



**PPGCTA**  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**JONILSON DE MELO E SILVA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO (*IN VITRO*)  
DE EXTRATOS DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS  
SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA**

**BELÉM – PA, BRASIL**

**2024**

**JONILSON DE MELO E SILVA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO (*IN VITRO*)  
DE EXTRATOS DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS  
SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará (UFPA) como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: LUIZA HELENA DA SILVA MARTINS

Coorientador: JOHNATT ALLAN ROCHA DE OLIVEIRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA.

BELÉM – PA, BRASIL

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

S586c Silva, Jonilson de Melo E.  
Composição química, potencial antioxidante e antimicrobiano  
(in vitro) de extratos de geoprópolis de abelhas sem ferrão da  
amazônia / Jonilson de Melo E Silva. — 2024.  
78 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Luiza Helena da Silva Martins  
Coorientador(a): Prof. Dr. Johnatt Allan Rocha de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Belém, 2024.

1. Produtos de abelhas nativas. 2. Extração. 3. Compostos  
bioativos. 4. Atividade biológica. I. Título.

CDD 664.022

---

**Data da defesa:** 22 de agosto de 2024.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Luiza Helena da Silva Martins**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientadora)  
Presidente da comissão

---

**Prof. Dr. Johnatt Allan Rocha de Oliveira**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Coorientador)

---

**Prof. Dr. Renan Campos Chisté**  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

---

**Prof. Dr. Gustavo Guadagnucci Fontanari**  
(ISPA/UFRA – Membro Externo)

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros também se encontra registrada no SIPAC e disponível na Secretaria do PPGCTA-UFPA.

Dedico à minha Família, que é a minha  
motivação, que me deu apoio e incentivo para  
chegar até aqui.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me deu força de vontade e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, pois somente com a sua ajuda foi possível realizar o sonho de concluir mais essa etapa da vida profissional.

Agradeço a minha família por todo apoio, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem na busca por alcançar meus objetivos, quero que saibam que podem contar comigo sempre.

A minha orientadora Luíza Martins e meu coorientador Johnatt Oliveira, por toda ajuda, por toda dedicação e paciência que tiveram, por acreditarem em mim e pelos esclarecimentos nos momentos de dúvida. Sou muito grato por ter tido a orientação de excelentes profissionais com os quais sempre aprendo muito.

A Ynara Fonseca, Gabriel Silva, Sandro Almada, Lucas Figueiredo, Eva Athemis, Fernanda Bezerra, Ingrid Martins e a toda equipe do Laboratório de Higiene de Alimentos e Bioprocessos – FANUT/UFPA e Laboratório de Nutrição Animal – LABNUTAN/UFRA, por todo apoio e auxílio na realização das análises laboratoriais, por toda ajuda, parceria e pelos conselhos.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica, do Programa de Pós-Graduação em Toxinologia (PPGTox) do Instituto Butantan e a empresa Shimadzu do Brasil Comércio Ltda pela parceria na realização das análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).

A Profa. Dra. Carolina Picone, vinculada ao grupo de pesquisa do laboratório de Microestrutura de Alimentos (LMA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pela parceria na realização de análises de atividade antioxidante.

Agradeço a banca examinadora, que acompanhou este trabalho desde o início, por suas contribuições valiosas que proporcionaram a melhora e aperfeiçoamento deste trabalho.

**Agradecimentos às agências de fomento à pesquisa**  
*(Acknowledgement to the research funding agencies)*

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. *(This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001).*

## BIOGRAFIA DOS AUTORES



### **Jonilson de Melo e Silva**

Tecnólogo em alimentos pela UEPA. Atua na área de controle de qualidade, boas práticas de fabricação, análises físico-químicas, atividade antioxidante e determinação de compostos bioativos naturais. Tem dedicado sua pesquisa na avaliação de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana em matrizes alimentícias e subprodutos agroindustriais.

IDLATTES: <http://lattes.cnpq.br/6795911045439263>



### **Orientadora: Luiza Helena da Silva Martins**

Profa. Dra. Luiza Helena da Silva Martins é professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências e tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Obteve seu título de doutora pela UNICAMP no ano de 2015. Atua na área de compostos bioativos naturais, processos fermentativos e enzimáticos, aproveitamento de resíduos agroindustriais, operações unitárias e simulação de processos, ciência e tecnologia de produtos apícolas e meliponícