atributos podem ter contribuído para uma maior extração em métodos que envolvem temperatura no processo. Além disso, os solventes com maior teor de água resultaram em menor concentração do ácido elágico, em comparação com o metanol 100%, que se mostrou mais eficiente.

**Tabela 1.8** - Agrupamento para o ácido elágico usando método de Tukey e 95% de Confiança

| EXTRAÇÕES      | MÉDIA  | AGRUPAMENTO |   |   |
|----------------|--------|-------------|---|---|
| Refluxo MeoH   | 55,878 | A           |   |   |
| Soxhlet 95%    | 55,787 | A           |   |   |
| Ultrassom MeoH | 53,38  | A           | B |   |
| Ultrassom 95%  | 53,17  | A           | B |   |
| Soxhlet 70%    | 51,995 | A           | B |   |
| Refluxo 95%    | 51,782 | A           | B |   |
| Soxhlet MeoH   | 49,575 |             | B | C |
| Maceração 95%  | 44,74  |             | C | D |
| Refluxo 70%    | 41,145 |             |   | D |
| Maceração MeoH | 38,794 |             |   | D |
| Ultrassom 70%  | 32,62  |             |   | E |
| Maceração 70%  | 24,914 |             |   | F |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O ácido gálico não foi identificado nos extratos obtidos por fluido supercrítico. Dessa forma, é possível sugerir que a substância não foi detectada, isso pode estar associado ao limite de detecção do método de análise utilizado. Observa-se nos dados de concentração do ácido gálico que o solvente etanol a 70% influenciou na extração deste ácido fenólico, visto que o método Soxhlet com etanol a 70% proporcionou maior concentração. Por outro lado, as técnicas de Soxhlet associadas ao etanol a 95% e ao metanol a 100% foram menos eficientes.

**Tabela 1.9** - Agrupamento para o ácido gálico usando método de Tukey e 95% de Confiança

| EXTRAÇÕES      | MÉDIA   | AGRUPAMENTO |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---------|-------------|---|---|---|---|---|---|
| Soxhlet 70%    | 22,6505 | A           |   |   |   |   |   |   |
| Refluxo MeOH   | 20,371  |             | B |   |   |   |   |   |
| Ultrassom MeOH | 19,674  |             | B | C |   |   |   |   |
| Maceração 95%  | 19,251  |             | B | C | D |   |   |   |
| Ultrassom 95%  | 18,826  |             | B | C | D | E |   |   |
| Ultrassom 70%  | 18,007  |             |   | C | D | E | F |   |
| Refluxo 95%    | 17,399  |             |   |   | D | E | F | G |
| Maceração MeOH | 17,320  |             |   |   | D | E | F | G |
| Refluxo 70%    | 16,896  |             |   |   |   | E | F | G |
| Maceração 70%  | 16,598  |             |   |   |   |   | F | G |
| Soxhlet MeOH   | 16,566  |             |   |   |   |   | F | G |
| Soxhlet 95%    | 15,899  |             |   |   |   |   |   | G |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da análise cromatográfica indicam que a escolha do sistema de extração deve ser feita considerando o objetivo de uso da geoprópolis, uma vez que, para cada composto fenólico, houve um método associado ao solvente extrator que se mostrou mais eficaz. No entanto, o método de extração por soxhlet se destacou como o mais eficiente. Os resultados obtidos são significativos, uma vez que não existem estudos que demonstrem a eficácia da extração da geoprópolis por meio de fluido supercrítico.

Com o avanço das exigências por técnicas alinhadas aos princípios da química verde, torna-se evidente que o fluido supercrítico se destaca como uma alternativa promissora. Entretanto, para o estudo em questão, observa-se que apenas o ácido p-cumárico foi extraído com eficácia. Portanto, há a necessidade de avaliar os parâmetros de pressão, temperatura e cossolventes que possam potencializar a extração desses compostos. Estudos adicionais devem ser conduzidos para determinar as condições ideais que resultem em uma maior concentração dos ácidos fenólicos analisados. Machado e colaboradores (2015) demonstram que a seleção dos parâmetros de extração da própolis verde, utilizando fluido supercrítico, influenciou na concentração do artepelin C e do ácido p-cumárico.

#### 1.4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pôde-se concluir que os parâmetros de extração, incluindo o método e o solvente, desempenham papel fundamental na composição e atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis. A escolha adequada desses parâmetros pode influenciar significativamente a eficácia da extração de

compostos fenólicos e flavonoides, os quais são conhecidos por seu potencial antioxidante e antimicrobiano. Os dados sugerem que o método de refluxo, especialmente quando utilizado com etanol a 95%, demonstrou ser a opção mais eficiente para a extração desses compostos. Além disso, percebeu-se que o solvente também exerceu um impacto significativo, com o etanol mostrando seletividade e eficácia na extração em comparação com o metanol.

Esses resultados contribuem para o avanço do conhecimento científico sobre os parâmetros de extração de compostos bioativos da geoprópolis e fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de métodos de extração mais eficientes e sustentáveis. No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender completamente os mecanismos subjacentes aos efeitos observados e para explorar ainda mais o potencial terapêutico e nutricional desses extratos.

A estatística desempenha um papel fundamental na análise e interpretação dos resultados em estudos científicos, especialmente quando lidamos com múltiplas variáveis e complexidades experimentais. No presente estudo, a simples comparação direta entre os métodos de extração e solventes não foi suficiente para uma descrição completa e precisa dos resultados obtidos. Foi necessário empregar métodos estatísticos avançados, como análise de variância (ANOVA) e métodos fatoriais, para avaliar a interação entre as diferentes variáveis e identificar padrões significativos nos dados. A abordagem fatorial permitiu investigar de forma sistemática o efeito combinado das variáveis de interesse, como método de extração e tipo de solvente, sobre os parâmetros de interesse, como teor de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante, antimicrobiana, rendimento e perfil químico. Dessa forma, a utilização de métodos estatísticos avançados foi crucial para uma interpretação mais robusta e completa dos resultados, proporcionando informações que não seriam facilmente percebidas apenas pela análise visual dos dados.

## REFERÊNCIAS

- ALDABA-MURUATO, L.R *et al.* Therapeutic perspectives of *p*-coumaric acid: Anti-necrotic, anti-cholestatic and anti-amoebic activities. **World Academy of Sciences Journal**, v. 3, n. 5, p. 1-8, 2021.
- ALTUNTAŞ, U *et al.* Constituintes Fenólicos, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana e Análise de Agrupamento de Amostras de Própolis Baseadas em PCA de Diferentes Regiões da Anatólia. **Moléculas**, v. 28, n. 3, pág. 1121, 2023.
- ATANASOV, A.G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021
- ARAÚJO, M.J.A.M *et al.* *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 863-869, 2016
- ASHURST, J; NAPPE, T. Methanol Toxicity. **StatPearls**, v. 12, 2023.
- BALA, I. *et al.* Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006.
- BOZ, H *et al.* *p*-coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 11, p. 2323-2328, 2015.
- BURIOL, Lilian *et al.* Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.
- CALIXTO, J.B. "O papel dos produtos naturais na descoberta moderna de medicamentos." **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- CHEMAT, Farid *et al.* Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 3007, 2019.
- CIBANAL, I.L *et al.* Chemical characterization and in vitro antimicrobial activity of honeybee propolis and *Scaptotrigona jujuyensis* geopropolis against tomato pathogenic bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 1799-1808, 2020.
- DHANANI, T *et al.* Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1193-1199, 2017.

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

HARVEY, A.L *et al.* The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HOCHHEIM, S *et al.* Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, *in vitro* cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 339-350, 2019.

FAÇA, Q.D *et al.* Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296-302, 2014.

GALVÃO, A.C *et al.* Solubilidade do metanol, etanol e isopropanol em óleos vegetais a diferentes temperaturas e pressão atmosférica. **Ciência e Natura**, v. 35, n. 2, p. 311-317, 2013.

GONZÁLEZ-MONTIEL, L *et al.* Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Extracts during In Vitro Digestion. **Applied Sciences**, v. 12, n. 15, p. 7892, 2022.

JARAMILLO, C.M *et al.* Propolis from native Stingless Bees: ultrasound-assisted extraction. **Vitae**, v. 29, n. 2, 2022.

JOSHI, T *et al.* Effect of different proportions of phenolics on antioxidant potential: Pointers for bioactive Synergy/Antagonism in foods and nutraceuticals. **Biological Sciences**, v. 92, n. 4, p. 939-946, 2022.

JUG, M *et al.* The influence of extraction parameters on antimicrobial activity of propolis extracts. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 1, p. 47-50, 2017.

KORU, O *et al.* Evaluation of Antimicrobial Efficacy and Phenolic Compound Profiles in Geopropolis Samples from Bolivia and Venezuela. **Natural Product Communications**, v. 30, n. 2, p. 215, 2024.

KRAUT, J.A. Approach to the treatment of methanol intoxication. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 68, n. 1, p. 161-167, 2016.

MACHADO, B.A.S *et al.* Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. 1-26, 2015.

MACHADO, B.A.S *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. 1-26, 2016.

MARTINS, C.R *et al.* Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química nova*, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

MASEK, T *et al.* Chemical Composition, antioxidant and antibacterial activity of different extracts of poplar type propolis. **Croatia Chemica Acta**, v. 91, n. 1, p. 81-88, 2018.

MIGUEL, M.G *et al.* Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 16-23, 2014.

MONCAYO, L.M.R *et al.* Antibacterial activity and phenolic content of propolis extracts obtained by different extraction methods. **Nova scientia**, v. 10, n. 20, p. 397-412, 2018.

NARIMANE, S *et al.* Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, 2017.

NICHITOI, M.M *et al.* Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 20113, 2021.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

OLIVEIRA, L.P.G *et al.* A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life sciences**, v. 217, p. 81-90, 2019.

OROIAN, M *et al.* Influência da amplitude ultrassônica, temperatura, tempo e concentração do solvente na extração de compostos bioativos da própolis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, p. 105021, 2020.



PICCININI, A *et al.* Composição química e atividade biológica da própolis de *Melipona quadrifasciata*. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 12, pág. e193111234175-e193111234175, 2022.

POBIEGA, K *et al.* Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 12, p. 5386-5395, 2019.

SHARIFI-RAD, J *et al.* Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, 2022.

REIS, J.H.O *et al.* Supercritical extraction of red propolis: operational conditions and chemical characterization. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4816, 2020.

ROSTAGNO, M.A.; PRADO, J.M. (Ed.). Natural product extraction: principles and applications. v. 21, **Royal Society of Chemistry**, 2013.

SANTINI, A.T *et al.* Otimização do método de extração e efeito sazonal nas atividades biológicas e compostos fenólicos da própolis verde brasileira. **Holos**, v. 37, n. 7, p. 1-17, 2021.

SANTOS, C.M *et al.* Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

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

SILVA, Tania Maria Sarmento *et al.* Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 560-565, 2014.

SILVA, C *et al.* Determination of physicochemical characteristics and bioactive compounds in samples of pollen, geopropolis and honey from *Melipona Scutellaris* bee species. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 21484-21496, 2020.

SHI, L *et al.* Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 54, p. 81112-81129, 2022.

SOUZA, A.M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

SHELLIN, L.M *et al.* Bactericide and antimicrobial effects of ethanolic extracts of propolis and geopropolis of stingless bees natives from the state of Paraná in multi-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 2894-2917, 2022.

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

VENKATESAN, A *et al.* In vitro antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and antidiabetic activities of synthesized chitosan-loaded *p*-Coumaric acid nanoparticles. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1178-1194, 2023.

ZEB, A *et al.* Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. e13394, 2020.

ZIN, N.B.M *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Stingless Bee Propolis from Different Extraction Methods. **International Journal of Engineering & Technology**, v. 7, n. 4.43, p. 90-95, 2018.

WOŹNIAK, M *et al.* Biological Activity and Chemical Composition of Propolis from Various Regions of Poland. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 141, 2022.

## **CAPÍTULO 2**

### **Analyzing Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Geopropolis from *Melipona scutellaris*: HPLC-DAD and *In Vitro/In Silico* Investigations**

## CAPÍTULO 2: Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana da geoprópolis de *Melipona scutellaris*: investigação por CLAE-DAD e *in vitro/in silico*

### SHORT COMMUNICATION

#### Analyzing Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Geopropolis from *Melipona scutellaris*: HPLC-DAD and *In Vitro/In Silico* Investigations

Jéssica Lima de Souza<sup>a</sup>; Adrienne Bastos Ferreira<sup>b</sup>; Elinalva Maciel Paulo<sup>c</sup>; Clayton Alves Queiroz<sup>d</sup>; Carlos Alfredo Lopes de Carvalho<sup>e</sup>; Fábio de Souza Dias<sup>f</sup>; Anibal de Freitas Santos Junior<sup>g</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>h\*</sup>; Humberto Fonseca de Freitas<sup>i</sup>

- a. Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. Postgraduate Program in Plant Genetic Resources (jessica\_uefs2011@hotmail.com) <https://orcid.org/0000-0001-5614-5338>
- b. Department of Biological Sciences, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil (adrianebastos@gmail.com) <https://orcid.org/0000-0001-8620-4351>
- c. Department of Biological Sciences, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (elinalvamaciel@yahoo.com.br) <https://orcid.org/0000-0003-3630-3284>
- d. Department of Exact Sciences, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (cleiroz@gmail.com) <https://orcid.org/0000-0002-3242-3230>
- e. Center for Agrarian, Environmental and Biological Sciences of the Federal University of Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. (calfredo@ufrb.edu.br) <https://orcid.org/0000-0002-3306-3003>
- f. Science, Technology and Innovation Institute, Federal University of Bahia, Camaçari, BA 42809-000, Brazil. (fabiosdias@yahoo.com.br) <https://orcid.org/0000-0003-2279-0691>
- g. Department of Life Sciences, State University of Bahia, Salvador, Brazil. (prof.anibal@ig.com.br) <https://orcid.org/0000-0002-3022-0771>
- h. Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (hugo@uefs.br) <https://orcid.org/0000-0001-5198-5039>
- i. Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (hffreitas@uefs.br) <https://orcid.org/0000-0003-3040-9694>

**\*Corresponding author.** Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Transnordestina Av., Zip-code: 44036-900, Feira de Santana, BA, Brazil. E-mail addresses: ([hugo@uefs.br](mailto:hugo@uefs.br))

#### Abstract

This study evaluated the chemical profile, antimicrobial activity, and the presence of potentially toxic elements in geopropolis extracts produced by *Melipona scutellaris* in the Recôncavo region of Bahia, Brazil. It was found that the major chemical compounds belong to the class of phenolic compounds, with emphasis on the presence of gallic acid. In this study, no potentially toxic elements were found in the analyzed geopropolis. Regarding the antimicrobial potential, gram-positive bacteria were susceptible to the action of geopropolis extract at concentrations of 0.25 to 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>, highlighting its microbiological activity against *Streptococcus mitis* (ATCC 00456) and *Candida albicans* (CCMB 251). Thus, this geopropolis extract can be used as a bacteriostatic rather than a bactericide. Our results suggest the potential for the economic and therapeutic use of *M. scutellaris* geopropolis, adding value to one of the meliponiculture products.

**Keywords:** Meliponines; toxic metals; antimicrobial action.

## 2.1 INTRODUCTION

Stingless bee species produce propolis in a differentiated way, adding clay to its composition, Stingless bee species produce propolis in a distinctive manner, incorporating clay into its composition, which raises concerns about potential contamination. Soils from different regions often contain high levels of contaminants, including potentially toxic elements and pathogenic microorganisms (Verma; Sinha; Patry, 2017; Bonsucesso et al., 2018; Shifaw, 2018; Kowalska et al., 2018; Brennan et al., 2010; Baumgardner, 2012).

While studies on stingless bee products have primarily focused on honey production and its properties, little attention has been given to geopropolis in terms of its chemical composition, biological activity, and safety profile (Jaffé et al., 2015). As a result, the geopropolis may not command the same market value as stingless bee honey.

Thus, investigating the chemical profile and microbial quality of geopropolis can enhance its value as a stingless bee product and ensure its safe use. Notably, the absence of potentially toxic elements is a quality requirement crucial for commercializing and exporting Brazilian propolis (Brasil, 2013). In addition, assessing the antimicrobial potential against oral mucosa colonizing strains may open industrial applications for developing products to control the oral microbiological load based on geopropolis extracts. The primary goal of this investigation was to explore the chemical composition of geopropolis obtained from *Melipona scutellaris* using high-performance liquid chromatography. Furthermore, this study aimed to identify potentially hazardous metals and assess the antimicrobial capabilities of the geopropolis through *in silico* and *in vitro* experiments.

## 2.2 RESULTS AND DISCUSSION

The spectrophotometric analysis of the geopropolis extract revealed a total phenolic content of  $150.00 \pm 0.06$  g GAE.100g<sup>-1</sup>, along with a total flavonoid content was  $0.60 \pm 0.08$ mg QEQ.100g<sup>-1</sup>. This finding aligns with Franchin et al. (2012), who quantified total phenolic at  $127 \pm 1.9$  g GAE.100g<sup>-1</sup> of total phenolics, although they did not detect flavonoid contents in *M. scutellaris* geopropolis. Conversely, an investigation into *M. quadrifasciata* geopropolis conducted by Santos et al. (2017) demonstrated the

presence of  $2.54 \pm 2.80$  mg QE.100g<sup>-1</sup> for total flavonoid. This finding was corroborated by Torres et al. (2018), who quantified  $0.14 \pm 0.03$  mg QEQ.100g<sup>-1</sup> of flavonoids in *M. quadrifasciata* geopropolis.

In addition, the geopropolis extract was analyzed for the presence of numerous beneficial elements (Table S1), including silicon (Si), boron (B), calcium (Ca), and phosphorus (P). These elements hold therapeutic and nutritional advantages, encompassing several aspects, such as bone growth and maintenance, wound healing, and the regulation of hormone and vitamin D levels (Pizzorno, 2015; Serna; Bergwitz, 2020).

The study conducted on geopropolis collected in the Municipality of Cruz das Almas has yielded significant results. Notably, the levels of potentially toxic elements such as Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Ni, Pb, Sr, V, and Zn were undetectable. The absence of such contaminants may suggest a high material quality and good environmental quality in the region. This finding holds particular importance because Brazilian propolis is a product of great economic importance for the country and is sought after worldwide for its chemical and therapeutic characteristics.

In line with regulatory guidelines, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) has outlined specific parameters for propolis suitable for consumption. According to this technical protocol, propolis must not exceed levels greater than 0.1 µg·g<sup>-1</sup> of Cd and 0.3 µg·g<sup>-1</sup> of As and Pb. Compliance with these standards underscores the product's safety and suitability for consumption (Roman, 2010, ANVISA, 2013; Machado *et al.*, 2020).

Emphasis should be placed on care in the design of rearing boxes and storage containers. Propolis has the potential to help the oxidation of metallic material, which could impact the presence of metals such as chromium (Cr), zinc (Zn), and copper (Cu) (Popov et al. 2017). The analysis of contaminants in geopropolis and propolis serve as environmental biomarkers. This practice effectively proves the environmental quality of the region where meliponaries are situated (Bonsucesso *et al.*, 2018; Eskov *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2015; Pierini *et al.*, 2016; Finger *et al.*, 2014). Considering these factors, the presence of *M. scutellaris* colonies in Cruz das Almas-BA implies a favorable environmental quality.

Although there are several species of native bees in Brazil that produce geopropolis, for example, *Melipona beecheii*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, and *Melipona scutellaris*, few chemical and biological studies have been conducted. The chromatogram obtained for geopropolis from *M. scutellaris* shows the presence of

compounds characterized as phenolic and flavonoids, as depicted in Figure S1. Within, the constituents detected via HPLC-DAD analysis (Table S2), gallic acid, p-coumaric acid, ellagic acid, and trans-cinnamic acid have been discerned (Table S3).

The study conducted by Coutinho et al. (2023) reveals the detection of gallic acid and p-coumaric acid. It is noteworthy that the profile of the analyzed samples was distinct, as phenolic compounds considered in this study, such as caffeic acid, catechin, vanillic acid, ferulic acid, naringin, rutin, and quercetin, were not detected in the mentioned research. The researchers assessed the inhibitory potential of geopropolis against *C. albicans* and *S. aureus*, finding that geopropolis exhibits activity against both microorganisms, although it demonstrated lower efficacy against gram-negative bacteria, as observed in the present study.

Ferreira et al. (2019) obtained similar results when analyzing the chemical profile of geopropolis from various species of the *Melipona* genus, including *M. scutellaris*. Phenolics such as gallic acid and p-coumaric acid were identified.

Based on acknowledged robust antioxidant and antimicrobial attributes of phenolic compounds, these activities were examined for the extract of *M. scutellaris* geopropolis. In the assessment, the analyzed extract exhibited high antioxidant activity of the DPPH• free radical ( $EC_{50} = 11.50 \pm 0.41 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) comparable to quercetin and gallic acid standards were at  $3.71 \pm 0.26 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $1.41 \pm 0.04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively (Figure S2). This result is promising, as the lower the  $EC_{50}$ , the more active the sample.

Next, investigations delved into the antimicrobial potential of the *M. scutellaris* geopropolis extract was probed against microorganisms prevalent in the nasal and oral mucosa (Table S4 and Figure S3). The outcomes of minimal inhibitory concentration (MIC) assessments unveiled compelling trends. Notably, all gram-positive strains exhibited sensitivity to the extract's constituents, with MIC values  $\leq 1.0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , while the MIC against *P. aeruginosa* was  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$ . This divergence in MIC potentially arises from the structural attributes inherent to gram-negative bacteria, which hinders the permeability of the geopropolis into their cells (Peixoto et al., 2021; Trabulsi; Alterthum, 2015).

Further exploration of minimum bactericidal concentration (MBC) values yielded significant insights. Gram-positive strains, including *S. aureus*, *S. mutans*, and *S. oralis*, require high extract concentrations ( $> 10 \times \text{MIC}$  values) to reach bactericidal efficacy. In contrast, the extract exhibited pronounced activity against *S. salivarius* (MIC =  $1.0 \text{ mg.mL}^{-1}$  and MBC =  $1.0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) and notably against *S. mitis* (MIC =  $0.25 \text{ mg.mL}^{-1}$  and

MBC = 0.5 mg.mL<sup>-1</sup>). The MBC values close to MIC may suggest an efficient bactericidal mechanism of the extract against this *Streptococcus* species. This information is relevant because it is the first report on the geopropolis of *M. scutellaris* activity against *S. mitis*. Regarding the activity against yeasts *C. albicans* and *C. parapsilosis*, including strains resistant to fluconazole and amphotericin B, the MIC values ranged from 0.25 to 5.0 mg.mL<sup>-1</sup> (Table S4 and Figure S4). However, it is noteworthy that no fungicidal activity was observed.

Since four polyphenols have been identified (ellagic acid, gallic acid, trans-cinnamic acid, and p-coumaric acid), *in silico* studies were conducted to find potential macromolecular targets helpful in investigating the possible activity of these molecules. Based on the established cutoff points (Fit score > 2.0 and Normalized fit score > 0.5), 19 potential targets were identified for ellagic acid, and one potential target was found for gallic acid (Table S5). Notably, among the targets for gram-positive bacteria that ellagic acid can act upon, the L-lactate dehydrogenase 1 (LDH1) of *S. aureus* stands out (Figure S5). This enzyme catalyzes the conversion of lactate to pyruvate and plays a crucial role in bacterial energy metabolism. Furthermore, LDH1 is produced by *S. aureus* in response to several factors, including oxidative stress, the presence of antimicrobial agents, and cell invasion, which may contribute to the bacterium's virulence (Spahich, N. A *et al.*, 2016; Gosser, M. R. *et al.*, 2016).

While further studies are essential to confirm this hypothesis, particularly given the necessity to find other compounds, it is crucial to emphasize that ellagic acid appears as the most promising compound among those identified. In fact, several studies have proved the antimicrobial potential of ellagic acid against oral mucosa microorganisms. Loo *et al.* (2010) reported inhibitory effects of ellagic acid against the tested bacterial strains, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.125 to 8 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 2.3 EXPERIMENTAL

See supplementary material.

## 2.4 CONCLUSIONS

These findings enhance the value and potential use of geopropolis, thereby reinforcing the practice of meliponiculture. Culturing geopropolis-producing bees holds a significant socio-economic effect, particularly considering that meliponiculture stays underexplored and underutilized within the community. The collected data underscores



the bactericidal and fungistatic potential of geopropolis, making it a viable candidate for integration into products designed to manage the proliferation of the oral microbial population.

The *in vitro* results reinforced by *in silico* analysis indicate the antimicrobial potential of geopropolis against oral mucosal microorganisms. The unveiled chemical composition offers valuable preliminary insights into the intricate molecular composition of the studied geopropolis, thereby warranting the isolation and comprehensive characterization of the compounds present in this specific geopropolis. Furthermore, these outcomes encourage us to further phytochemical and biological investigations of geopropolis from different bee species.

Although previous studies described the mineral composition in resinous geopropolis, the present work introduces a distinct analytical context, aiming to evaluate the raw extract of geopropolis to detect the presence of potentially toxic metals in geopropolis extracts. This approach motivates the potential utilization of geopropolis for therapeutic and economic purposes.

## 2.5 ACKNOWLEDGMENTS:

We are grateful for the financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FASPEB), Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (CALC: 305950/2021-5).

## 2.6 DECLARATION OF INTEREST STATEMENT:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## REFERENCES

- Baumgardner, DJ. (2012). Soil-Related Bacterial and Fungal Infections. **Journal of the American Board of Family Medicine**, 25(5), 734-744. doi: 10.3122/jabfm.2012.05.110226.
- Bonsucesso, JS. et al. (2018). Metals in Geopropolis from Beehive of *Melipona scutellaris* in Urban Environments. **Science of the Total Environment**, 634(1), 687-694. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.022.

Brazil. (2013). Ministry of Health and National Health Surveillance Agency (ANVISA), Resolution RDC No. 42—Mercosur Technical Regulation on Maximum Limits for Inorganic Contaminants in Food, Ministry of Health, Brasília, Brazil.

Brennan, F. (2010). Characterization of Environmentally Persistent *Escherichia coli* Isolates Leached from an Irish Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(7), 2175–2180. doi: 10.1128/AEM.01944-0.

Carvalho Jr, RM et al. (2015). Determination of Metals in Brazilian Soils by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187, 535–544. doi: 10.1007/s10661-015-4769-y.

Coutinho, S et al. (2023). *Melipona scutellaris* Geopropolis: Chemical Composition and Bioactivity. **Microorganisms**, 11(11), 2779. doi: 10.3390/microorganisms11112779.

Eskova, EK et al. (2015). Content of Heavy Metals in Melliferous Vegetation, Bee Bodies, and Beekeeping Production. **Russian Agricultural Sciences**, 41(5), 396–398. doi: 10.3103/S1068367415050079.

Ferreira, B. L et al. (2019). Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. **Food Research International**, 126, 108683. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108683

Finger, D. et al. (2014). Propolis as an Indicator of Environmental Contamination by Metals. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 92, 259–264. doi: 10.1007/s00128-014-1199-4.

Franchin, M et al. (2012). Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases the Mechanical Inflammatory Hypernociception by Inhibiting the Production of IL-1b and TNF-a. **Journal of Ethnopharmacology**, 143, 709–715. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.040.

Jaffe, R. et al. (2015). Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PloS One**, 10(3), e0121157. doi: 10.1371/journal.pone.0121157.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf>>. Acesso em: 27 ago 2023.

Kowalska, JB. et al. (2018). Pollution Indices as Useful Tools for the Comprehensive Evaluation of the Degree of Soil Contamination—A Review. **Environmental Geochemistry and Health**, 40(6), 2395–2420. doi: 10.1007/s10653-018-0106-z.

Machado, BAS et al. (2020). Metal Content of Nutritional and Toxic Value in Different Types of Brazilian Propolis. **The Scientific World Journal**, 2020, 1-9. doi: 10.1155/2020/4395496.

Meda, A. et al. (2005). Determination of the Total Phenolic, Flavonoid and Proline Contents in Burkina Fasan Honey, as well as Their Radical Scavenging Activity. **Food Chemistry**, 91(3), 571–577. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.006.

- Peixoto, M et al. (2021). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Blends of Propolis Samples Collected in Different Years. **LWT - Food Science and Technology**, 145 (1), 111311. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111311.
- Pierini, GD, Pistonesi, MF, Di Nezio, MS, & Centuri3n, ME (2016). Bismuth Film Electrode with Graphite and Chemometric Tools for Simultaneous Determination of Heavy Metals in Propolis Samples. **Microchemical Journal**, 125, 266-272.
- Pizzorno, L. (2015). Nothing Boring About Boron. **Integrative Medicine**, 14(4), 35-48.
- Popov, BB et al. (2017). Assessment of Heavy Metals in Propolis and Soil from the Pelagonia Region, Republic of Macedonia. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, 36(1), 1-11. doi: 10.20450/mjce.2017.1004.
- Roman, A. (2010). Levels of Copper, Selenium, Lead, and Cadmium in Forager Bees. **Polish Journal of Environmental Studies**, 19(3), 663–669.
- Santos, CM et al. (2017). Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017, 8320804. doi: 10.1155/2017/8320804.
- Serna, J, Bergwitz, C. (2020). Importance of Dietary Phosphorus for Bone Metabolism and Healthy Aging. **Nutrients**, 12(10), 3001. doi: 10.3390/nu12103001.
- Shifaw, E. (2018). Review of Heavy Metals Pollution in China in Agricultural and Urban Soils. **Journal of Health & Pollution**, 8(18), 1-14. doi: 10.5696/2156-9614-8.18.180607.
- Spahich, NA. et al. (2016). Staphylococcus aureus Lactate- and Malate-Quinone Oxidoreductases Contribute to Nitric Oxide Resistance and Virulence. **Molecular Microbiology**, 100(5), 759–773. doi:10.1111/mmi.13347.
- Torres, AR. et al. (2018). Chemical Characterization, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Propolis Obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* Stingless Bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 51(6), 1-10. doi: 10.1590/1414-431X20187118.
- Verma, NP., Sinha, DB; Patry, A. S. (2017). Role of Microorganisms for the Sustainable Use of Soil Pollution Abutment in Agriculture Lands. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 6(11), 335-350. doi: 10.20546/ijcmas.2017.611.038

## 2.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Analyzing Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Geopropolis from *Melipona scutellaris*: HPLC-DAD and *In Vitro/In Silico* Investigations

Jéssica Lima de Souza<sup>a</sup>; Adrienne Bastos Ferreira<sup>b</sup>; Elinalva Maciel Paulo<sup>c</sup>; Clayton Alves Queiroz<sup>d</sup>; Carlos Alfredo Lopes de Carvalho<sup>e</sup>; Fábio de Souza Dias<sup>f</sup>; Anibal de Freitas Santos Junior<sup>g</sup>; Hugo Neves Brandão<sup>h\*</sup>; Humberto Fonseca de Freitas<sup>i</sup>

- j. Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (jessica\_uefs2011@hotmail.com) <https://orcid.org/0000-0001-5614-5338>
- k. Department of Biological Sciences, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (adrianebastos@gmail.com) <https://orcid.org/0000-0001-8620-4351>
- l. Department of Biological Sciences, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (elinalvamaciel@yahoo.com.br) <https://orcid.org/0000-0003-3630-3284>
- m. Department of Exact Sciences, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (cleiroz@gmail.com) <https://orcid.org/0000-0002-3242-3230>
- n. Center for Agrarian, Environmental and Biological Sciences of the Federal University of Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. (calfredo@ufrb.edu.br) <https://orcid.org/0000-0002-3306-3003>
- o. Science, Technology and Innovation Institute, Federal University of Bahia, Camaçari, BA 42809-000, Brazil. (fabiosdias@yahoo.com.br) <https://orcid.org/0000-0003-2279-0691>
- p. Department of Life Sciences, State University of Bahia, Salvador, Brazil. (prof.anibal@ig.com.br) <https://orcid.org/0000-0002-3022-0771>
- q. Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (hugo@uefs.br) <https://orcid.org/0000-0001-5198-5039>
- r. Department of Health, State University of Feira de Santana, Bahia, Brazil. (hffreitas@uefs.br) <https://orcid.org/0000-0003-3040-9694>

### Abstract

This study evaluated the chemical profile and antimicrobial activity, as well as the presence of potentially toxic elements in geopropolis extracts produced by *Melipona scutellaris* in the Recôncavo region of Bahia, Brazil. It was found that the major chemical compounds belong to the class of phenolic compounds, with emphasis on the presence of gallic acid. In this study, no potentially toxic elements were found in the analyzed geopropolis. Regarding the antimicrobial potential, gram-positive bacteria were susceptible to the action of geopropolis extract at concentrations of 0.25 to 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>, highlighting its microbiological activity against *Streptococcus mitis* (ATCC 00456) and *Candida albicans* (CCMB 251). Thus, this geopropolis extract can be used mainly as a bacteriostatic and not as a bactericide. Our results suggest the potential for economic and therapeutic use of *M. scutellaris* geopropolis, adding value to one of the meliponiculture products.

**Keywords:** Meliponines; toxic metals; antimicrobial action.

\* Corresponding author (hugo@uefs.br)

### List of Supporting Information (Figure)

**Figure S1.** Chromatogram of geopropolis extract collected in Cruz das Almas, (320nm).

**Figure S2.** Curve generated to calculate effective concentration for capturing 50% of free radicals ( $EC_{50}$ ) and confidence interval of antioxidant activity by DPPH•.

**Figure S3.** Analysis system used to determine the minimum inhibitory concentration, blue wells indicate bacterial inhibition, pink wells indicate bacterial growth.

**Figure S4.** Yeast growth from wells, containing concentrations of 150, 100, 50 and 25  $mg.mL^{-1}$ , yeast growth show fungistatic action. Números 1, 2, 3 e 4 representam as concentrações 150, 100, 50 e 25  $mg.mL^{-1}$ , respectivamente.

**Figure S5.** Positioning of Ellagic acid into the Lactate dehydrogenase 1 of *S. aureus*, based on PharmMapper server prediction. Yellow dashes stand for distance between ellagic atoms and residues of enzyme. White, blue, and red sticks stand for carbon, nitrogen, and oxygen atoms, respectively.

### List of Supporting Information (Table)

**Table S1.** Chemical elements found by MIP-OES in geopropolis samples collected in the municipality of Cruz das Almas-BA.

**Table S2.** Chemical profile analysis performed by high performance liquid chromatography with the retention time and absorption in UV-vis region.

**Table S3.** Table of Quantification by HPLC-DAD and Validation Results.

**Table S4.** Microbiological activity of *Melipona scutellaris* geopropolis from the Recôncavo region of Bahia, expressed by the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal and fungicidal concentration.

**Table S5.** Target detected by PharmMapper server for the ellagic acid, gallic acid, trans-cinnamic acid, and p-coumaric acid with their Fit scores and Normalized fit scores.

## **S1. EXPERIMENTAL**

### **2.8.1 1.1 Obtaining and extracting geopropolis**

The material was collected in the municipality of Cruz das Almas (Latitude: 12°40'39"S, Longitude: 39°06'23" W), Recôncavo region, State of Bahia, Brazil, in October 2017. The crude extract was obtained through extraction by reflux in 70% ethyl alcohol at 80 °C for 60 min.

### **2.8.2 Determination of total phenolic and flavonoid contents**

Total phenolics were quantified using the Folin-Ciocalteu (FC-Cromolyn) method described by Kuppusamy et al. (2018) with slight modifications. FC and sodium carbonate solutions were prepared in distilled water at proportions of 10% and 7.5%, respectively. A concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> of geopropolis extract was used, and the gallic acid standard curve was constructed in the range of 0.01 to 0.17 mg.mL<sup>-1</sup>. Readings were performed at  $\lambda = 760$  nm using the Multiskan GO microplate reader. The total content of phenolic compounds was expressed in milligrams of gallic acid equivalent per 100 g of extract (mg GAE.100g<sup>-1</sup>) (Bernal et al., 2017). Total flavonoid content was determined using the methodology described by Meda et al. (2009). Methanolic solutions of geopropolis extracts were used at concentration of 500 µg.mL<sup>-1</sup>, and the quercetin standard was employed to build a calibration curve (0.005 to 0.035 mg.mL<sup>-1</sup>). Total flavonoid content was expressed in mg of quercetin equivalent per 100 g of extract (mgQEQ.100g<sup>-1</sup>). Readings were performed at  $\lambda = 415$ nm using the Multiskan GO microplate reader.

### **2.8.3 Evaluation of potentially toxic elements and macronutrients**

The contents of the elements aluminum (Al), boron (B), barium (Ba), calcium (Ca), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), potassium (K), sodium (Na), nickel (Ni), phosphorus (P), lead (Pb), silicon (Si), strontium (Sr), vanadium (V) and zinc (Zn) were quantified by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES). Approximately 0.25 g of the extract was subjected to assisted digestion directly in a closed microwave container, at the presence of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 7.0 mL of HNO<sub>3</sub> to the system. The analyses were performed in triplicate in a commercial high-pressure microwave oven (Milestone Ethos 1600 Microwave Labstation, Sorisole,

Italy) running at 2450 Hz and 900 W of power output. The microwave digestion system was equipped with trifluoromethoxy containers (100 mL). The maximum operating temperature, power, and pressure were 180 °C, 900 W, and 100 bar, respectively, in 30 min. The MIP-OES instrumental parameters were used according to the manufacturer's recommendations. An Agilent SPS 3 automatic sampler introduced the samples through a glass cyclonic double-pass spray chamber and an inert OneNeb nebulizer. A model 4107 nitrogen generator (Agilent Technologies) was used as a gas source for plasma. The peristaltic pump was programmed to operate at 15 rpm. The stabilization time was 15 seconds, and the integration time was 3 seconds. The background signal and two critical operating parameters (nebulizer flow and observation position in the plasma) were automatically corrected and optimized with the MP Expert software (Agilent Technologies). The emission lines (nm) were: Al (396.152); Ba (455.403); Cd (226.502); Co (340.512); Cr (425.433); Cu (324.754); Fe (371.993); Pb (283.305); Ni (352.454); Sr (407.771); V (438.997); Zn (213.857); Ca (317.933); K (769.897); Na (330.237); B (249.772); Si (251.611) and Mg (518.360).

#### **2.8.4 Chromatographic profile analysis by HPLC-DAD**

The Thermo Scientific Ultimate 3000 chromatograph, Software version 7.2.8, composed of automatic injector and diode array detector (DAD) for chemical profile analysis, the LiChroCART Purospher StaR® RP18-e column (250 mm x 4.6 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmstadt, Germany) was used as the stationary phase and the elution gradient was 100% methanol (Sigma-Aldrich®) and 1% acetic acid (Vetec®). The total analysis time was 40 min, at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> and 20 µL of injection volume. The separation system consisted of an elution gradient ranging from 3 to 80% of the organic phase between 0-40 min and 80% to 100% between 40-45 min. The method underwent validation following the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH) (ICH, 1995a; ICH, 1995b). The parameters assessed included range, selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection (LOD), limit of quantification (LOQ). The chromatograms were monitored between wavelengths from 200 to 600 nm, with acquisition at 280 nm. Standards of phenolic compounds and flavonoids already described in the literature as propolis markers were used: catechin (Sigma-Aldrich), chlorogenic acid (Sigma-Aldrich), caffeic acid (Sigma-Aldrich), gallic

acid (Sigma-Aldrich), rutin (Sigma-Aldrich), Artepillin C (Wako), vanillin (Sigma-Aldrich), naringenin (Sigma-Aldrich) and p-coumaric acid (Sigma-Aldrich), ellagic acid (Sigma-Aldrich), tannic acid (Sigma-Aldrich) and trans-cinnamic acid (Sigma-Aldrich). Calibration curves were created for ellagic acid, p-coumaric acid, gallic acid and trans-cinnamic acid. The geopropolis extract was analyzed at a concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **2.8.5 Evaluation of antioxidant activity through the scavenging of free radical 1,1-. diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•)**

The evaluation of antioxidant activity was performed using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method, proposed by Malterud (1993). Initially, a concentrated DPPH• solution was prepared by dissolving 45mg of DPPH in 100 mL of methanol. From this concentrated DPPH• solution, a 10 mL aliquot was used to prepare a new solution at a concentration of 45.00 µg.mL<sup>-1</sup>, and both solutions were stored under refrigeration and protected from light. For this analysis, the extract concentrations varied from 111.0 µg.mL<sup>-1</sup> to 5.15 µg.mL<sup>-1</sup>, while the quercetin and gallic acid standards ranged from 0.34 µg.mL<sup>-1</sup> to 6.87 µg.mL<sup>-1</sup>. As a positive control for the reaction, propyl gallate was used at a concentration of 85.99 µg.mL<sup>-1</sup>. To conduct the assay, a 4.2 µL aliquot of each sample was mixed with 240 µL of the DPPH• solution, following the same procedure for the standard. The reaction was analyzed using the Multiskan GO Skanit software 3.2, with readings taken at a wavelength ( $\lambda$ ) of 517 nm. The first reading was taken with the microplate having only the DPPH• solution, and the second reading was performed after 30 minutes of reaction. All tests were conducted in triplicate at room temperature and protected from light. To determine the antioxidant potential of the extracts, equation 1 was used, and the concentration required to stabilize 50% of the radicals was obtained by correlating the inhibition percentage and concentration through graph construction.

#### **2.8.6 Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC)**

The microorganisms tested were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 00402), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 00386), *Streptococcus mutans* (ATCC 00456), *Streptococcus mitis* (ATCC 00456), *Streptococcus oralis* (ATCC 00477), *Streptococcus salivarius* (ATCC 00457) and *Candida albicans* (ATCC 40278), all provided by the National Institute of Quality Control in Health (INCQS/FIOCRUZ), located in Rio de



Janeiro. The strains of *Candida albicans* (CCMB 251, CCMB 288, and CCMB 265) resistant to fluconazole and amphotericin B, were provided by the Bahia Microorganism Culture Collection Bank (CCMB/UEFS), found in the municipality of Feira de Santana. Lyophilized bacterial and fungal strains were reactivated in the BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO™) agar medium for 24 h at  $35 \pm 2$  °C. Microbial turbidity suspensions were prepared using the 0.5 McFarland scale as standard (equivalent to  $1.5 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>).

The extract was solubilized in 10% dimethyl sulfoxide (Vetec) at concentrations ranging from 0,005 to 150 mg.mL<sup>-1</sup>. The microbial suspension (16 µL) was added to 67 µL of BHI medium and 67 µL of the extract in a 96-well microplate. After 24 h incubation at  $35 \pm 2$  °C, 50 µL of the following reagents were added to the wells: 0.01% resazurin (VETEC) for bacteria and 0.25% tetrazolium (VETEC) for yeasts, after 48 h. The MIC endpoints were colorimetrically determined for the triplicate assays. Chloramphenicol at 80 µg.mL<sup>-1</sup> and nystatin at 67,000 IU.mL<sup>-1</sup> concentrations were used as positive controls for bacterial and yeast strains, respectively.

### **2.8.7 Minimum bactericidal concentration and minimum fungicidal concentration (MBC and MFC)**

The solutions assessed in the MIC step that did not show colorimetric reaction with resazurin and tetrazolium reagents were sown in BHI agar. Next, the bacteria were incubated for 24 h at  $35 \pm 2$  °C, and yeast strains were incubated for 48 h at  $35 \pm 2$  °C.

### **2.8.8 Macromolecular Target Identification using Pharmacophore Mapping Approach**

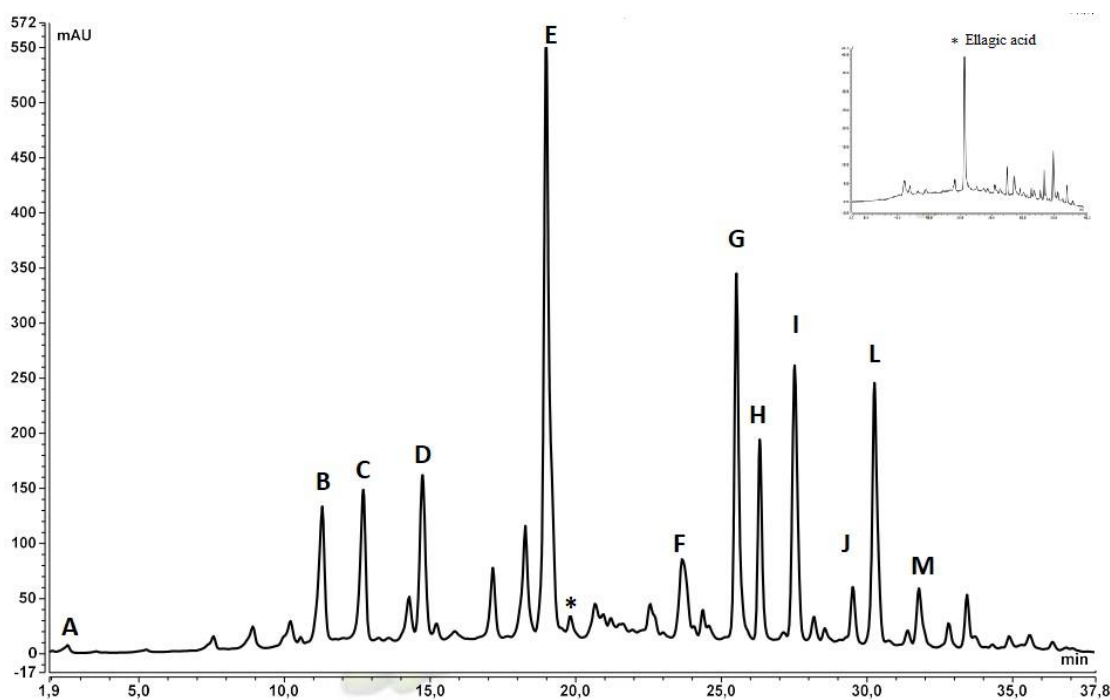
Following the method applied by Gusmão et al (2021), PharmMapper server ([www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/](http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/)) was used for target identification by employing pharmacophore mapping approach based on receptor structure. [14,15,34] Thus, the server superposed the polyphenols structures within about 53,000 receptor-based pharmacophore models previously calculated from TargetBank, DrugBank, BindingDB, and PDTD databases. The polyphenols “fit score” matching to each pharmacophore was first calculated and then every fit score of a specific pharmacophore was compared to the fit score matrix to measure its significance level among all the scores of the pharmacophore (Normalized fit score). Targets with a fit score <2 or normalized fit score < 0 were automatically

discarded. The targets with fit score  $> 2$  and normalized fit score  $> 0,5$  were analyzed. The targets identified guided the choice of *in vitro* test evaluation.

**Table 2. 1** - Chemical elements found by MIP-OES in geopropolis samples collected in the municipality of Cruz das Almas-BA.

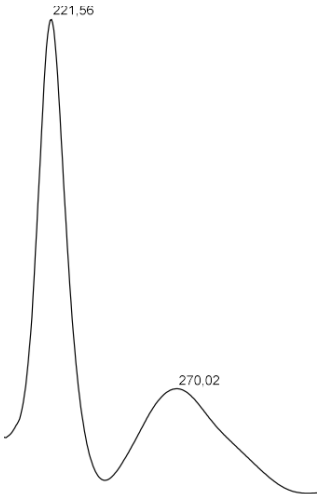
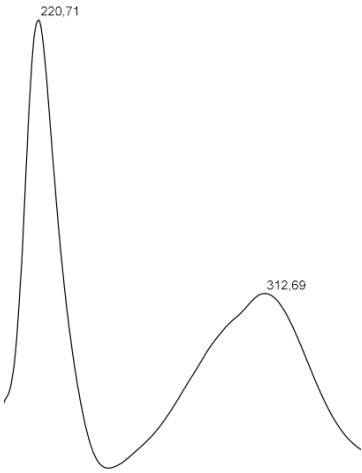
| Element | Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|---------|----------------------------------------|
| Si      | $3.80 \pm 0.70$                        |
| B       | $20.40 \pm 0.56$                       |
| Ca      | $195.31 \pm 0.88$                      |
| Na      | $9.02 \pm 2.06$                        |
| P       | $1576.20 \pm 43.40$                    |

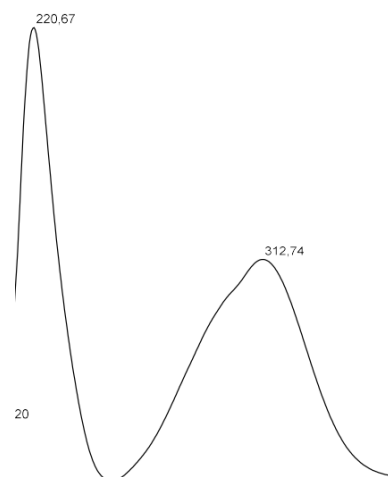
Silicon (Si); Boron (B); Calcium (Ca); Sodium (Na); Phosphorus (P)  
Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (MIP-OES)



**Figure 2. 1** Chromatogram of geopropolis extract collected in Cruz das Almas (320nm).  
\*The chromatogram of ellagic acid is presented at the wavelength of maximum absorption for the sample (380 nm).

**Table 2.2** - Chemical profile analysis performed by high performance liquid chromatography with the retention time and absorption in UV-vis region.

| Detected substances    | Retention time (min) | Peak areas (300 nm) | Relative area (%) | Absorption 300nm                                                                      |
|------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A (Gallic acid)</b> | 2,42                 | 21,53               | 1,76              |    |
|                        |                      |                     |                   |                                                                                       |
| <b>B</b>               | 11,29                | 33,53               | 2,74              |  |
|                        |                      |                     |                   |                                                                                       |
| <b>C</b>               | 12,707               | 33,93               | 2,78              |                                                                                       |



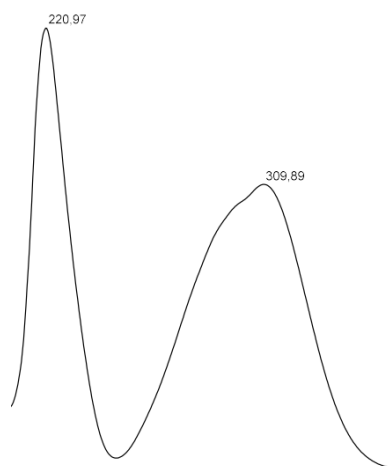
---

**D (p-coumaric acid)**

14,73

43,70

3,58



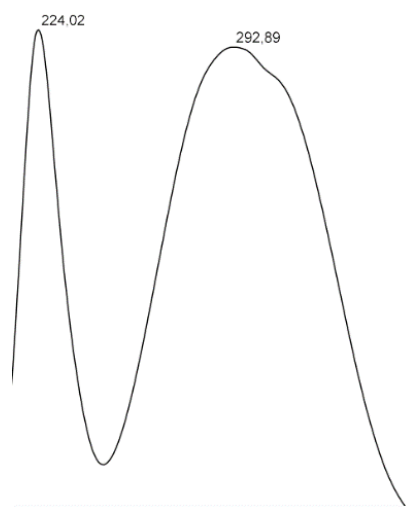
---

**E**

18,98

133,44

10,92

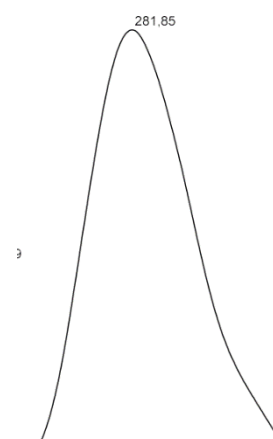


**F (Trans-cinnamic acid)**

23,78

79,77

6,53

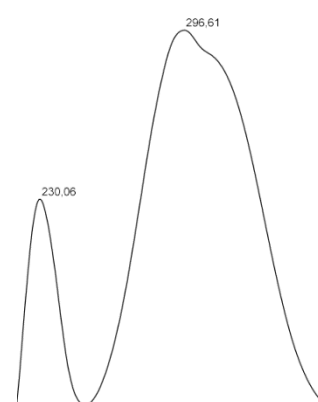


**G**

25,52

84,38

6,91

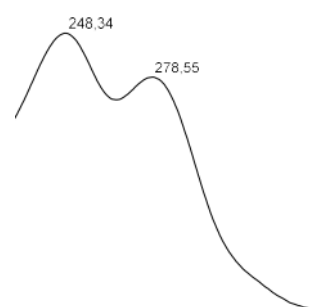


**H**

26,32

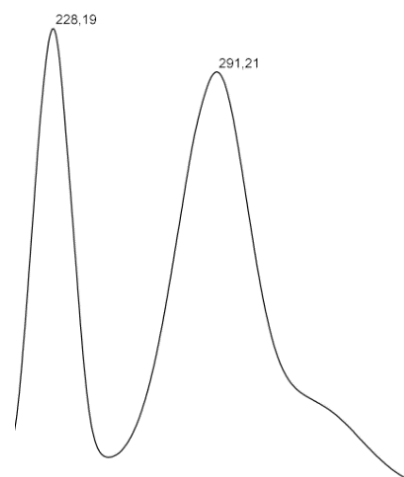
33,90

2,77



---

|          |       |        |       |
|----------|-------|--------|-------|
| <b>I</b> | 27,51 | 148,48 | 12,15 |
|----------|-------|--------|-------|



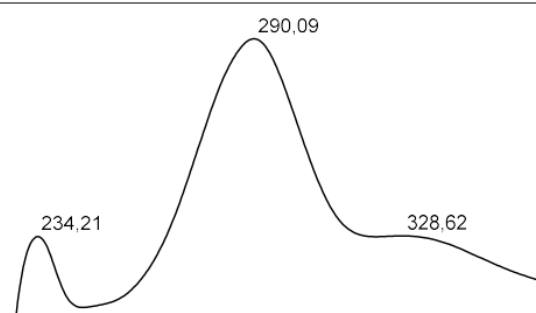
---

|          |       |       |      |
|----------|-------|-------|------|
| <b>J</b> | 30,25 | 72,15 | 5,91 |
|----------|-------|-------|------|



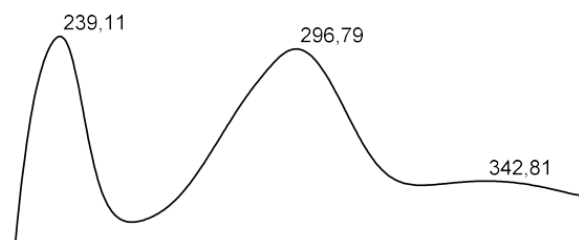
---

|          |       |       |      |
|----------|-------|-------|------|
| <b>L</b> | 31,78 | 36,57 | 2,99 |
|----------|-------|-------|------|

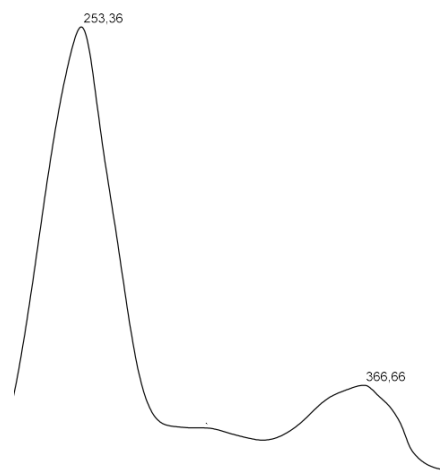


---

|          |       |       |      |
|----------|-------|-------|------|
| <b>M</b> | 33,43 | 36,81 | 3,01 |
|----------|-------|-------|------|



\*(Ellagic acid)      20,64      9,41      0,77

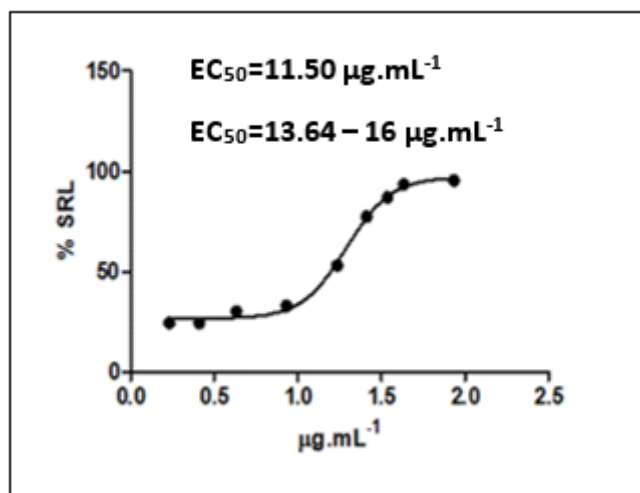


Relative percentage obtained from a total area of 1221.8560 mU.min<sup>-1</sup>.

\*The chromatogram of ellagic acid is presented at the wavelength of maximum absorption for the sample (380 nm).

**Table 2. 3** - Table of Quantification by HPLC-DAD and Validation Results.

| Quantified substances | Concentration (µg.mg <sup>-1</sup> ) | Results for the validation of the quantification method |               |                                        |                                             |                             |                    |
|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
|                       |                                      | Accuracy (%)                                            | Precision (%) | Detection limit (µg.mL <sup>-1</sup> ) | Quantification limit (µg.mL <sup>-1</sup> ) | Linearity (r <sup>2</sup> ) | Linear equation    |
| Gallic acid           | 10.65 ± 0.67                         | 90.57-97.10                                             | 0.42-1.42     | 2.09                                   | 6.96                                        | 0.99                        | y = 0.457x - 1.880 |
| p-coumaric acid       | 2.60 ± 0.01                          | 96.09 - 106.08                                          | 0.60- 2.35    | 1.74                                   | 5.80                                        | 0.99                        | y = 1.397x - 2.149 |
| Trans-cinnamic acid   | 8.05 ± 0.19                          | 98.23-101.24                                            | 0.35-1.91     | 2.54                                   | 8.46                                        | 0.99                        | y = 1.406x + 4.045 |
| Ellagic acid          | 10.83 ± 0.67                         | 95.55-106.69                                            | 0.95-1.72     | 2.23                                   | 7.43                                        | 0.99                        | y = 0.097x - 0.659 |



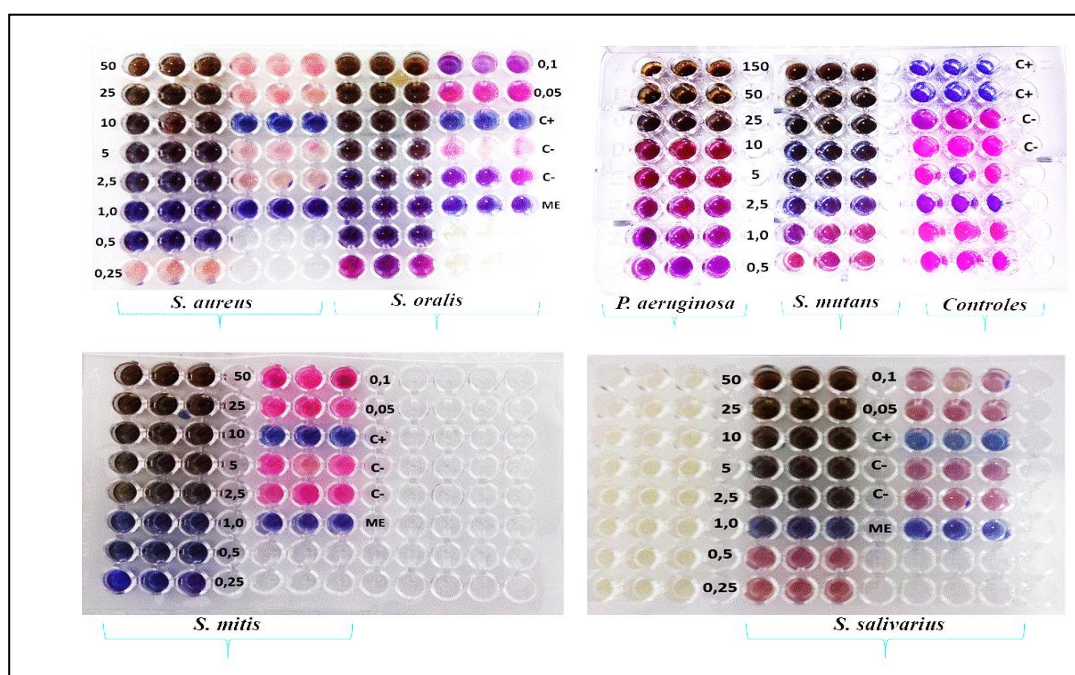
**Figure 2.2-** Curve generated to calculate effective concentration for capturing 50% of free radicals ( $\text{EC}_{50}$ ) and confidence interval of antioxidant activity by DPPH•.

**Table 2. 4 -** Microbiological activity of *Melipona scutellaris* geopropolis from the Recôncavo region of Bahia, expressed by the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal and fungicidal concentration.

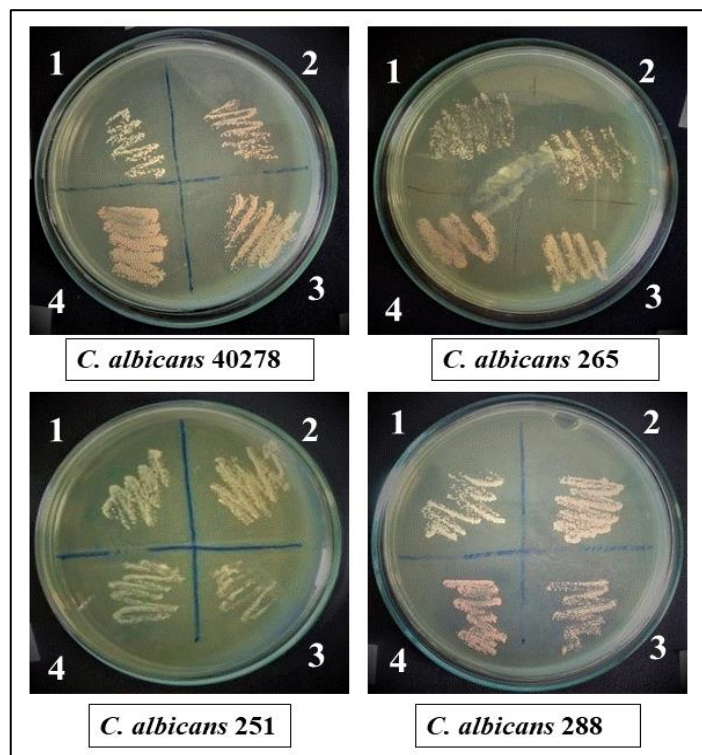
| BACTERIA                          | MIC (mg.mL <sup>-1</sup> ) | MBC (mg.mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>S. aureus</i> (ATCC 00402)     | 0.5                        | 10.0                       |
| <i>S. mutans</i> (ATCC 00456)     | 2.5                        | 50.0                       |
| <i>S. oralis</i> (ATCC 00477)     | 0.5                        | 100.0                      |
| <i>S. mitis</i> (ATCC 00456)      | 0.25                       | 0.5                        |
| <i>S. salivarius</i> (ATCC 00457) | 1.0                        | 1.0                        |
| <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 00386) | 25.0                       | 50.0                       |
| FUNGUS                            | MIC (mg.mL <sup>-1</sup> ) | MFC (mg.mL <sup>-1</sup> ) |
| <i>C. albicans</i> (ATCC 40278)   | 1.0                        | NF                         |
| <i>C. parapsilosis</i> (CCMB 288) | 5.0                        | NF                         |
| <i>C. albicans</i> (CCMB 265)     | 1.0                        | NF                         |
| <i>C. albicans</i> (CCMB 251)     | 0.25                       | NF                         |

NF (extracts showed no fungicidal action) MIC (Minimum Inhibitory Concentration)  
MBC (Minimum Bactericidal Concentration) MFC (Minimum Fungicidal Concentration)  
ATCC (American Type Culture Collection) CCMB (Brazilian Microbial Collections Center)





**Figure 2.3** Analysis system used to determine the minimum inhibitory concentration, blue wells indicate bacterial inhibition, pink wells indicate bacterial growth.

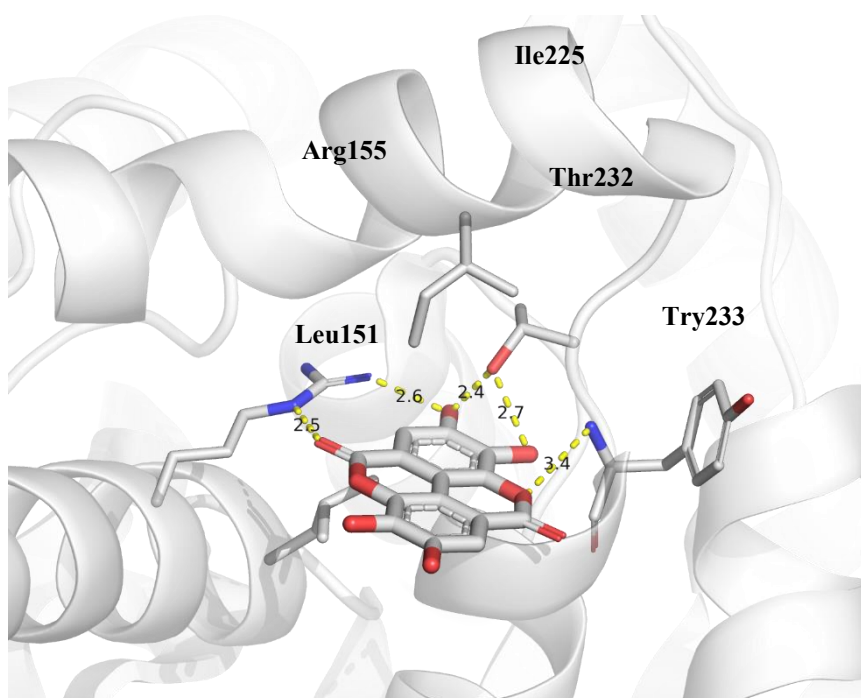


**Figure 2.4** - Yeast growth from wells, containing concentrations of 150 (1), 100 (2), 50 (3) and 25 (4) mg.mL<sup>-1</sup>, yeast growth show fungistatic action.

**Table 2. 5** - Target detected by PharmMapper server for the ellagic acid, gallic acid, trans-cinnamic acid, and p-coumaric acid with their Fit scores and Normalized fit scores.

| Ellagic acid        |                                                                  |                                      |           |                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------------------|
| PDB ID              | Target name                                                      | Organism                             | Fit score | Normalized fit score |
| 1CG8                | Hemoglobin subunit alpha                                         | <i>Homo sapiens</i>                  | 9.78      | 0.65                 |
| 2YSW                | 3-dehydroquinate dehydratase                                     | <i>Aquifex aeolicus</i>              | 5.00      | 0.62                 |
| 1GM6                | Salivary lipocalin                                               | <i>Sus scrofa</i>                    | 3.00      | 0.60                 |
| 1D7C                | Cellobiose dehydrogenase                                         | <i>Phanerodontia chrysosporium</i>   | 3.58      | 0.60                 |
| 3D0O                | L-lactate dehydrogenase 1                                        | <i>Staphylococcus aureus</i>         | 2.92      | 0.58                 |
| 3GH8                | Iodotyrosine dehalogenase 1                                      | <i>Mus musculus</i>                  | 2.92      | 0.58                 |
| 1ONF                | Glutathione reductase                                            | <i>Plasmodium falciparum</i>         | 2.91      | 0.58                 |
| 1BSL                | Alkanal monooxygenase beta chain                                 | <i>Vibrio harveyi</i>                | 2.89      | 0.58                 |
| 1LHS                | Myoglobin                                                        | <i>Caretta caretta</i>               | 3.98      | 0.57                 |
| 2BJH                | Feruloyl esterase A                                              | <i>Aspergillus niger</i>             | 3.97      | 0.57                 |
| 1WH0                | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19                         | <i>Homo sapiens</i>                  | 3.29      | 0.55                 |
| 3ECH                | Multidrug resistance operon repressor                            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | 3.26      | 0.54                 |
| 1O9K                | Transcription factor E2F1                                        | <i>Homo sapiens</i>                  | 2.70      | 0.54                 |
| 1AJ8                | Citrate synthase                                                 | <i>Pyrococcus furiosus</i>           | 3.77      | 0.54                 |
| 1Y64                | Actin, alpha skeletal muscle                                     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      | 4.22      | 0.53                 |
| 2BSK                | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9     | <i>Homo sapiens</i>                  | 4.10      | 0.51                 |
| 1PHN                | C-phycoerythrin alpha chain                                      | <i>Cyanidium caldarium</i>           | 2.00      | 0.50                 |
| 1OPG                | Ig gamma-1 chain C region secreted form                          | <i>Homo sapiens</i>                  | 3.00      | 0.50                 |
| 1X65                | Cold shock domain-containing protein E1                          | <i>Homo sapiens</i>                  | 2.99      | 0.50                 |
| Trans-cinnamic acid |                                                                  |                                      |           |                      |
| PDB ID              | Target name                                                      | Organism                             | Fit score | Normalized fit score |
| 2EJV                | L-threonine 3-dehydrogenase                                      | <i>Thermus thermophilus</i>          | 3.43      | 0.18                 |
| 2YS5                | ALK tyrosine kinase receptor                                     | <i>Homo sapiens</i>                  | 4.44      | 0.16                 |
| 2HG8                | Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial        | <i>Homo sapiens</i>                  | 2.44      | 0.12                 |
| 3CES                | tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme mnmG | <i>Escherichia coli</i>              | 2.07      | 0.07                 |
| 1S4F                | RNA-dependent RNA polymerase                                     | Bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1 | 2.34      | 0.04                 |
| Gallic acid         |                                                                  |                                      |           |                      |
| PDB ID              | Target name                                                      | Organism                             | Fit score | Normalized fit score |
| 2VFL                | AKAP18 delta central domain - CMP                                | <i>Homo sapiens</i>                  | 12.73     | 0.51                 |
| p-Coumaric acid     |                                                                  |                                      |           |                      |
| PDB ID              | Target name                                                      | Organism                             | Fit score | Normalized fit score |

|             |                                                           |                                          |      |      |
|-------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------|------|------|
| <b>1IYN</b> | Stromal ascorbate peroxidase                              | <i>Nicotiana tabacum</i>                 | 7.09 | 0.39 |
| <b>1FIY</b> | Phosphoenolpyruvate carboxylase                           | <i>Escherichia coli</i>                  | 3.91 | 0.39 |
| <b>1OUU</b> | Hemoglobin subunit alpha-1                                | <i>Oncorhynchus mykiss</i>               | 2.73 | 0.30 |
| <b>3PGH</b> | Prostaglandin G/H synthase 2                              | <i>Mus musculus</i>                      | 4.47 | 0.28 |
| <b>2ZFB</b> | Hemoglobin subunit alpha                                  | <i>Psittacula krameri</i>                | 2.24 | 0.25 |
| <b>2EA1</b> | Ribonuclease I                                            | <i>Escherichia coli</i>                  | 4.75 | 0.21 |
| <b>2D2N</b> | Extracellular giant hemoglobin major<br>globin subunit A1 | <i>Oligobranchia mashikoi</i>            | 2.64 | 0.20 |
| <b>1XF1</b> | C5a peptidase                                             | <i>Streptococcus<br/>pyogenes</i>        | 2.46 | 0.18 |
| <b>3GMI</b> | UPF0348 protein MJ0951                                    | <i>Methanocaldococcus<br/>jannaschii</i> | 2.67 | 0.17 |
| <b>1LPF</b> | Dihydrolipoyl dehydrogenase                               | <i>Pseudomonas<br/>fluorescens</i>       | 2.40 | 0.13 |
| <b>2YW2</b> | Phosphoribosylamine--glycine ligase                       | <i>Aquifex aeolicus</i>                  | 2.03 | 0.11 |
| <b>1NRX</b> | Pentafunctional AROM polypeptide                          | <i>Aspergillus nidulans</i>              | 2.12 | 0.06 |



**Figure 2.5** - Positioning of Ellagic acid into the Lactate dehydrogenase 1 of *S. aureus*, based on PharmMapper server prediction. Yellow dashes stand for distance between ellagic atoms and residues of enzyme. White, blue, and red sticks stand for carbon, nitrogen, and oxygen atoms, respectively

## **CAPÍTULO 3**

**Influência do intervalo de coleta sobre o rendimento, composição química e características polínicas da geoprópolis de *Melipona scutellaris* coletada em Mata de São João, BA.**

### **CAPÍTULO 3: Influência do intervalo de coleta sobre o rendimento, composição química e características polínicas da geoprópolis de *Melipona scutellaris* coletada em Mata de São João, BA.**

A palinologia desempenha um papel fundamental na classificação botânica das plantas que fornecem resinas vegetais para a produção de própolis e geoprópolis. A identificação botânica é crucial para padronizar os extratos, oferecendo informações sobre a origem botânica e permitindo a análise fitogeográfica das colmeias de *Melipona scutellaris*. Portanto, o propósito deste estudo é examinar a influência do período de colheita na composição química, sugerindo melhor período de coleta. Além disso, o estudo busca indicar as principais espécies vegetais visitadas pelas abelhas residentes no Meliponário Costa do Sauipe, localizado no município de Mata de São João, Bahia. A coleta das amostras ocorreu ao longo do período de janeiro a dezembro de 2021. A geoprópolis bruta passou por um processo de maceração em etanol a 70%, seguido por tratamento com anidrido acético e ácido sulfúrico para a preparação das lâminas. A identificação e análise da afinidade botânica dos tipos polínicos foram conduzidas utilizando atlas polínicos e lâminas arquivadas na palinoteca do LAMIV. A caracterização do perfil químico foi realizada por meio de testes espectrofotométricos e cromatografia líquida de alta eficiência. Um total de 84 tipos polínicos foram identificados, pertencentes a 31 famílias botânicas. Destaca-se a família Fabaceae, que apresentou 28 tipos polínicos distintos, entre eles o tipo polínico da *Mimosa caesalpinifolia*, presente ao longo de todos os meses do ano. O tipo polínico predominante nas amostras foi o *Myrcia* ssp. Com base nos tipos polínicos identificados, torna-se possível determinar as espécies vegetais visitadas pelas abelhas *M. scutellaris*, fornecendo informações sobre as principais fontes de coleta de resinas que compõem a geoprópolis.

**Palavras-chave:** Pólen. Mata Atlântica. Palinologia. Tipos polínicos

### 3.1 INTRODUÇÃO

A geoprópolis, um recurso de considerável valor econômico e potencial terapêutico, é encontrada nas colmeias de abelhas nativas sem ferrão. Essas abelhas elaboram a geoprópolis primordialmente a partir de resinas vegetais, que são mescladas com barro e depositadas em suas colmeias com diversas finalidades, incluindo a proteção contra insetos, formigas, bactérias e fungos. A seleção das áreas fitogeográficas onde as abelhas coletam as resinas influenciará tanto a composição química quanto a composição biológica da geoprópolis presente nas colmeias (INOUE et al., 2007). A espécie *M. scutellaris* é endêmica da região nordeste e é mais comumente avistada nas regiões de transição entre os biomas da Mata Atlântica e da Caatinga (VIANNA et al., 2013; MATOS; SANTOS, 2019).

A identificação botânica dos produtos de abelhas sem ferrão pode ser sugerida através do tipo polínico presente nos produtos dos meliponíneos. A presença de grãos de pólen pode ser resultado de dispersão pelo vento ou estar associada à atividade de coleta de resinas vegetais pelas próprias abelhas. Por conseguinte, cientistas utilizam essa metodologia para inferir as possíveis espécies de plantas que foram frequentadas pelas abelhas em seu processo de coleta de recursos (BARTH; LUZ, 2003; BARROS et al., 2013).

A prática científica conhecida como melissopalinologia é empregada para investigar detalhadamente as características dos grãos de pólen (SANTISTEBAN et al., 2019; MONTEIRO, 2017). Através dessa abordagem, é possível realizar análises comparativas das estruturas polínicas, o que leva à identificação das famílias e das espécies vegetais de origem (BARTH, 1989; MODRO et al., 2009; SAJWANE et al., 2014; PONNUCHAMY et al., 2014). Segundo Teixeira et al. (2003), existe uma relevância substancial em compreender a procedência botânica da própolis, pois essa informação permite aos apicultores e meliponicultores escolher com discernimento os locais ideais para instalar suas colmeias.

Os grãos de pólen são minúsculos e exibem uma diversidade de estruturas e dimensões. Eles são encontrados nas anteras das flores e desempenham o papel de órgãos reprodutores masculinos (BÔAS, 2012). Quando se aborda o tópico do pólen, é fundamental reconhecer a sua relevância na disseminação e preservação da biodiversidade nos ecossistemas brasileiros por meio dos processos de polinização.

A polinização é essencial para a reprodução das plantas, e seu potencial é de fundamental importância para manutenção do ecossistema. É realizada por diferentes agentes, dentre estes as abelhas são consideradas um dos principais polinizadores. As abelhas têm uma relação de dependência com os recursos florais ao longo de todas as fases de seu ciclo de vida, desde a fase adulta até larvas e pupas. Essa dependência está intrinsecamente relacionada à atividade involuntária de polinização realizada pelas abelhas, a qual desempenha um papel crucial na preservação da diversidade de plantas. Adicionalmente, a presença desses insetos pode servir como um indicativo de qualidade ambiental (BARBOSA et al., 2017).

A definição da origem fitogeográfica da resina é essencial na qualidade do produto produzido por meliponíneos, uma vez que, pode -se definir área de interesse para implementar meliponários com fitogeografia que favorecem bom rendimento e composição química para geoprópolis bruta (BARTH; LUZ, 2003). Além disso, através do estudo polínico pode -se identificar espécies que estão ameaçadas de extinção e que são polinizadas pelas abelhas sem ferrão.

O bioma Mata Atlântica é considerado diverso, com 95% de sua extensão pertencente ao território brasileiro, expandindo-se no interior do nordeste, Goiás, Mato Grosso do Sul estendendo-se para o Paraguai e Argentina. Sua diversidade é composta por espécies endêmicas. Apresenta níveis elevados de representatividade de espécies vegetais e animais em ameaças de extinção. Sendo um dos biomas, que mais sofre com expansão urbana não planejada (LOYOLA et al, 2014).

Deve-se destacar que a perda das áreas da Mata Atlântica, não coloca em risco apenas a biodiversidade floral, mas também estimula o declínio de polinizadores como as abelhas sem ferrão, dentre elas *M. Scutellaris* (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o espectro polínico da geoprópolis produzida por *M. scutellaris* coletadas no meliponário localizado na Mata de São João em períodos diferentes do ano (janeiro a dezembro), bem como, avaliar a interferência da sazonalidade na composição química das amostras coletadas.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 Coleta das amostras de geoprópolis de *M. scutellaris***



As amostras de geoprópolis produzidas pelas abelhas *M. scutellaris* foram coletadas a partir de cinco colmeias, seguindo um ponto de coleta estabelecido que permaneceu constante ao longo de todos os meses, durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2021. A coleta foi realizada no final de cada mês, garantindo uma representação abrangente. A escolha do local de coleta foi baseada nas condições climáticas e na vegetação predominante da região, com o Meliponário Costa do Sauipe situado no município de Mata de São João, Bahia. Este meliponário está em proximidade com a Mata Atlântica do Litoral Norte da Bahia, conforme indicado na Figura 3.1.



**Figura 3.1** - Localização de coleta da geoprópolis em Mata de São João- BA

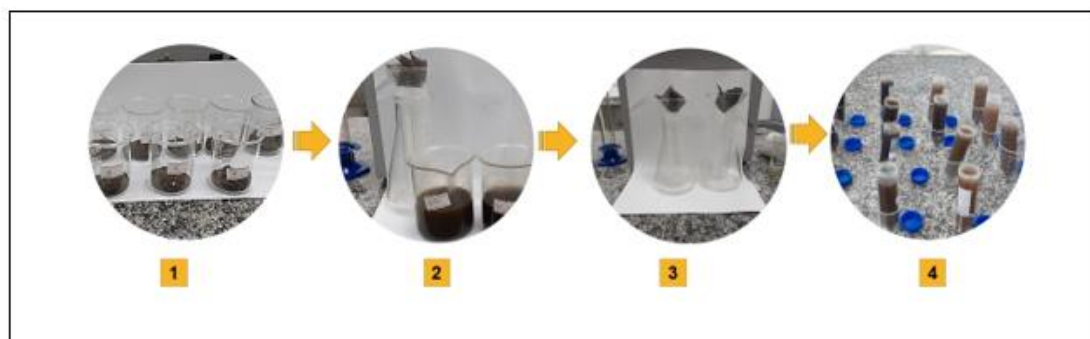
### 3.2.2 Preparo de amostras de geoprópolis para análise polínica

As amostras de geoprópolis passaram por um processo de pulverização e, posteriormente, foram pesadas, sendo utilizados 10 g de cada amostra. Em seguida, essas amostras foram solubilizadas em 50 mL de álcool etílico a 70% e submetidas a extração por ultrassom com duração de uma hora, com o propósito de separar os grãos de pólen dos componentes de resina e barro presentes na geoprópolis. As soluções alcoólicas resultantes foram submetidas a filtração através de malha de aço, a fim de remover as partículas de barro, e o filtrado foi posteriormente submetido a centrifugação por 10 minutos a velocidade de 2500 rotações por minuto. O líquido sobrenadante resultante desse processo foi descartado, como ilustrado na Figura 3.2.

Ao sedimento foi adicionada solução aquosa de hidróxido de potássio a 10% (15 mL) e levado a banho-maria à fervura por 10 min. Após ter esfriado a preparação foi



centrifugada para descarte adequado do líquido sobrenadante. O sedimento foi lavado em água destilada e submetido novamente a centrifugação (10 min, 2500 rpm). Ao sedimento lavado, foram adicionados 30 mL de ácido acético glacial, permanecendo em repouso por 2h. Foi realizada nova centrifugação e o sedimento residual submetido à acetólise de Erdtman (1960) em anidrido acético e ácido sulfúrico. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em água destilada, posteriormente foi adicionada solução de glicerina a 50%, método descrito por de Erdtman (1960) com algumas modificações (Matos et al. 2014).



1: etapa de pesagem; 2: Etapa de extração; 3: etapa de filtração; 4: etapa de centrifugação

**Figura 3.2** - Etapas de preparo da geoprópolis para análise polínica em microscópio

Após o processamento químico, as amostras foram montadas entre lâminas e lamínulas, em gelatina glicerinada, para posterior análise (SANTOS, 2011). Para a contagem dos grãos de pólen, foram estabelecidos parâmetros que exigiam a contagem de, no mínimo, 300 grãos de pólen por amostra de geoprópolis. A distribuição dos tipos polínicos entre as amostras foi avaliada seguindo o critério proposto por Jones & Bryant Jr. (1996) e foi categorizada em quatro grupos de frequência: muito frequente (>50%), frequente (20-50%), pouco frequente (10-20%) e raro (<10%).

A identificação e a determinação da afinidade botânica dos tipos polínicos foram realizadas mediante a comparação com imagens e descrições disponíveis em atlas polínicos e outras obras científicas pertinentes, bem como pela comparação com lâminas de referência armazenadas na palinoteca do Laboratório de Micromorfologia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAMIV).

### **3.2.3 Preparo dos extratos para análise química**

Foram utilizados 10 gramas das amostras de geoprópolis coletadas mensalmente, que foram posteriormente trituradas com auxílio de um almofariz e pistilo. Essas amostras foram submetidas a um processo de extração por maceração em etanol a 70%, com duração de 48 horas, sendo que o solvente do sistema de extração foi renovado a cada 24 horas. Após a etapa de extração, os extratos resultantes passaram por um processo de filtração utilizando papel de filtro e algodão. Por fim, os extratos foram submetidos a secagem em uma estufa com circulação de ar, mantida a uma temperatura de 50°C.

### **3.2.4 Determinação do teor total de flavonoides em extratos de geoprópolis por meio da espectrofotometria**

O teor de flavonoides totais foi determinado com base na metodologia descrita por Pothitirat e colaboradores (2009). Foram utilizadas soluções metanólicas dos extratos de geoprópolis em concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras com dificuldades de solubilização foram colocadas em banho de ultrassom por 5 minutos, para total solubilização. Inicialmente foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de cloreto de alumínio 2% e acrescido o mesmo volume das soluções metanólicas dos extratos. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão quercetina (QE). A reação dos extratos e padrão com a solução de cloreto de alumínio 2% foi avaliada após 10 min em Multiskan GO (Skinit software 3.2) com comprimento de onda de  $\lambda = 415\text{nm}$ . Para determinar a concentração de flavonoides, foi construída uma curva analítica utilizando quercetina em concentrações variando de 5,0 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As absorbâncias obtidas foram utilizadas para realizar uma regressão linear conforme demonstrado no Gráfico 1, resultando na equação da reta ( $y = 0,0142x - 0,031$ ;  $r^2 = 0,9991$ ). Essa equação foi aplicada para calcular a concentração das amostras, e os resultados foram expressos em miligramas de quercetina equivalente por 100 gramas de extrato ( $\text{mg QE}100\text{g}^{-1}$ ).

### **3.2.5 Quantificação do teor de fenólicos totais através da técnica espectrofotométrica**

A quantificação de fenólicos totais foi realizada através do método de FolinCiocalteu (FC) proposto por Oliveira (2009). Foram preparadas a solução-reagente FC 1:10 (v/v) em água destilada e a solução de carbonato de sódio a 7,5%. Além disso, foram preparadas soluções dos extratos em concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em tubos de

ensaio foram adicionados 0,5 mL das diferentes concentrações de ácido gálico e das soluções dos extratos de geoprópolis. Em seguida acrescentou-se 2,5 mL da solução-reagente de FC a cada tubo de ensaio. Após três minutos de incubação foram acrescentados 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5% aos tubos, aquecidos a 50°C, em banho-maria por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo, por 3 minutos.

A reação resultante, foi avaliada em Multiskan GO (Skinit software 3.2) em comprimento de onda de  $\lambda = 760$  nm. Após as análises, as absorbâncias de cada concentração (30 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do padrão ácido gálico, foram utilizadas para a construção da curva de calibração. A partir da equação da reta ( $y = 5,4713x + 0,0678$ ;  $r^2 = 0,9961$ ) foi possível avaliar o teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato ( $\text{mgEAG100g}^{-1}$ ).

### **3.2.6 Avaliação do perfil químico através da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE-DAD)**

O cromatógrafo empregado foi o Thermoscientific Ultimate 3000, com o software na versão 7.2.8, compreendendo um injetor automático e um detector de arranjo de diodo (DAD). Para a realização das análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD), foram utilizados solventes: metanol (SigmaAldrich®) de grau HPLC, ácido acético (Vetec®) de grau analítico e água purificada pelo sistema Milli-Q® com resistividade de 18,2 M $\Omega\text{cm}$ .

O processo cromatográfico foi conduzido em uma coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno) com partículas de 5 $\mu\text{m}$  (fabricada pela Merck, Darmstadt, Alemanha), complementada por uma pré-coluna adequada da Merck. A taxa de fluxo foi de 1  $\text{mLmin}^{-1}$ , e o volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ . Foram utilizados metano (Fase B) e ácido acético a 1% (Fase A) como eluentes. O processo de eluição dos solventes começou com 65% da fase móvel B e, ao longo do tempo, essa porcentagem foi progressivamente incrementada até atingir 100% de B. 3. A detecção foi realizada pelo DAD na faixa de aquisição de 210 a 400 nm.

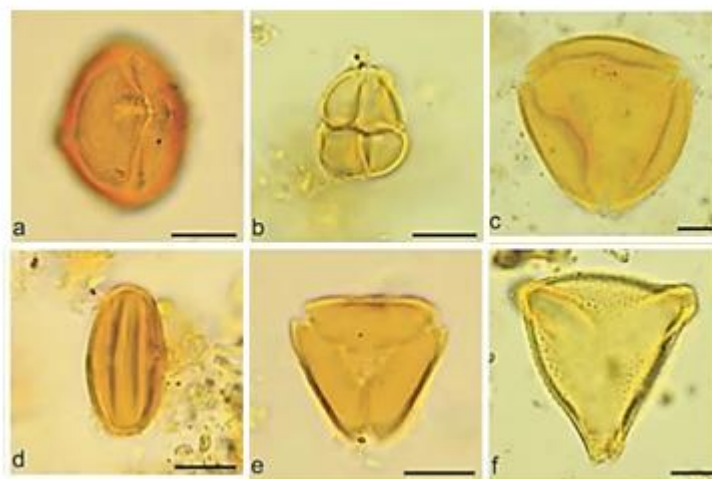
## **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.3.1 Estudo Fitogeográfico das Colônias de Abelhas de *Melipona scutellaris* em Mata de São João**

As abelhas têm a capacidade de buscar alimento em diversos ambientes, como florestas, plantações, áreas agrícolas e agroflorestais. As resinas coletadas por elas podem

ser oriundas de uma variedade de espécies vegetais. A análise palinológica se mostra fundamental para identificar quais espécies vegetais estão diretamente relacionadas à composição química da geoprópolis (OTIENO et al., 2015; BUENO et al., 2023). Isso permite a avaliação e a implementação de estratégias de manejo de plantas sazonais que possam influenciar positivamente na composição e, por conseguinte, nas propriedades biológicas do produto.

Os resultados das análises palinológicas das amostras de geoprópolis estão resumidos nas tabelas 3.1. Foram identificados 84 tipos de grãos de pólen, que pertencem a 31 famílias botânicas distintas. Em relação à diversidade de tipos polínicos, merece destaque a família Fabaceae, que apresentou 28 tipos de grãos de pólen. Dentre esses, vale mencionar a *Mimosa caesalpiniiifolia*, que se destacou por estar presente em todos os meses do ano, de janeiro a dezembro. A figura 3.3 mostra os principais tipos polínicos identificados na geoprópolis de *M. scutellaris*, coletada na Mata de São João.



**Figura 3.3** - Tipos polínicos registrados nas amostras de Geoprópolis produzidos em uma área de Mata Atlântica do litoral norte Bahia.

**a.** Anacardiaceae – *Schinus* (VE-sup.); **b.** Fabaceae – *Mimosa caesalpiniiifolia* (VG – c.o.); **c.** Malvaceae – *Apeiba* (VP – c.o.); **d.** Melastomataceae/Combretaceae (VE – c.o.); **e.** Myrtaceae – *Myrcia* (VP – c.o.); **f.** Sapindaceae – *Serjania* (VP – c.o.) Barra = 10µm; Legenda: VE – vista equatorial; VP – vista polar; VG – vista geral; c.o. – corte óptico; sup. - superfície.



|                |                                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Clusiaceae     | <i>Symphonia</i>                   | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 |
| Cyperaceae     | <i>Fymbristilis</i>                | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Cyperaceae     | <i>Oxycarium</i>                   | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Elaeocarpaceae |                                    | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| Eriocaulaceae  |                                    | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| Euphorbiaceae  | <i>Cf. P30xE19,5</i>               | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,2 | 1,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Euphorbiaceae  | <i>Ricinus comunis</i>             | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Euphorbiaceae  | <i>Sp. 1</i>                       | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Acacia</i>                      | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| Fabaceae       | <i>Adenantha</i>                   | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Anadenantha</i>                 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Chamaechrista asplenifolia</i>  | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Crotalaria</i>                  | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 2,6 | 3,3 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Crotalaria bahiensis</i>        | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Faboideae</i>                   | 0,0 | 1,0 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Machaerium</i>                  | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,3 | 3,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Mimosa caesalpinifolia</i>      | 7,0 | 2,0 | 2,2 | 2,9 | 2,1 | 0,6 | 2,6 | 3,5 | 4,9 | 1,6 | 0,3 | 2,9 |
| Fabaceae       | <i>Mimosa campicola</i>            | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Mimosa debilis</i>              | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Mimosa pudica/sensitiva</i>     | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,3 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Mimosa tenuiflora</i>           | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 |
| Fabaceae       | <i>Parapiptadenia</i>              | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 0,3 |
| Fabaceae       | <i>Parapiptadenia moniliformis</i> | 0,0 | 1,0 | 0,6 | 1,9 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Parapiptadenia zehntineri</i>   | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Fabaceae       | <i>Plathymenia</i>                 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 4,2 | 0,3 | 0,0 | 2,6 |

|                |                            |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Fabaceae       | <i>Schizolobium</i>        | 0,0  | 0,0  | 1,9  | 1,9  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Senna 1</i>             | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Senna2</i>              | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 4,9  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 7,6  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Sp 1</i>                | 0,6  | 2,3  | 1,3  | 0,6  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 2,6  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Sp 2</i>                | 0,0  | 0,0  | 0,9  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Sp 3</i>                | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 2,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Sp 5</i>                | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,7  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Sp 6</i>                | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,7  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Sp 7</i>                | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  |
| Fabaceae       | <i>Tahigali densiflora</i> | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Fabaceae       | <i>Tipo Stylosanthes</i>   | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 8,1  | 0,0  | 3,2  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Flacourtiaceae | <i>Casearia sylvestris</i> | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 1,6  |
| Lamiaceae      | <i>Hyptis</i>              | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,6  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Malpighiaceae  | <i>Byrsonima</i>           | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 1,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,6  |
| Malvaceae      | <i>Apeiba</i>              | 5,7  | 4,3  | 3,1  | 3,5  | 0,3  | 4,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 1,3  | 5,6  | 0,3  |
| Melast/Comb    |                            | 5,4  | 8,9  | 13,8 | 8,0  | 19,3 | 10,3 | 0,0  | 7,1  | 5,5  | 8,2  | 9,3  | 12,0 |
| Moraceae       | <i>Celtis</i>              | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Moraceae       | <i>Sp. 1</i>               | 0,0  | 0,7  | 0,6  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 15,8 | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Myrtaceae      | <i>Eucalyptus</i>          | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 1,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,6  | 0,6  | 0,3  | 1,3  | 0,0  |
| Myrtaceae      | <i>Myrcia</i>              | 75,9 | 69,7 | 67,6 | 66,6 | 71,6 | 65,7 | 55,9 | 58,7 | 60,4 | 62,0 | 52,3 | 65,3 |
| Piperaceae     | <i>Piper</i>               | 1,9  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  |
| Poaceae        |                            | 0,6  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,6  | 0,0  | 0,0  | 0,6  |
| Podocarpaceae  | <i>Podocarpus</i>          | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,3  |
| Proteaceae     | <i>Roupala</i>             | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,7  | 0,0  |
| Rubiaceae      | <i>Borreria</i>            | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 1,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 1,0  |
| Rubiaceae      | <i>Mitracarpus</i>         | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |
| Rubiaceae      | <i>Psycotria</i>           | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,3  | 0,0  | 0,0  |





A família Fabaceae, que se destacou na presente pesquisa, apresenta uma distribuição cosmopolita, compreendendo aproximadamente 650 gêneros e cerca de 18 mil espécies, destacando-se como uma das famílias mais extensas de Angiospermas e uma das mais relevantes do ponto de vista econômico. No território brasileiro, registram-se aproximadamente 200 gêneros e 1.500 espécies dessa família (CARVALHO, 2021). A literatura científica ressalta a relevância dessas espécies no que diz respeito ao potencial medicinal das plantas que compõem esta família (BRAGA et al., 2022).

Matos e Santos (2019) encontram 75 tipos polínicos para as amostras analisadas, dentre estes, a *Myrcia* I (Myrtaceae) como tipo polínico muito frequente para amostras da Mata Atlântica. Freitas e colaboradores (2010), identificaram 45 tipos polínicos em própolis marrom com maior distribuição para *Eucalyptus* (Myrtaceae). Matos e Santos (2016) encontram em amostras de própolis de Entre Rios, região norte da Bahia, um total de 115 tipos polínicos distribuídos em 40 famílias. Entretanto, a amostragem dos autores refere-se a própolis de *Apis mellifera* L, reconhecidamente abelha generalista, e correspondeu a um período de 24 meses, cobrindo todas as estações do ano, fatores que podem ter influenciado na maior representatividade da flora do local nas amostras estudadas. Estudo realizado por oliveira e colaboradores (2021) encontraram os tipos polínicos *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Myrcia* (Myrtaceae) *Cocos nucifera* (Arecaceae).

Ribeiro e colaboradores (2018) realizaram a análise dos espectros polínicos de 130 amostras de geoprópolis coletadas por *M. subnitida*, *M. seminigra*, *M. flavolineata* e *M. fasciculata*. Os tipos polínicos mais comuns encontrados na geoprópolis das quatro espécies de *Melipona* foram: *Attalea speciosa*, *Anacardium*, *Borreria verticillata*, *Baccharis*, *Clusia*, *Chamaecrista*, *Croton*, *Euterpe/Syagrus*, *Eucalyptus*, *Hyptis*, *Mauritia*, *Mimosa pudica*, *M. caesalpiniaefolia*, *Mouriri*, *Myrcia/Psidium*, *Protium* e *Symphonia globulifera*.

Nas amostras de própolis coletadas no estado do Rio de Janeiro, os tipos de pólen mais comuns foram *Eucalyptus* e *Mimosa caesalpiniiifolia*. Já na Bahia, destacaram-se *mimosa sensitiva* e *Cocos nucifera*. No estado de Alagoas, as amostras foram predominadas por *Borreria*, *Cocos nucifera* e *Mimosa sensitiva*. Por fim, no estado da Paraíba, observou-se uma alta presença de *Borreria* e *Symphonia globulifera* (BARTH et al., 2022).

Estudos realizados por Gostinski e colaboradores (2018) As espécies mais frequentes no espectro político da geoprópolis de *Melipona flavolineata* e *M. fasciculata*

foram Arecaceae (22%), Fabaceae (18,5%), Myrtaceae (9,6%), Melastomataceae (8,4%) e Lecythidaceae (6%). Bueno e colaboradores (2023) conduziram um estudo sobre a visitação floral de abelhas sem ferrão nos trópicos e subtropicais globais, constatando que as famílias mais frequentemente visitadas pelos Meliponíneos são Fabaceae, Asteraceae, Rubiaceae, Malvaceae, Lamiaceae, Euphorbiaceae, Arecaceae, Poaceae, Apocynaceae e Melastomataceae. Estudos indicam que as espécies de *Melipona* demonstram um padrão distintivo de forrageamento em comparação com outras abelhas sem ferrão. Essas espécies tendem a exibir preferências específicas por determinados grupos de plantas, o que sugere uma interação especializada entre as abelhas e seu ambiente floral (BUENO et al, 2023; MARTINS et al, 2023).

Os resultados indicam que a região fitogeográfica onde estão localizadas as colmeias de abelhas sem ferrão *M. scutellaris* em Mata de São João é heterogênea, apresentando uma diversidade de plantas disponíveis para o forrageamento da abelha. Estudos anteriores, como o de Otieno et al. (2015), destacaram as dificuldades enfrentadas pelas abelhas na busca por espécies vegetais para sua alimentação, especialmente devido à fragmentação e simplificação do habitat, que reduzem a disponibilidade de flores. Isso ressalta a importância da preservação dos recursos vegetais na região, especialmente considerando que a Mata Atlântica é um dos biomas mais afetados pelo desmatamento, aumentando o risco de extinção da *M. scutellaris*. Essa interação complexa entre as abelhas e os recursos genéticos vegetais destaca a necessidade de estudos e ações voltadas para a conservação e manejo adequado desses recursos (KENNEDY et al, 2013).

A *Mimosa caesalpiniiifolia* é uma árvore de pequeno porte endêmica do Brasil e faz parte do bioma Mata Atlântica (Figura 3.4) Essa espécie desempenha um papel importante em estratégias de reflorestamento e é frequentemente utilizada como cerca viva (PARENKY; ARAUJO; DRUMMOND, 2018). Este aspecto pode ter exercido influência na presença contínua dessa espécie ao longo de todos os meses do ano.

A espécie é notável por suas características melíferas e por ser amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças como hipertensão, bronquite e infecções de pele (RIBASKI et al, 2003; FERREIRA et al, 2021). Um estudo conduzido por Monção e colaboradores (2015) revelou que a composição da espécie é rica em ácidos fenólicos, flavonoides e ácidos triterpênicos pentacíclicos, com uma concentração significativa de ácido betulínico. Este estudo também demonstrou que essas amostras da espécie exibiram atividade contra linhagens celulares de câncer humano. Ferreira e colaboradores (2021), também identificaram efeitos positivos nos extratos do caule, que

são ricos em ácido betulínico, demonstrando uma capacidade de inibir a proliferação de células tumorais tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo* em *Mimosa caesalpiniiifolia* casos de Sarcoma. Silva e colaboradores (2012) investigaram o potencial terapêutico de *M. caesalpiniiifolia* e identificaram a presença de flavonoides, triterpenos, ácido gálico e catequinas. Além disso, eles relataram as propriedades antimicrobianas e antioxidantes da planta. Azevedo e colaboradores (2012) também observaram o potencial antimicrobiano da casca desta espécie



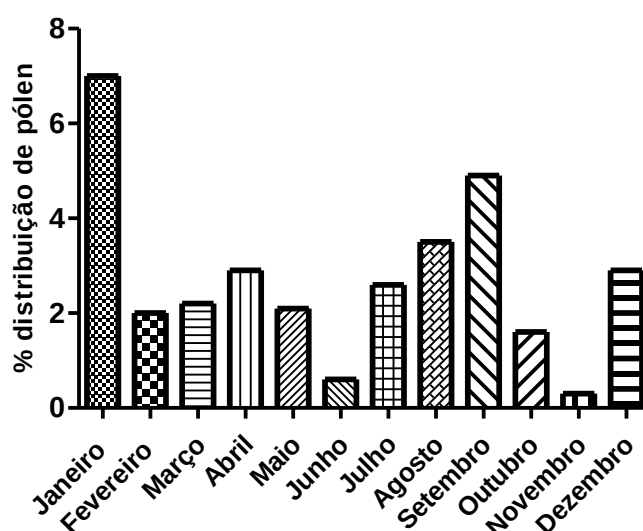
**Figura 3.4** - Componentes estruturais da *M. caesalpiniiifolia*  
Fonte: Reflora, 2023.

A identificação de flavonoides, triterpenos, ácido gálico e catequinas na *M. caesalpiniiifolia* em estudos prévios sugere um potencial relevante para a coleta de resinas por *M. scutellaris*. Esses compostos, notadamente os flavonoides, são frequentemente associados a propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Portanto, a presença dessas substâncias na planta pode influenciar a preferência de *M. scutellaris* na coleta de resinas, buscando benefícios antimicrobianos e antioxidantes para a colônia. O potencial antimicrobiano reforça a importância dessa planta como recurso para abelhas sem ferrão, especialmente em relação à proteção contra microrganismos e à potencial promoção da saúde da colônia.

A constância da presença de pólen desta espécie ao longo de todos os meses do ano destaca sua relevância para as colmeias de abelhas sem ferrão. A coleta de sua resina

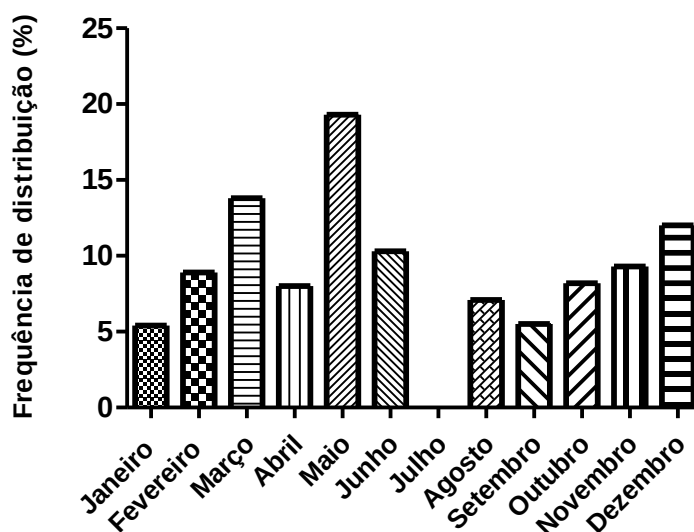
pode contribuir positivamente para a atividade biológica da geoprópolis, visto que, já é descrito na literatura seu potencial farmacológico.

Janeiro e setembro apresentaram a maior prevalência na distribuição de pólen da *Mimosa caesalpiniiifolia*, enquanto novembro e junho registraram uma menor porcentagem de distribuição. Sugere-se que a *M. caesalpiniiifolia* é uma fonte significativa de pólen para as abelhas sem ferrão durante os meses de janeiro e setembro, contribuindo de forma substancial para a composição da geoprópolis nesses períodos (Figura 3.5). Por outro lado, nos meses de novembro e junho, a contribuição dessa espécie de planta para a composição da geoprópolis é menor, indicando uma variação sazonal na coleta de pólen pelas abelhas. Isso pode ter implicações na qualidade e na composição química da geoprópolis produzida durante diferentes épocas do ano.



**Figura 3.5** - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico da *M. caesalpiniiifolia* encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021)

Na análise palinológica de produtos de abelhas sem ferrão, são empregadas referências ou bibliotecas para a comparação dos grãos de pólen identificados. Uma das limitações dessa técnica reside na complexidade de distinguir entre os tipos polínicos que possuem morfologias semelhantes. Nesse contexto, o tipo polínico Melastomataceae e Combretaceae se encaixa nessa categoria de desafio identificativo. O tipo polínico Melastomataceae/Combretaceae, conforme representado na figura 3.6, foi observado com maior frequência na coleta efetuada em maio, enquanto não foi detectada sua presença durante o mês de junho.



**Figura 3.6** - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico da Melastomataceae/Combretaceae encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro a dezembro (2021)

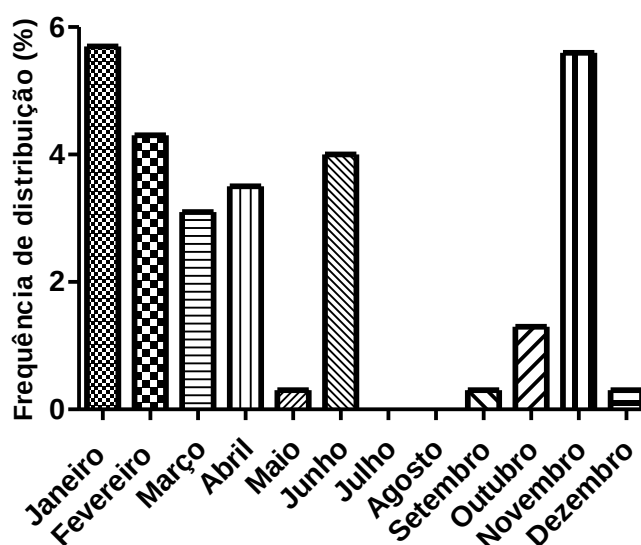
Estudo de revisão conduzido por Goldenberg e colaboradores (2012) apresenta a distribuição dos principais gêneros da família Melastomataceae encontrados na Mata Atlântica. Estes gêneros incluem *Leandra* e *Miconia*, que são os mais proeminentes, juntamente com outros gêneros menos frequentes, como *Clidemia*, *Ossaea* e *Pleiochiton*. Além disso, foram observados outros gêneros, como *Bertolonia*, *Huberia*, *Meriania*, *Physeterostemon* e *Tibouchina*, que possuem frutos secos. É relevante notar que, dos gêneros mencionados, somente *Clidemia*, *Physeterostemon* e *Tibouchina* não estão catalogados como espécies ameaçadas de extinção. A família Combretaceae também apresenta espécies presentes na Mata Atlântica e duas de suas espécies estão ameaçadas de extinção (*Combretum rupicola* e *Combretaceae terminalia*) (STEHMANN et al., 2009; BRASIL, 2022)

É fundamental ressaltar que esses gêneros prevalentes na Mata Atlântica são classificados como arbustos, ervas, trepadeiras e subarbustos (GOLDENBERG et al., 2023). Essa característica pode não ser relevante para a coleta de resina pelas abelhas. No entanto, é crucial ressaltar a significância desses resultados para a preservação dos recursos genéticos vegetais, uma vez que vários gêneros dessa família estão listados como espécies em risco de extinção. Os resultados do estudo também demonstram a presença desse tipo polínico em 11 meses de coleta.

Os grãos de pólen do gênero *Apeiba*, pertencente à família Malvaceae, também foram notáveis nas amostras de geoprópolis coletadas de *M. scutellaris*. Nota-se que esses

grãos de pólen não foram encontrados nos meses de julho e agosto. É evidente que há uma variação na frequência de distribuição ao longo do ano, com os meses de janeiro e novembro apresentando uma distribuição mais ampla, enquanto maio e setembro registraram uma distribuição menor (Figura 3.7).

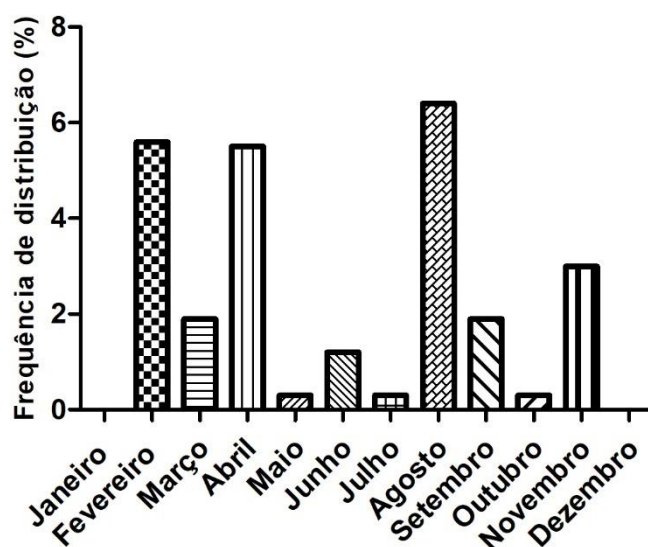
É importante ressaltar que a variação observada na presença dos grãos de pólen do gênero *Apeiba* nas amostras de geoprópolis pode ser influenciada pela sazonalidade e pela disponibilidade de flores dessa planta.



**Figura 3.7** - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico da *Apeiba* encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro e dezembro (2021)

As abelhas, ao coletarem resina para a produção de geoprópolis, também buscam pólen como parte de sua dieta nutricional. Portanto, a ocorrência frequente de flores de *Apeiba* em determinados meses pode resultar em uma maior quantidade de grãos de pólen dessa planta nas amostras. Em contrapartida, a redução na distribuição desses grãos em meses específicos pode estar relacionada à escassez de flores de *Apeiba* durante esses períodos. Essa dinâmica ressalta a complexa interligação entre as abelhas e o meio ambiente que as cerca. As abelhas sem ferrão demonstram uma notável especialização em sua alimentação, e a disponibilidade de diferentes fontes de pólen e resina pode ter um impacto direto em seu comportamento de forrageamento. Essa relação entre as abelhas e as fontes de alimento ilustra a importância da preservação dos habitats naturais que garantem a diversidade de recursos necessários para a sobrevivência desses polinizadores essenciais.

O tipo polínico *Schinus*, pertencente à família Anacardiaceae, não foi identificado nas amostras coletadas nos meses de janeiro e dezembro (Figura 3.8). O mês de agosto se destacou como o período em que houve uma maior incidência da visita das abelhas a esse tipo polínico. Importante mencionar que devido à complexidade na identificação, não foi possível alcançar um nível taxonômico mais específico, limitando-se à identificação do gênero.



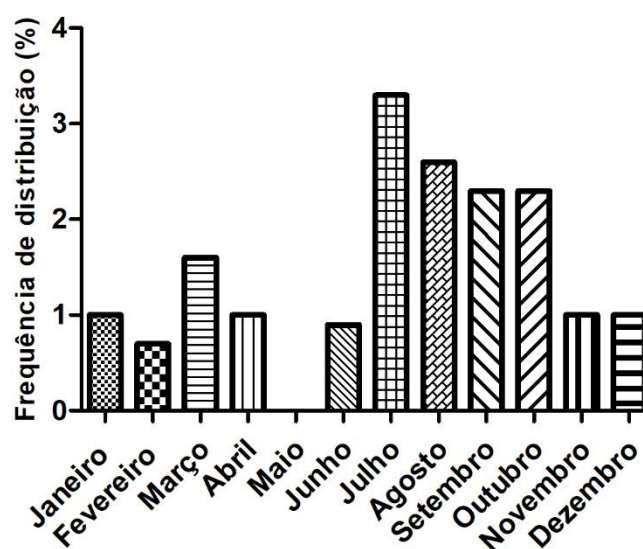
**Figura 3.8** - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico da Anacardiaceae (*Schinus*) encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro e dezembro (2021)

O gênero *Schinus* engloba espécies pioneiras que são empregadas tanto na arborização de áreas urbanas quanto nas fases iniciais de processos de reflorestamento em áreas degradadas, como é o caso de *S. molle* L. e *S. terebinthifolia* Raddi. Pode-se destacar o uso das sementes de *S. terebinthifolia* e *S. molle*, conhecidas popularmente como pimenta-rosa ou pimenta-da-jamaica, na culinária, tanto nacional quanto internacional (Figura 3.9). Adicionalmente, certas espécies do gênero *Schinus* apresentam madeira de alta qualidade e são empregadas na medicina tradicional brasileira devido ao seu potencial em atividades como ação antifúngica, antimicrobiana, inseticida, antibacteriana e propriedades cicatrizantes (FILHO et al., 2020; SILVA et al., 2023). Matos et al. (2019) descreveram que *Schinus terebinthifolia* (Anacardiaceae) foi uma das espécies resiníferas visitadas pela *M. scutellaris*.



**Figura 3.9** - Ilustração de espécie do gênero *Schinus*  
Fonte: Reflora, 2023.

A família botânica Arecaceae revelou que o tipo polínico *Cocus nucifera* demonstrou maior presença nos meses de julho e agosto, não sendo identificado durante o mês de maio (Figura 3.10).



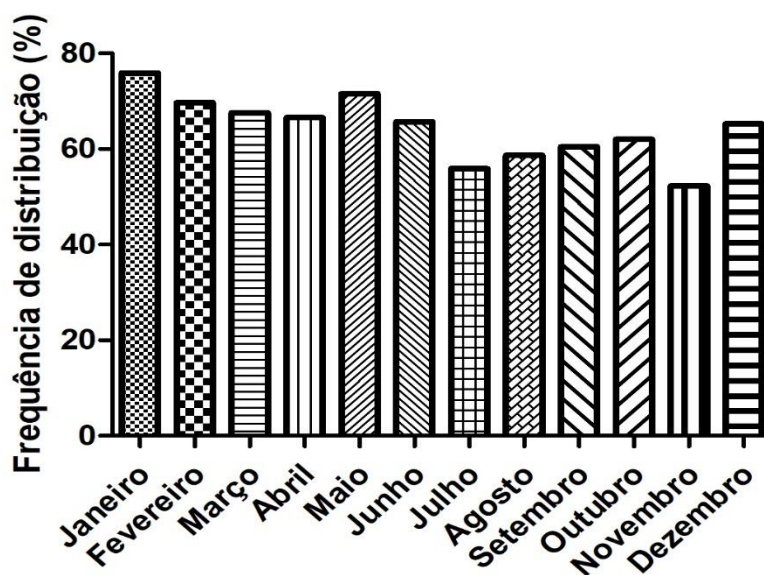
**Figura 3.10** - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico *Cocus nucifera* encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro e dezembro (2021)

A palmeira *Cocos nucifera* não é considerada uma fonte viável de resina, mas suas flores são atrativas para a coleta de pólen. Um estudo conduzido por Muniz e colaboradores (2020) demonstrou que as abelhas *Apis mellifera* possuem preferência por visitar as flores dessa espécie de palmeira. Por outro lado, a espécie *Melipona subnitida* Ducke foi encontrada com uma frequência de visita relativamente baixa.

A Figura 3.11 apresenta a frequência de distribuição do tipo *Myrcia* na geoprópolis, sendo que o período de janeiro, maio e dezembro se destacaram com maior distribuição. Myrtaceae é uma das famílias de plantas lenhosas predominantes em várias



formações vegetais brasileiras, especialmente na Floresta Atlântica, onde mais de 50 espécies podem coexistir sintopicamente. *Myrcia* é um gênero de plantas pertencente à família Myrtaceae, com várias espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Essas plantas são conhecidas por suas flores e frutos geralmente pequenos e pela produção de óleos essenciais com diversas aplicações medicinais e aromáticas. As abelhas são os principais polinizadores responsáveis pela perpetuação desse gênero (GRESSLER, 2006).



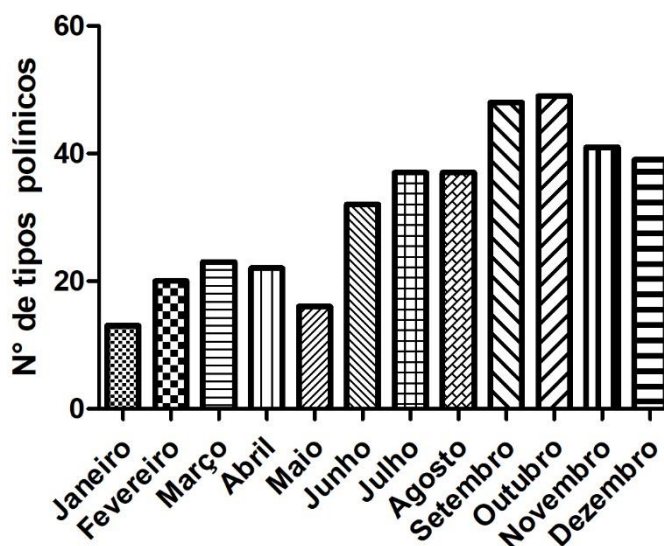
**Figura 3.11** - Frequência de distribuição (%) do tipo polínico *Myrcia* encontrado na geoprópolis no período de coleta entre janeiro e dezembro (2021)

Os tipos polínicos de baixa distribuição são de grande importância na ecologia das abelhas. Embora esses tipos polínicos possam ser menos comuns na paisagem, eles desempenham um papel crucial na diversificação da dieta das abelhas, contribuindo para a manutenção da saúde da colônia e para a promoção da biodiversidade local. Além disso, a coleta de pólen de plantas de baixa distribuição pode ser fundamental para o sucesso reprodutivo dessas espécies vegetais, uma vez que as abelhas atuam como importantes agentes polinizadores. Portanto, a preservação e o manejo adequado desses tipos polínicos são essenciais para a conservação da fauna e da flora, bem como para a manutenção dos serviços ecossistêmicos prestados pelas abelhas.

Além disso, o estudo polínico contribui para a caracterização da região fitogeográfica onde as caixas de abelhas estão localizadas, embora não forneça uma determinação precisa. Dentre os tipos polínicos identificados, destacam-se *Senna* (julho

e novembro), *Casearia sylvestris* (dezembro), *Serjania* (janeiro e março), *Stylosanthes* (junho e julho), *Schizolobium* (março e abril), *Crotalaria* (setembro, outubro e novembro), *Begonia* (janeiro, agosto, setembro e outubro) e *Eucalyptus* (abril, setembro e outubro).

A Figura 3.12 exibe o número de tipos polínicos encontrados em todos os meses de coleta, demonstrando uma variação significativa ao longo do tempo. Nota-se que apenas os meses de julho e agosto registraram a mesma quantidade de tipos polínicos. Por outro lado, o mês de janeiro se destacou como o período com menor diversidade de tipos polínicos. Em contraste, os meses de setembro e outubro revelaram a maior variabilidade nesse aspecto.



**Figura 3.12** -Variabilidade de distribuição dos tipos polínicos para as 12 coletas

Os resultados observados na variação do número de tipos polínicos ao longo dos meses de coleta são importantes e revelam a dinâmica da vegetação na área de estudo. A constância no número de tipos polínicos nos meses de julho e agosto sugere estabilidade na floração das plantas durante esse período, o que pode estar relacionado a fatores sazonais ou climáticos específicos. Por outro lado, a menor variabilidade de tipos polínicos em janeiro indica uma possível redução na diversidade vegetal nesse período, talvez devido a condições climáticas desfavoráveis ou a características sazonais da vegetação local. Já a maior variabilidade nos meses de agosto e setembro sugere heterogeneidade na composição florística, o que pode estar relacionado a eventos como a floração de espécies sazonais. Essas observações destacam a importância de se

considerar a sazonalidade e a diversidade vegetal ao interpretar dados de tipos polínicos, fornecendo subsídios para uma melhor compreensão da fitogeografia local e dos padrões de forrageamento das abelhas.

No estudo de revisão conduzido por Popova e colaboradores (2019), é descrito que as abelhas sem ferrão têm o hábito de coletar resinas e explorar a biodiversidade ao seu redor. Além disso, é observado que a composição diversificada das resinas coletadas pode estar correlacionada com a sinergia entre os componentes das diferentes fontes de resinas. Os pesquisadores identificaram marcadores químicos de três espécies de plantas na própolis de abelhas sem ferrão, a qual foi quimicamente caracterizada. Este estudo destaca a capacidade das abelhas sem ferrão de reunir resinas de diversas famílias de plantas em uma única amostra de própolis, como observado na própolis de *Lisotrigona cacciae*. Essas descobertas ressaltam a complexidade e a riqueza da interação entre as abelhas e o ambiente natural, proporcionando insights valiosos para a compreensão da ecologia e do comportamento desses insetos polinizadores.

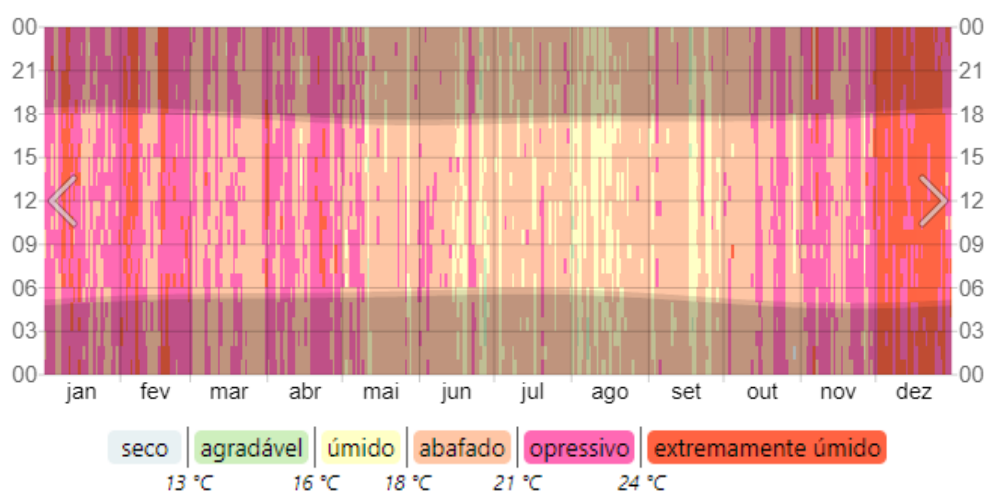
A pesquisa conduzida por Martins e colaboradores (2023) revelou que as abelhas sem ferrão tendem a favorecer espécies de plantas com uma fenologia de floração conhecida como "big bang", caracterizada pela ocorrência de floração em massa durante curtos períodos. Esse padrão de preferência sugere uma adaptação das abelhas em relação à disponibilidade de recursos florais, priorizando a visita a plantas que oferecem uma grande quantidade de néctar e pólen em um curto espaço de tempo. Essa constatação contribui para fundamentar a variabilidade dos tipos polínicos identificados em cada mês de coleta. Foi observado que as abelhas apresentaram padrões distintos de visitação, conforme evidenciado pela presença de diversos tipos polínicos. Por exemplo, nos meses de junho e setembro, apesar de registrarem o mesmo número de tipos polínicos, estes eram diferentes entre si.

Observou-se que o número de espécies disponíveis para visitação aumenta progressivamente, resultando em maior variabilidade. Os meses correspondentes ao verão (janeiro, fevereiro e março), apresentaram um padrão de visitação mais baixo. No inverno, a variabilidade é moderada em relação aos outros meses analisados, o que era esperado devido às condições ambientais menos favoráveis para o forrageamento das abelhas. Já na primavera, observa-se uma maior variabilidade, o que é condizente com as condições ambientais mais propícias para a atividade das abelhas.

Silva e colaboradores (2011) observaram que a temperatura e a umidade relativa exercem influência sobre a atividade de voo das abelhas sem ferrão. As colônias

apresentaram uma atividade de forrageio mais intensa nas primeiras horas da manhã, coincidindo com períodos de alta umidade relativa. Por outro lado, a atividade de voo diminuiu significativamente durante os períodos de temperaturas elevadas ao redor do meio-dia. Silva e colaboradores (2019) encontraram o mesmo padrão de forrageamento para *Plebeia* aff. *Flavocincta*. Esses achados corroboram com a menor variabilidade observada no verão, período caracterizado por temperaturas mais altas.

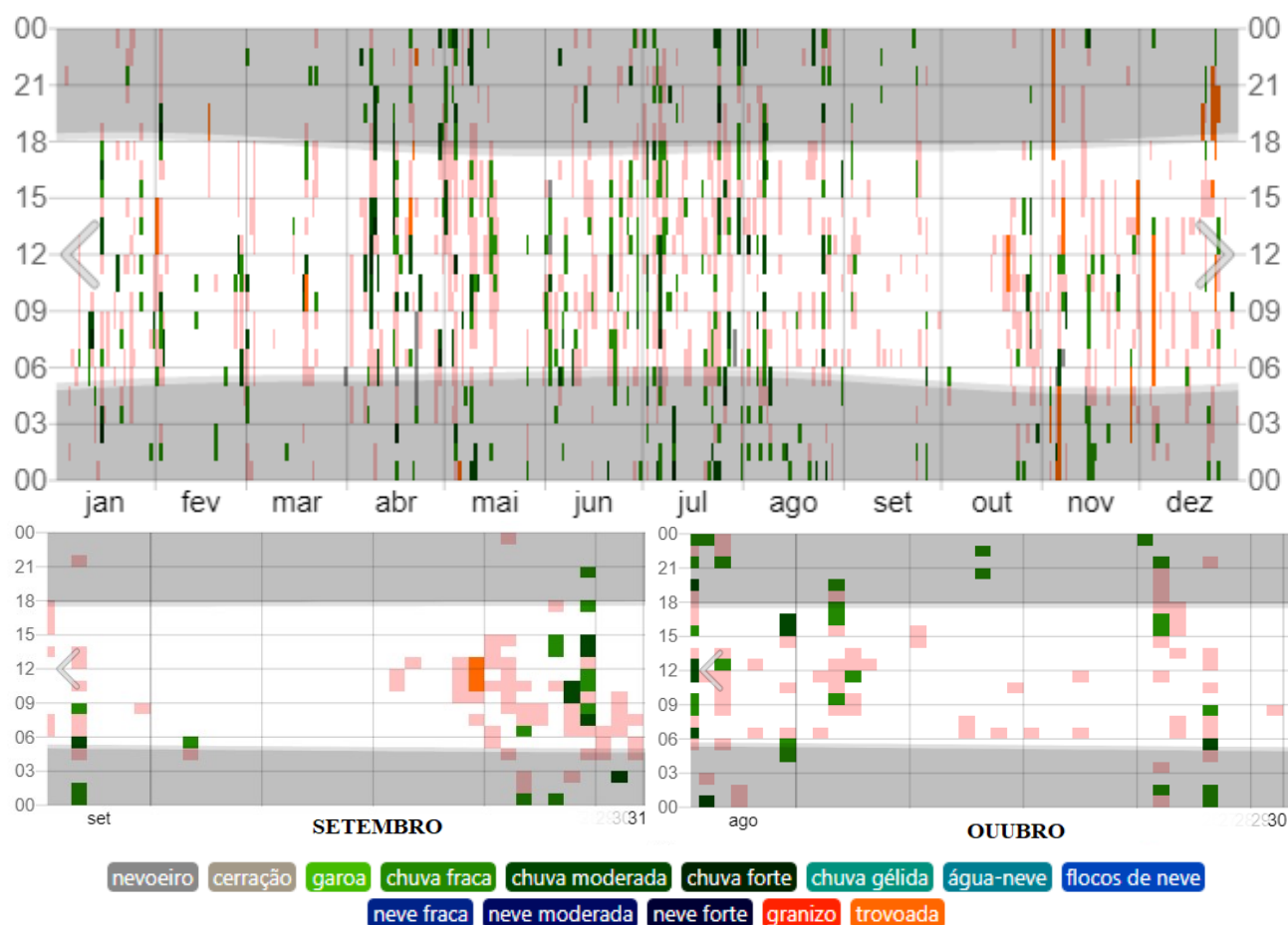
O histórico das condições meteorológicas de Mata de São João, Brasil, foi obtido por meio das estações meteorológicas próximas, uma vez que o município não dispõe de estação meteorológica própria. As informações detalhadas dos dados meteorológicos permitem acompanhamento abrangente das variações climáticas na região no ano de 2021.



**Figura 3.13** - Níveis de conforto em umidade em 2021 no Aeroporto Internacional Dep. Luís Eduardo Magalhães

Fonte: Relatórios METAR, 2021.

A representação da média de umidade ao longo dos meses de 2021 indica que dezembro, janeiro, fevereiro, março e abril foram caracterizados por um elevado nível de umidade, sendo considerados meses extremamente úmidos, estes, apresentaram menor variabilidade polínica (Figura 3.13). Além disso, os meses de setembro e outubro registraram baixo índice pluviométrico, com pouca chuva ao longo do mês, e uma maior variabilidade polínica (Figura 3.14). Essa condição sugere melhores condições de forrageio para as abelhas, uma vez que a disponibilidade de uma variedade de pólenes pode contribuir para uma nutrição mais diversificada e equilibrada das colmeias. Essa observação ressalta a importância da relação entre as condições climáticas, a disponibilidade de recursos alimentares e a saúde das colônias de abelhas.



**Figura 3.14** - Condições meteorológicas observadas ao longo do ano de 2021 no Aeroporto Internacional Dep. Luís Eduardo Magalhães.

### 3.3.2 Análise da Composição Química da Geoprópolis Produzida por *Melipona scutellaris* em Mata de São João, Bahia

A sazonalidade da coleta é um dos fatores determinantes para a obtenção de extratos com composição química promissora, capazes de potencializar a atividade terapêutica. A Figura 3.15 apresenta os rendimentos obtidos nas doze coletas de geoprópolis realizadas no Meliponário de Mata de São João, Bahia.

Com base nos resultados estatísticos de comparação, o valor-p foi inferior ao nível de significância, levando à rejeição da hipótese nula e indicando diferença em pelo menos uma das coletas para o rendimento. O mês de novembro surge como o mais promissor para a obtenção de extratos com maior rendimento de resinas, enquanto maio e outubro apresentam os menores rendimentos. Nota-se que o número de tipos polínicos encontrados para cada mês pode não influenciar diretamente no rendimento dos extratos. Por exemplo, embora os meses de setembro e outubro tenham se destacado com maior

diversidade de tipos polínicos, eles foram classificados como alguns dos extratos com menor rendimento.

Sugere-se que as abelhas podem coletar maior quantidade de resina de determinada espécie por diferentes motivos. Primeiramente, é crucial destacar que a disponibilidade de resina em uma planta específica pode variar em função de fatores ambientais, como temperatura, umidade e exposição à luz solar. Plantas que produzem resina em maior quantidade e frequência podem atrair mais abelhas em busca desse recurso. Além disso, a atratividade de uma planta para as abelhas pode estar relacionada à sua localização dentro do ambiente. Exemplo disso, plantas que estão próximas da colmeia ou que são facilmente acessíveis para as abelhas podem ser preferencialmente visitadas, resultando em maior coleta de resina. Outro fator importante é a qualidade da resina produzida pela planta. Algumas espécies de plantas podem produzir resinas com composição química mais atrativa para as abelhas, seja por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes ou outras características que beneficiam a colônia.

Portanto, mesmo que a variabilidade polínica entre os meses de coleta possa influenciar na disponibilidade de tipos polínicos para as abelhas, o rendimento de resina pode não ser diretamente afetado. Isso ocorre porque as abelhas podem se concentrar em coletar resina de espécies específicas que oferecem as melhores condições e benefícios para a colônia, independentemente da variabilidade polínica.

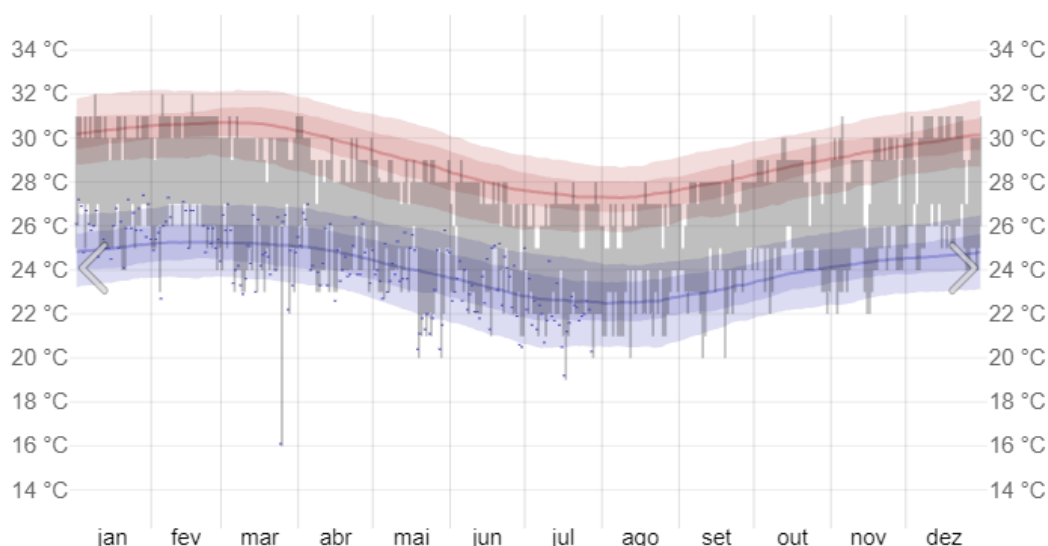
Woźniak e colaboradores (2019) estudaram a sazonalidade na composição da própolis polonesa, identificando uma interferência significativa, especialmente durante os meses de verão, que se destacaram em termos de rendimento. Por outro lado, a primavera apresentou rendimentos menores. O presente estudo mostrou um rendimento maior na primavera, especificamente no mês de novembro. Isso pode ser atribuído a uma série de fatores, como condições climáticas favoráveis, disponibilidade de recursos para as abelhas sem ferrão durante esse período do ano, ou até mesmo variações sazonais na produção de resinas pelas plantas da região.

Para o teor de fenólicos totais, observou-se que as coletas realizadas nos meses de maio e julho apresentaram maiores teores de fenólicos, enquanto o mês de janeiro apresentou o menor teor. Ao associar esse resultado ao perfil polínico das amostras, nota-se que o mês de janeiro apresentou uma menor variabilidade polínica, sugerindo também que as espécies disponíveis para a coleta de resina não são ricas em compostos fenólicos.

Os dados revelaram que a sazonalidade teve impacto nos níveis de fenólicos e flavonoides, havendo variação nos meses de coleta para cada uma das variáveis

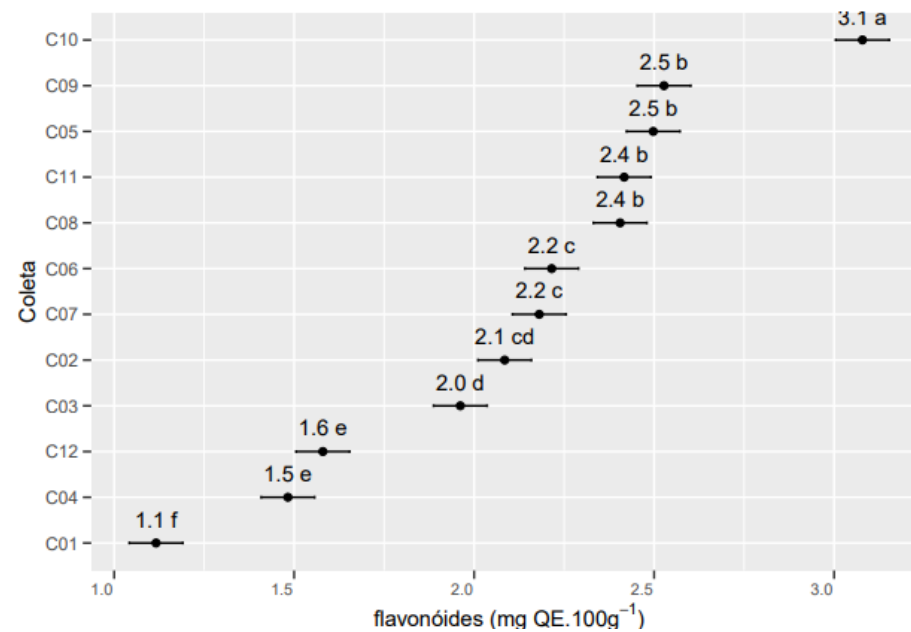
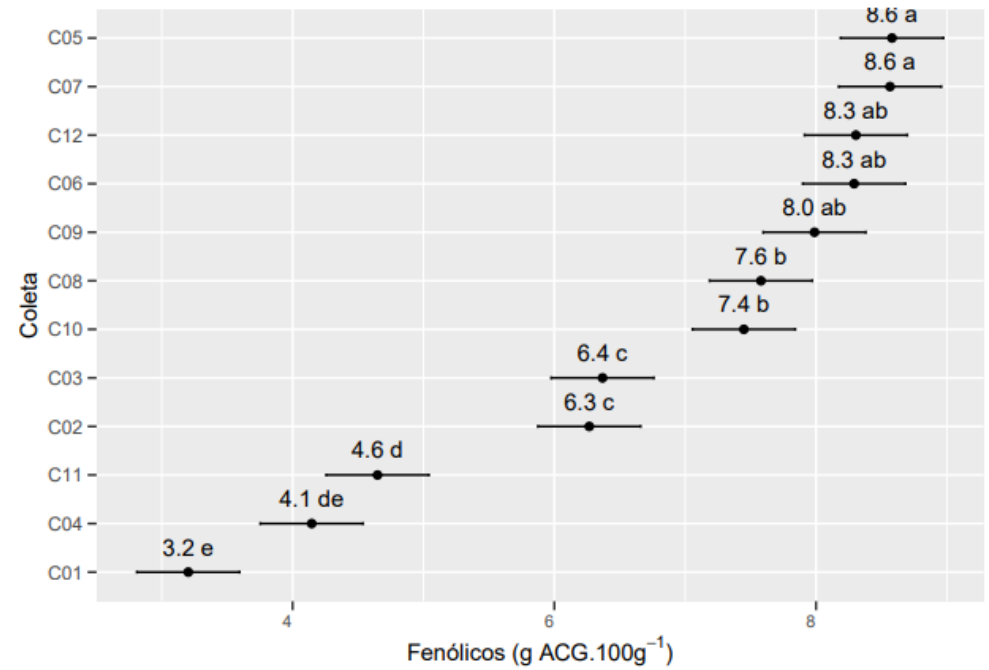
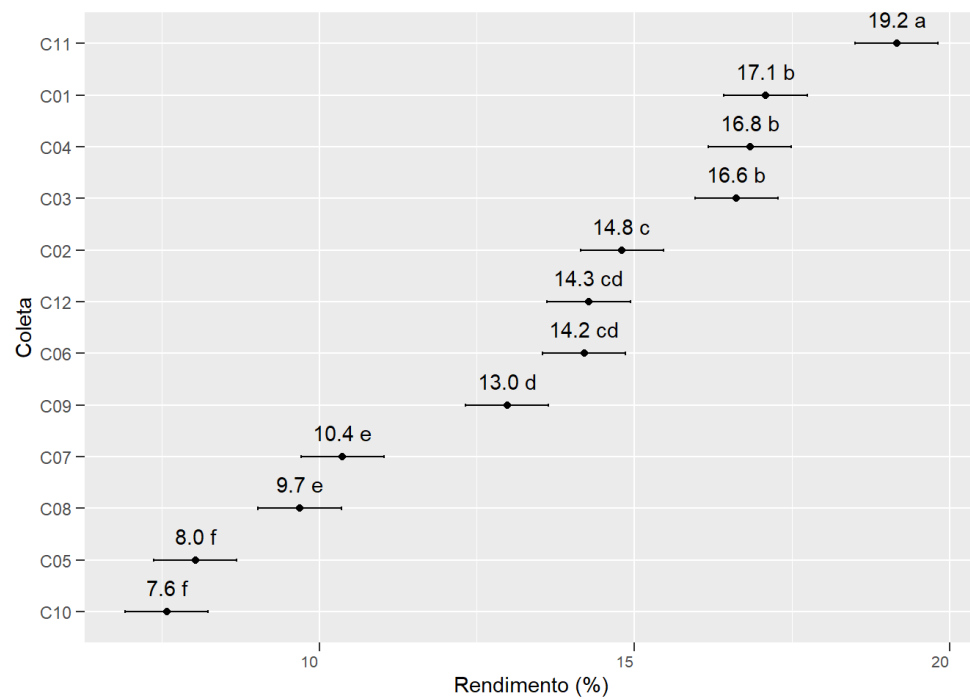
analisadas. Notavelmente, os teores de flavonoides totais foram mais expressivos em outubro, ao passo que em janeiro foram observados em menor quantidade.

Altas temperaturas, na faixa de 30 a 40°C, podem inibir a biossíntese de flavonoides. Esse fator pode desencadear uma série de efeitos prejudiciais nos processos metabólicos das plantas, incluindo a supressão da expressão gênica relacionada à síntese de flavonoides e a redução da atividade enzimática responsável por essa produção. Essa supressão pode ser atribuída à desnaturação de enzimas, um fenômeno que ocorre quando altas temperaturas causam mudanças na estrutura tridimensional dessas proteínas, comprometendo sua função biológica (YANG et al., 2018). Os dados referentes à temperatura em Mata de São João mostram que o mês de janeiro apresentou altas temperaturas, também foi também o mês com o menor teor de fenólicos e flavonoides (Figura 3.16).



**Figura 3.15** - Histórico de temperatura em Aeroporto Internacional Dep. Luís Eduardo Magalhães em 2021

Fonte: Relatórios METAR, 2021



**Figura 3.16** - Resultados da interferência significativa da sazonalidade no rendimento, teor de fenólicos e flavonoides

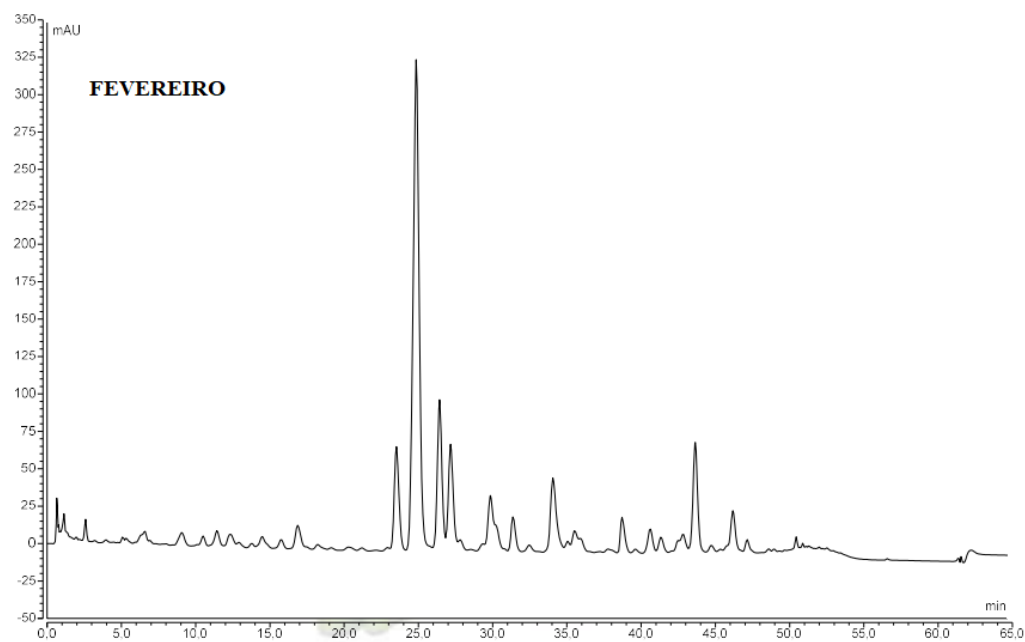
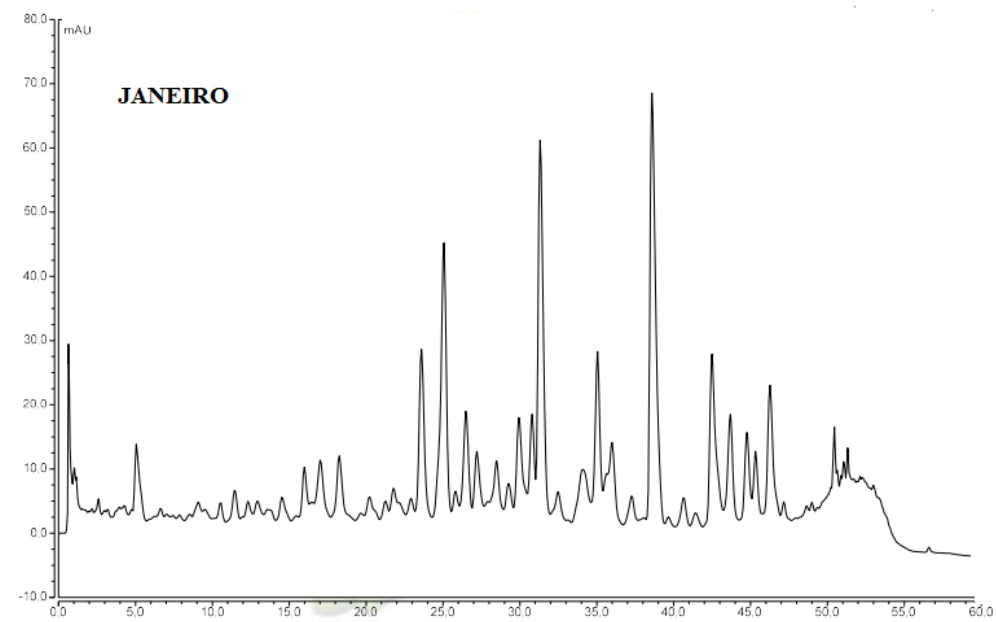
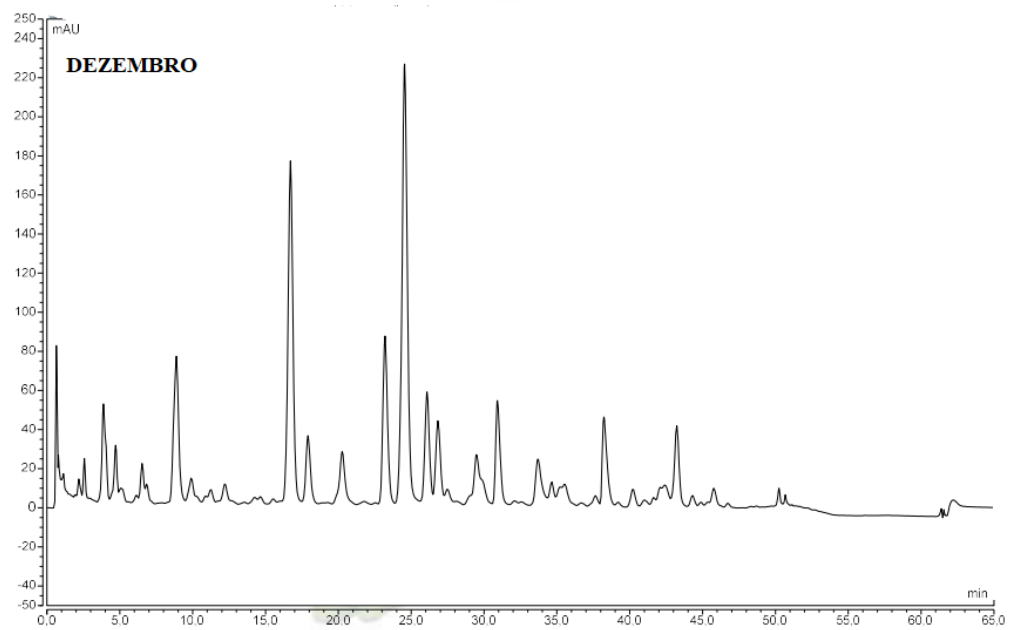


Além disso, a composição química da própolis é altamente dependente da localização geográfica de onde é coletada. Isso se deve ao fato de que as abelhas sem ferrão, responsáveis pela produção da própolis, coletam resinas de diferentes plantas presentes em sua região. Como resultado, a própolis de uma determinada região pode conter uma variedade de compostos químicos que refletem a flora específica desse local. Essa diversidade de fontes botânicas contribui para a complexidade e a riqueza da própolis, conferindo-lhe propriedades únicas e potencialmente terapêuticas.

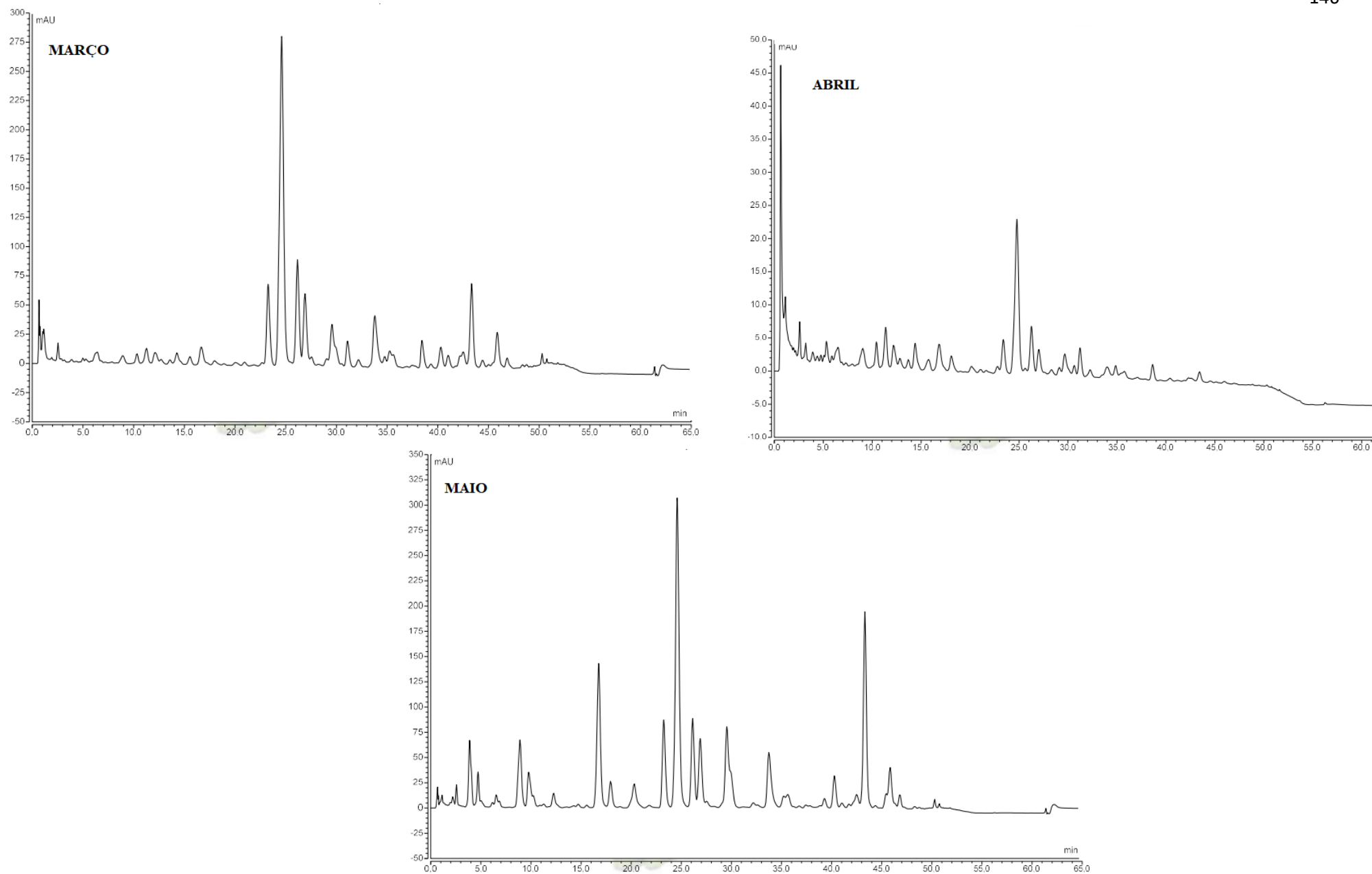
A relação entre os teores de fenólicos e flavonoides totais na própolis está diretamente relacionada à diversidade de plantas disponíveis para as abelhas sem ferrão coletarem resinas. Diferentes espécies de plantas produzem resinas com composições químicas distintas, incluindo diferentes tipos e quantidades de fenólicos e flavonoides. Portanto, a quantidade e a diversidade de fenólicos e flavonoides totais na própolis podem variar de acordo com a região e a flora predominante no local de coleta. Os dados polínicos revelam variabilidade significativa nos tipos de grãos de pólen encontrados na amostra de geoprópolis de Mata de São João. Sendo assim, sugere-se que essa variabilidade interferiu no teor de fenólicos e flavonoides.

Os cromatogramas das 12 coletas revelaram perfis químicos distintos, indicando variações na composição ao longo do tempo. A análise desses cromatogramas permite identificar os compostos específicos presentes em cada amostra, bem como avaliar a intensidade e a proporção de cada pico cromatográfico a partir das áreas, que refletem a quantidade relativa dos componentes químicos. Essas diferenças nos perfis cromatográficos fornecem informações importantes sobre a influência de fatores sazonais e ambientais na composição da resina coletada ao longo do período de estudo.

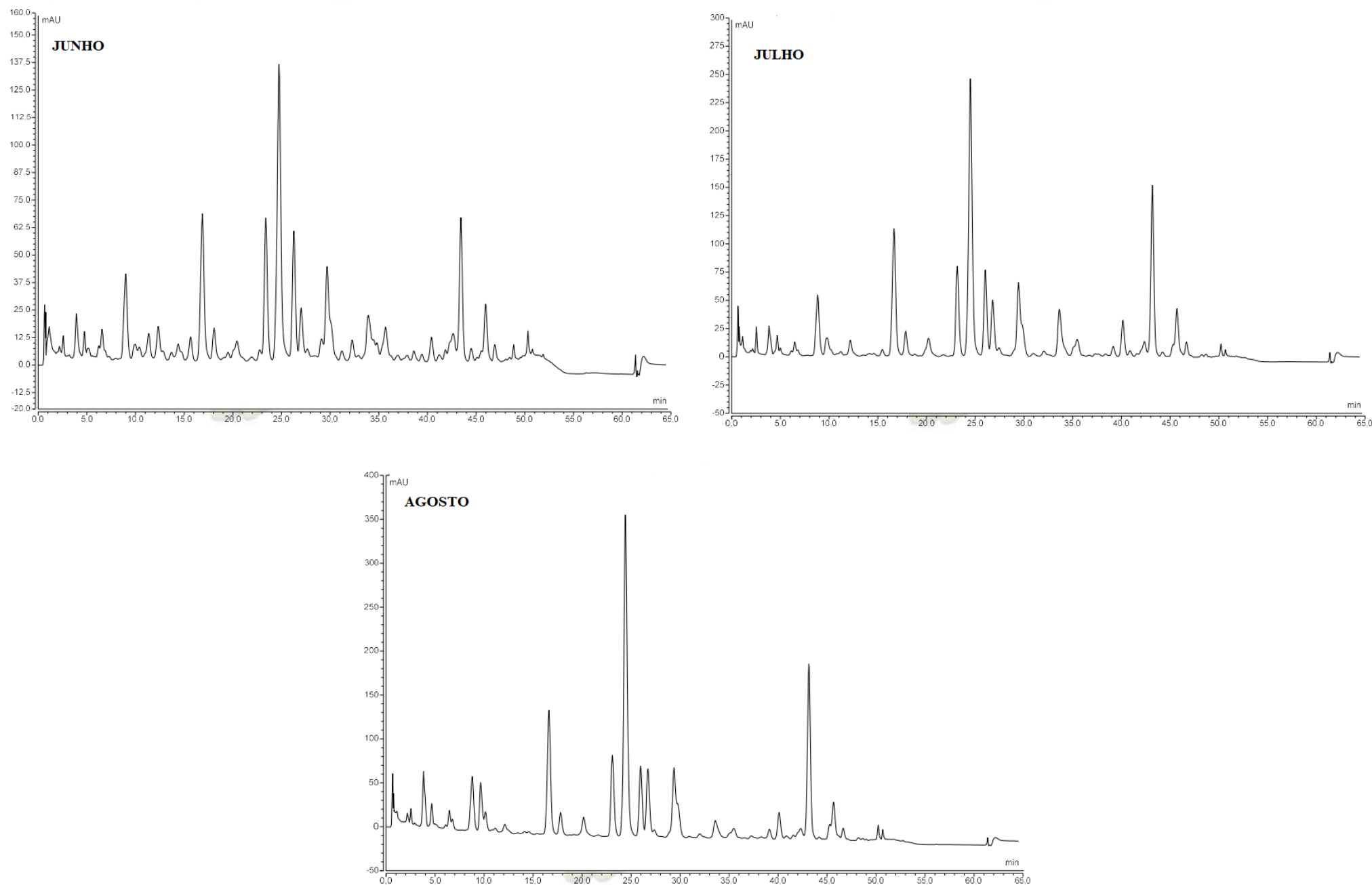
Coletas realizadas nos períodos do verão, outono e inverno apresentaram perfis diferentes, ou seja, para cada mês obteve-se perfis distintos (Figura 3.17, Figura 3.18, Figura 3.19 e Figura 3.20). Os únicos meses que apresentaram perfis semelhantes foram correspondentes aos meses do inverno (Figura 3.19), associando o perfil químico à variabilidade polínica, os meses que apresentaram frequência de distribuição próximas para os tipos polínicos não definidos, sendo assim pode-se sugerir que as abelhas podem coletar.



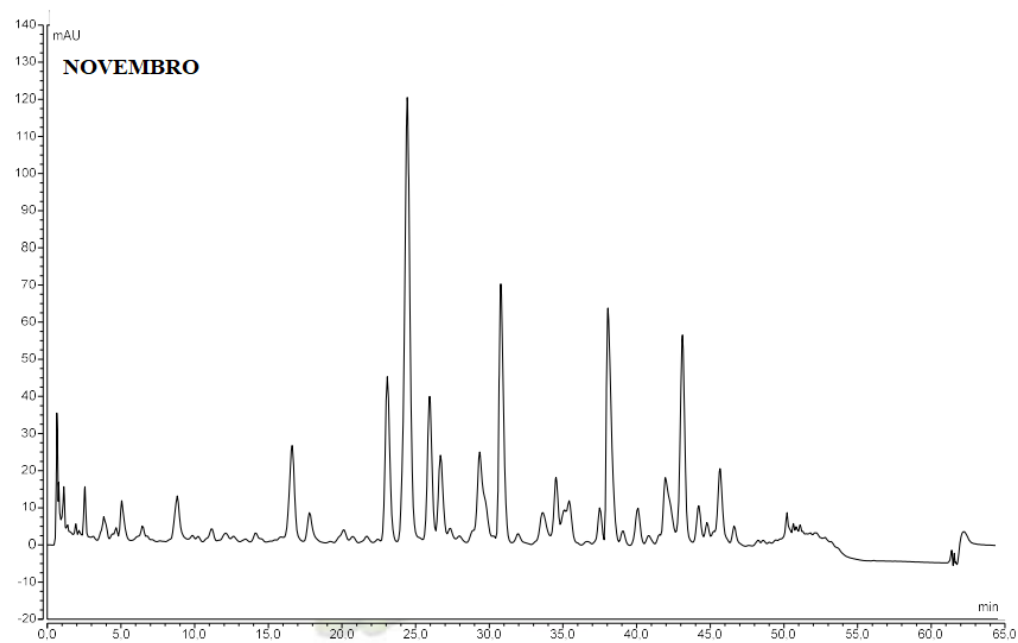
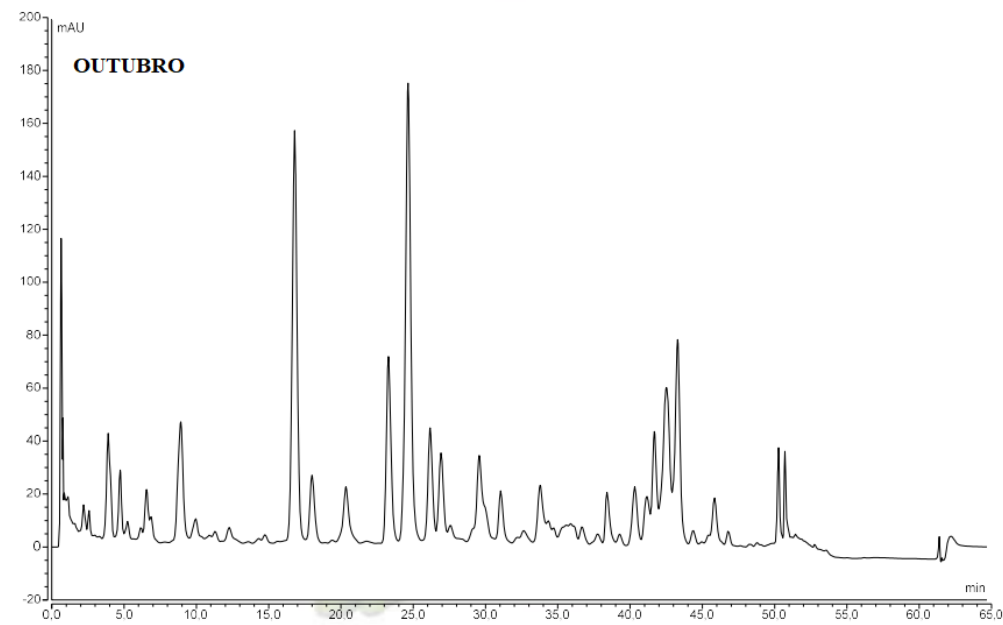
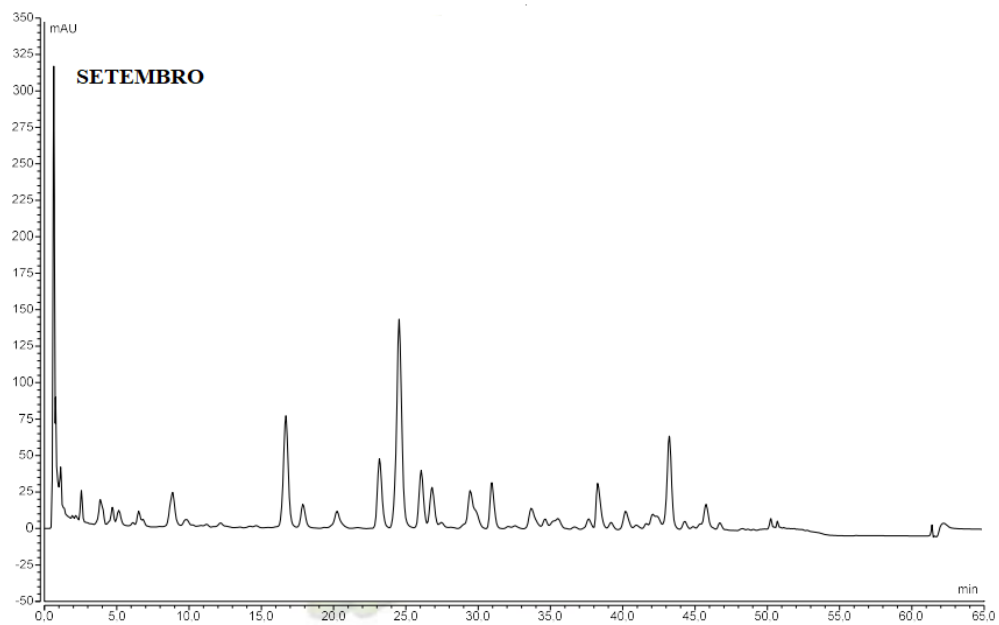
**Figura 3.17** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de *M. scutellaris* coletadas no verão



**Figura 3.18** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de *M. scutellaris* coletadas no outono



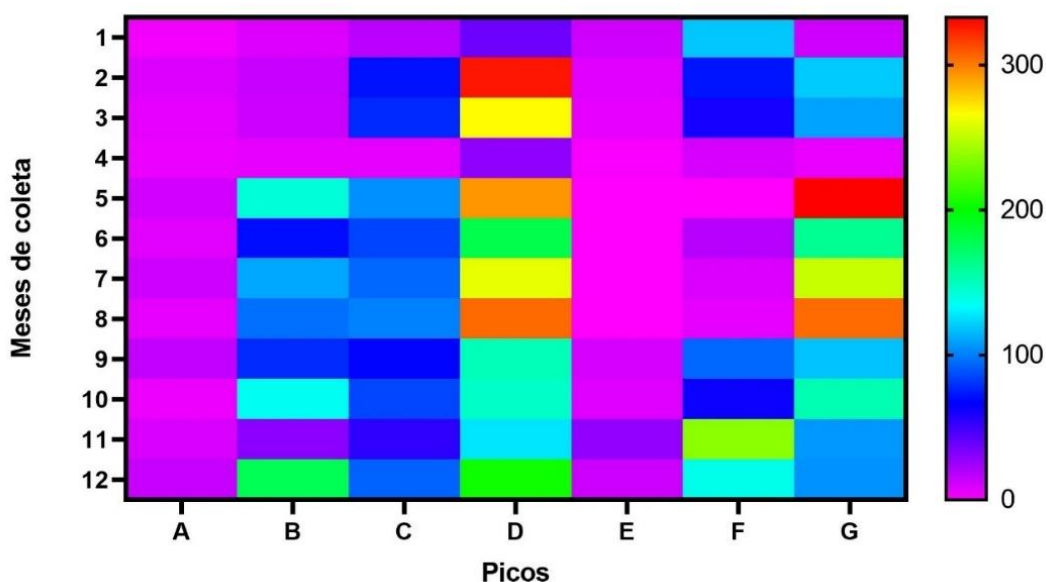
**Figura 3.19** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de *M. scutellaris* coletadas no inverno



**Figura 3.20** - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD da geoprópolis de *M. scutellaris* coletadas na primavera

Após análise qualitativa, foram escolhidas as substâncias majoritárias presentes nas 12 coletas, as quais foram codificadas como A, B, C, D, E, F e G. Os resultados indicaram que o mês de coleta teve influência significativa nas áreas obtidas para cada uma dessas substâncias.

O heat map apresenta as áreas dos picos A, B, C, D, E, F e G, em que as cores variam de laranja para rosa, indicando diferentes intensidades de área (Figura 3.21). No mapa, as áreas em laranja representam uma maior extensão, enquanto as áreas em rosa indicam uma menor extensão. Essa codificação de cores permite uma rápida compreensão visual das variações na extensão das diferentes áreas representadas no mapa, facilitando a análise e interpretação dos dados espaciais. Com o auxílio do heat map percebe-se que as substâncias majoritárias foram D, F e G. O pico D demonstrou presença em todas as amostras coletadas ao longo do ano, sugerindo que a planta responsável pela produção da resina é visitada durante todo o período, embora sua área tenha variado, com menor concentração em alguns meses, ainda assim foi consistentemente detectado. Esses achados sugerem que a substância D pode ser identificada e definida como um marcador da geoprópolis coletada no meliponário localizado em Mata de São João.



**Figura 3.21** - Mapa de calor (heatmap) referente as áreas dos picos obtidos através da cromatografia a líquidos de alta eficiência

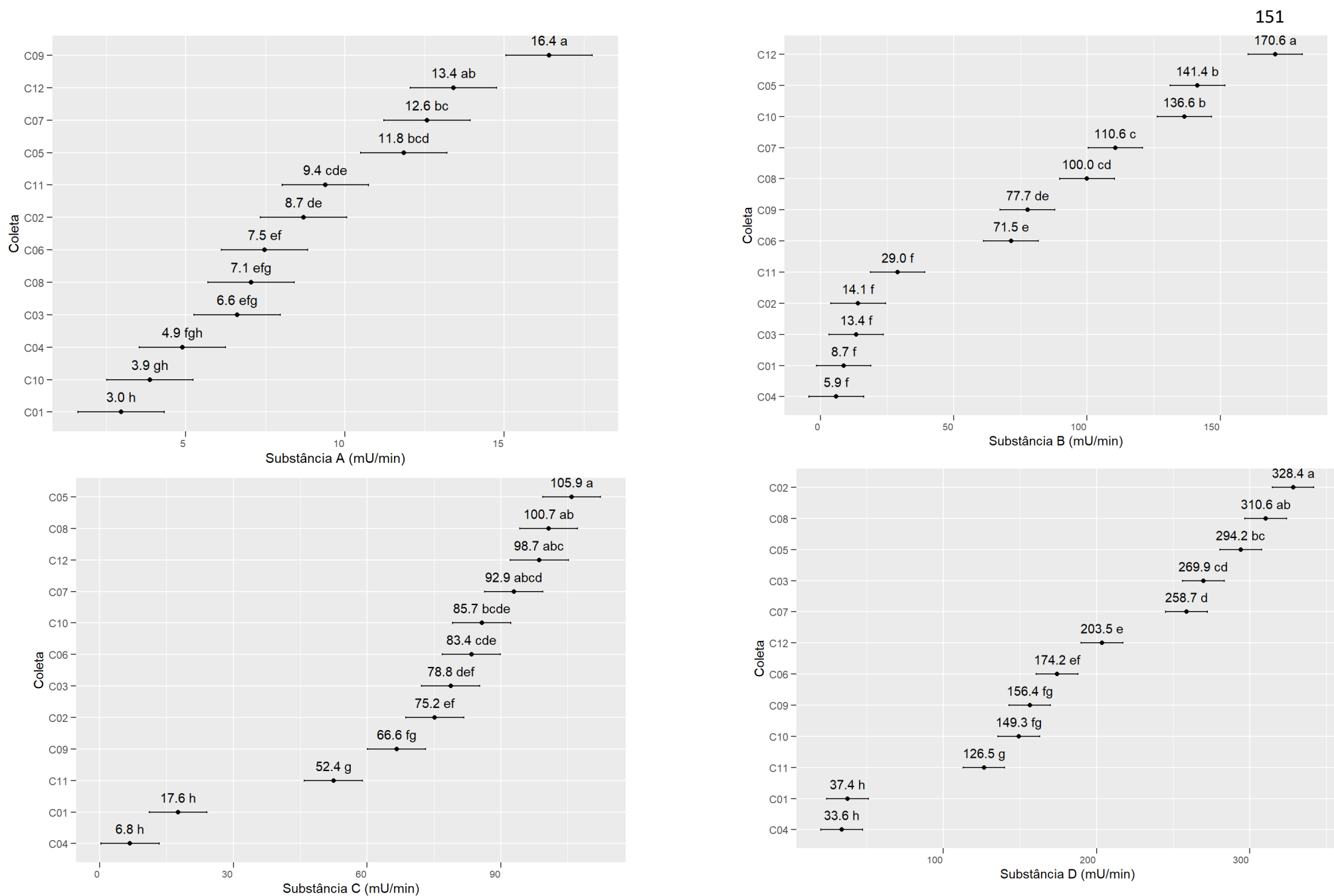
A análise estatística revelou a interferência da sazonalidade na área da substância A na amostra. O mês de janeiro apresentou o menor teor, enquanto setembro e dezembro

demonstraram teores mais elevados. Quanto à substância B, a coleta realizada em dezembro contribuiu para maior rendimento deste metabólito, atingindo 170,6 mU/min, enquanto os meses de janeiro, fevereiro, março e novembro foram os que expressaram menor concentração, variando de 5,9 a 29,0 mU/min (Figura 3.22).

Para a substância C, observou-se maior concentração nos meses de maio, julho e dezembro, enquanto os menores teores foram registrados para os meses de abril e janeiro. Para o metabólito D, os meses de fevereiro e agosto apresentaram maior concentração, enquanto janeiro e abril registraram menores teores (Figura 3.22).

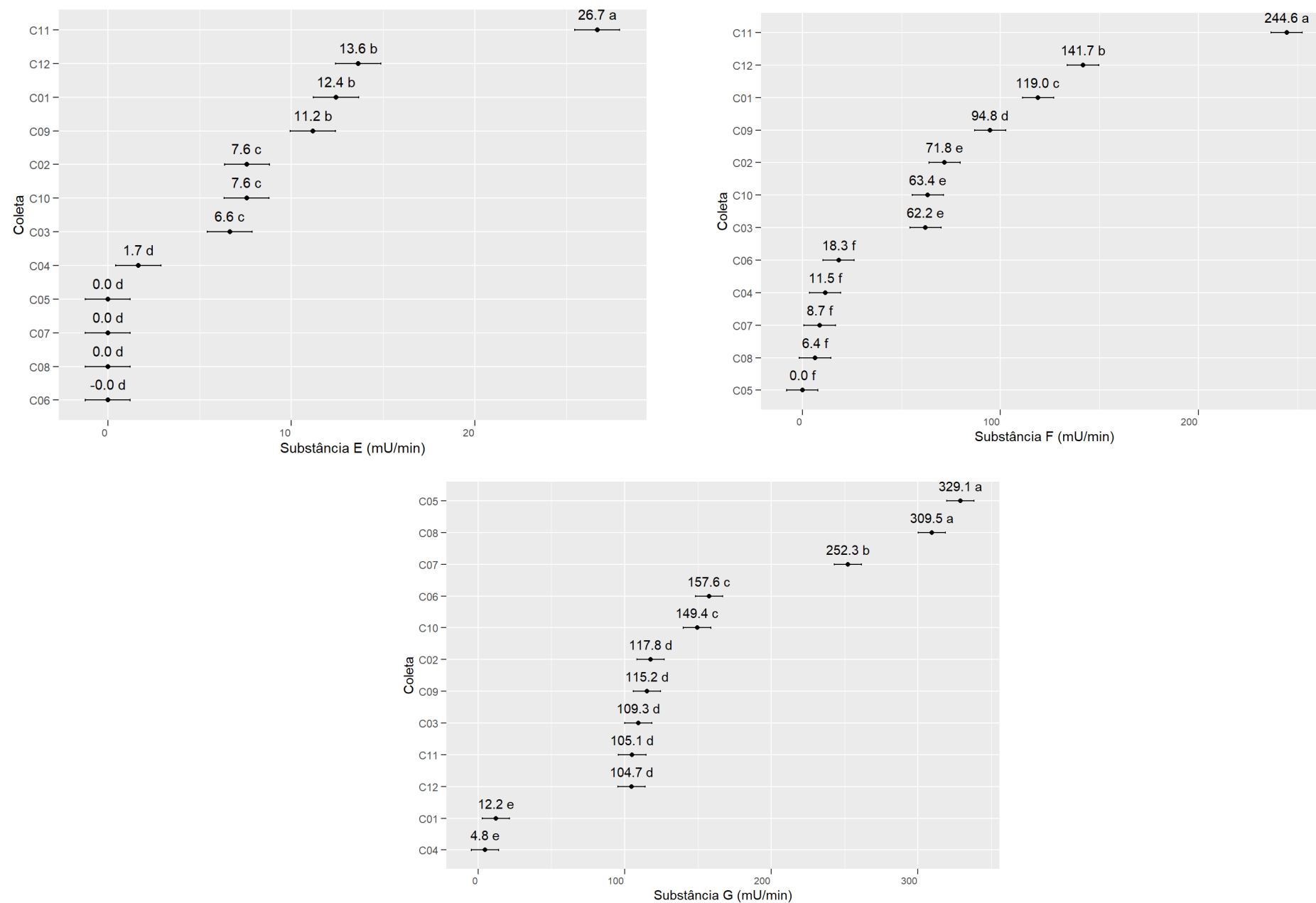
A substância E apresentou um padrão distinto das demais, pois não foi detectada em alguns meses de coleta, especificamente em maio, junho, julho e agosto. Por outro lado, os meses de setembro, novembro, dezembro e janeiro destacaram-se para o metabólito E (Figura 3.23). Ao observar esse padrão, é perceptível que os meses com temperaturas mais baixas, maior precipitação pluviométrica e menor incidência de luz solar resultaram em menor concentração da substância E. Nesse contexto, pode-se sugerir que a planta, durante essa época do ano, produz essa substância em menor quantidade. Além disso, é possível inferir que, devido ao clima adverso para o forrageio das abelhas, sua visita à espécie vegetal que produz tal substância tenha sido reduzida, uma vez que o padrão de visitação das abelhas ao longo do ano foi diferente.

A substância F, ao apresentar um padrão semelhante ao da substância E, reforça a influência da sazonalidade na composição química da resina coletada. A ausência de detecção no mês de maio e os maiores teores observados em novembro sugerem uma resposta específica da planta às condições ambientais ao longo do ano (Figura 3.2). Esses resultados corroboram a hipótese de que fatores como temperatura, precipitação e incidência de luz solar influenciam diretamente na produção e na concentração de metabólitos na resina, afetando assim a disponibilidade dessas substâncias para as abelhas



**Figura 3.22** - Áreas dos picos (A, B, C e D) obtidos através da cromatografia a líquidos de alta eficiência

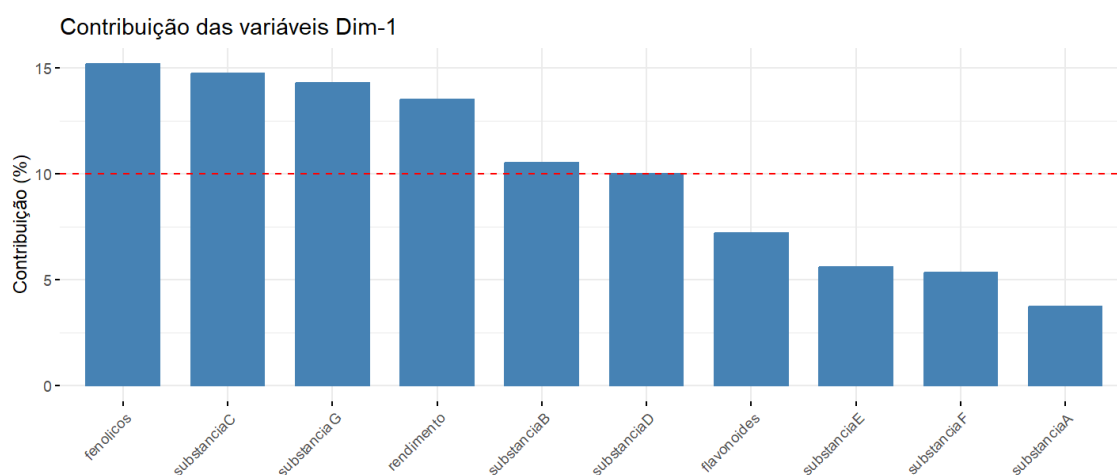




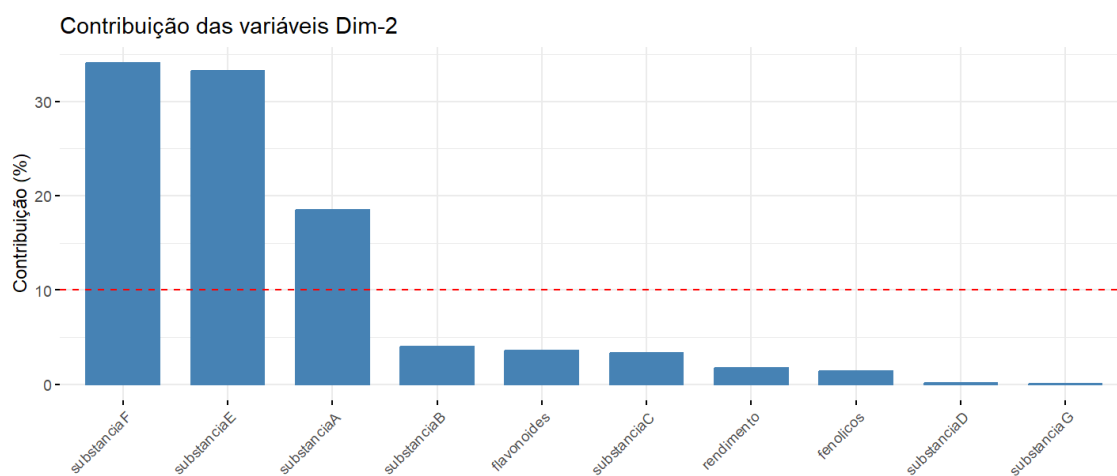
**Figura 3.23** - Áreas dos picos (E, F e G) obtidos através da cromatografia a líquidos de alta eficiência

A substância G apresentou variações significativas ao longo dos meses de coleta. Os menores teores foram observados em janeiro e abril, enquanto os maiores foram registrados em maio e agosto. Essa oscilação na concentração da substância G sugere uma resposta diferenciada da planta aos estímulos sazonais. A maior disponibilidade de G nos meses de maio e agosto pode estar relacionada a condições climáticas específicas, como temperatura e umidade, que podem favorecer a produção e acumulação desse metabólito na resina.

Como pode ser observado nas figuras 3.24 e figura 3.25, a primeira componente principal (PC1) e a segunda (PC2) foram capazes de descrever 56,7% e 19,2% da variância dos dados, respectivamente, somando 75,9% da variância total.



**Figura 3.24** - Contribuição das variáveis para o componente principal 1



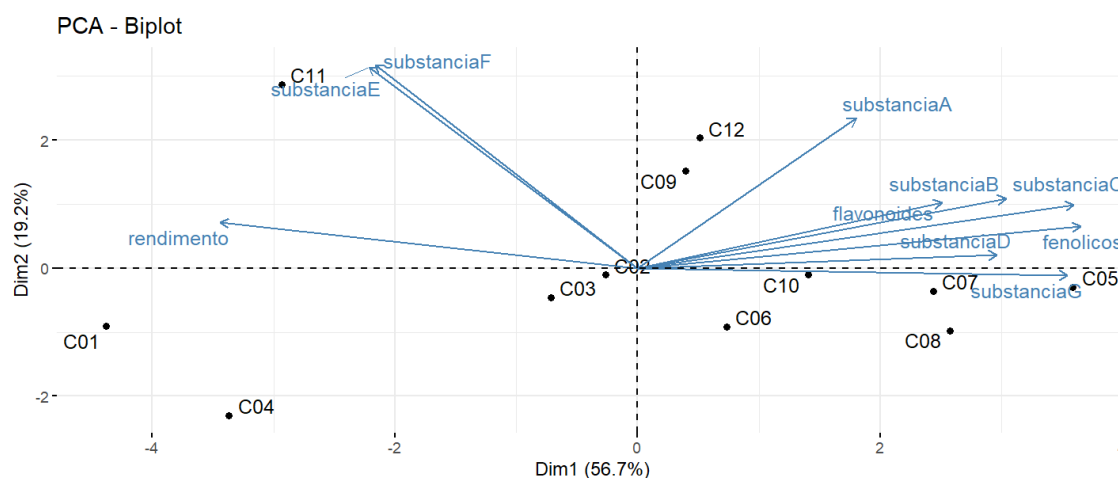
**Figura 3.25** - Contribuição das variáveis para o componente principal 2

A análise da Figura 3.24 dos componentes principais indica associação significativa entre a sazonalidade e os teores de fenólicos, flavonoides e outros compostos. as substâncias B, C, D e G. Os meses de outubro, julho e maio foram destacados por apresentarem maiores concentrações desses compostos, indicando uma possível influência positiva das condições ambientais durante esses períodos na produção desses metabólitos. Ao contrário, a coleta realizada em novembro parece apresentar uma relação negativa com as substâncias E e F, sugerindo uma redução nos teores desses componentes nesse período específico.

O período compreendido entre janeiro e abril pode ser caracterizado como menos propício para a obtenção de geoprópolis com perfil químico promissor, conforme evidenciado pelos cromatogramas correspondentes a esse intervalo de tempo.

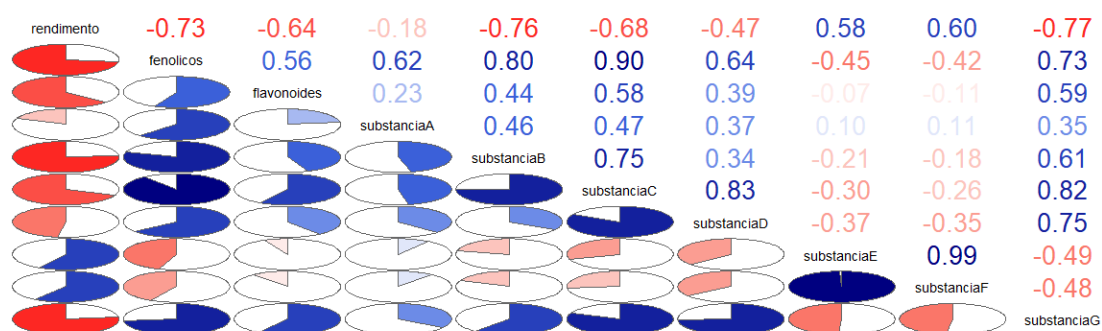
Além disso, a análise da figura 3.25 revela correlação entre as variáveis, em que os teores dos compostos detectados pela técnica de CLAE-DAD estão diretamente relacionados aos teores de fenólicos e flavonoides obtidos por espectrofotometria. Essa relação é confirmada pelos espectros UV obtidos, os quais apresentam bandas de absorção características dos compostos fenólicos e flavonoides.

Para os flavonoides, a absorção no espectro ultravioleta é determinada pelo núcleo comum da benzopirona e substituintes. O acréscimo de hidroxilas a este núcleo resulta em um aumento do efeito batocrômico, o que leva a um deslocamento dos espectros para comprimentos de onda maiores. Esses compostos geralmente apresentam dois máximos de absorção, sendo o segundo entre 240-285 nm e o primeiro entre 300-400 nm (SIMOES, 2010).



**Figura 3.26 - Distribuição e Influência das Variáveis nos Componentes Principais**

Estudo mostram que a sazonalidade pode influenciar na composição química e bioatividade das plantas e estão diretamente associadas aos diversos estágios do metabolismo vegetal, além de serem influenciadas por modificações nos fatores climáticos, como temperatura, umidade do solo e precipitação. Esses elementos interagem de maneira complexa, moldando a expressão dos compostos químicos presentes nas plantas ao longo das diferentes estações do ano (PRINSLOO et al., 2015; YANG et al., 2018; SHI et al., 2022). Essa suposição é corroborada pelo estudo em questão, no qual todas as variáveis analisadas foram influenciadas pela época de coleta, evidenciando que determinados períodos foram mais propícios para algumas dessas variáveis.



**Figura 3.27** - Correlação entre as variáveis fenólicas, flavonoides, rendimento e perfil químico

Essas descobertas destacam a necessidade de estudos adicionais para compreender melhor os padrões sazonais na produção de geoprópolis e seu potencial uso na medicina e em outras aplicações.

### 3.4 CONCLUSÃO

Esta pesquisa evidenciou que a análise palinológica é uma ferramenta indispensável para identificar as espécies vegetais associadas à composição química da geoprópolis. Os resultados obtidos revelaram uma ampla diversidade polínica, com a família Fabaceae se destacando, especialmente a *Mimosa caesalpiniiifolia*, que se mostrou presente ao longo de todo o ano.

Embora a análise palinológica ofereça informações valiosas, ela também apresenta desafios, especialmente quando se trata de distinguir tipos polínicos com

morfologias semelhantes. No entanto, a sazonalidade da coleta e a diversidade polínica não foram os únicos determinantes para a obtenção de extratos de geoprópolis de qualidade. O rendimento de resinas variou significativamente entre os meses, sugerindo que outros fatores, como disponibilidade e qualidade da resina, também influenciam na escolha das plantas pelas abelhas.

Dessa forma, a coleta de resina pelas abelhas parece ser influenciada por múltiplos fatores ambientais e biológicos, incluindo a disponibilidade de resina, atratividade da planta, localização da planta em relação à colmeia e qualidade química da resina. Esses elementos combinados podem direcionar as abelhas a focar suas atividades de forrageamento em espécies específicas, resultando em variações nos rendimentos de resinas coletadas.

Portanto, é fundamental considerar uma abordagem integrada que combine conhecimento ecológico, análise química e compreensão do comportamento das abelhas para melhorar as estratégias de manejo e conservação desses importantes polinizadores

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, C.M.J et al. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca da *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth (Sabiá). **Scientia plena**, v. 8, n. 1, 2012.
- BATIHA, G.E.S et al. Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of genus *Acacia*. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7340, 2022.
- BARTH, M.O et al. Melissopalynology in Brazilian restinga areas, a mini review. **Grana**, v. 61, n. 5, p. 355-365, 2022.
- BRAGA, M.N.S et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais da família Fabaceae na comunidade Cristalândia, Humaitá-AM. **Biodiversidade**, v. 21, n. 2, 2022.
- CARVALHO, P.E.R et al. Fabaceae ou Leguminosae. Embrapa. Disponível em <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/especies-arboreasbrasileiras/fabaceae#:~:text=Fabaceae%20ou%20Leguminosae&text=Possui%20distribui%C3%A7%C3%A3o%20cosmopolita%2C%20incluindo%20cerca,200%20g%C3%AAneros%20e%201.500%20esp%C3%A9cies.>> Acesso em: 25 de fev de 2024.
- RIBASKI, J et al. Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil. 2003.
- KENNEDY, C.M. et al. A global quantitative synthesis of local and landscape effects on wild bee pollinators in agroecosystems. **Ecology Letters**, v. 16, n. 5, p. 584–599, 2013.

- MARTINS, A.C. et al. Contrasting patterns of foraging behavior in neotropical stingless bees using pollen and honey metabarcoding. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 14474, 2023.
- MONÇÃO, N.B.N et al. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpiniiifolia* on human tumour cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4204-4224, 2015.
- STEHMANN, J.R et al. **Plantas da Floresta Atlântica**, Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 516 p.
- SILVA, M.D et al. Why do the stingless bee *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forage at high relative air humidity? Iheringia. **Série Zoologia**, v. 101, p. 131-137, 2011.
- SILVA, M.J.D et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.(Mimosaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, 2012.
- SILVA, J.G et al. Foraging behavior of the small-sized stingless bee *Plebeia aff. flavocincta*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, p. 484-492, 2019.
- SILVA, L.C.L et al. Anacardiaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB1199>>. Acesso em: 05 set. 2023
- SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.
- RIBEIRO, R.T.M et al. Combretaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB90>>. Acesso em: 05 set. 2023.
- GOLDENBERG, R et al. Melastomataceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB161>>. Acesso em: 05 set. 2023.
- GRESSLER, E et al. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 509-530, 2006.
- FILHO, A.C.P.M. *Schinus molle* e *Schinus terebinthifolius*: Revisão sistemática da classificação, e aspectos químicos, fitoquímicos, biológicos e farmacobotânicos. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 3, p. 490, 2020.
- MONTEIRO, D et al. Generalist bees (Meliponina) and the reproductive success of the mass flowering tree *Stryphnodendron pulcherrimum* (Fabales: Mimosaceae) in the Atlantic Rainforest, Bahia. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 519-526, 2010.

MUNIZ, V.I.M.S. Frequência de coletores florais do Coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no litoral do município de Acaraú (Ceará–Brasil). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, 2020.

BRASIL. PORTARIA Nº 148, DE 7 DE JUNHO DE 2022. **Atualiza a Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 108, p. 1-2, 8 de junho de 2022.

PRINSLOO, G et al. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 889-902, 2018.

OLIVEIRA, D. J et al. Botanical origin, microbiological quality and physicochemical composition of the *Melipona scutellaris* pot-pollen (“samburá”) from Bahia (Brazil) Region. *Journal of Apicultural Research*, v. 60, n. 3, p. 457-469, 2021.

OTIENO, M et al. Local and landscape effects on bee functional guilds in pigeon pea crops in Kenya. **Journal of insect Conservation**, v. 19, p. 647-658, 2015.

FLORA. **Mimosa in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83409>>. Acesso em: 25 fev. 2024

YANG, L et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

WOŹNIAK, M et al. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 301-308, 2019.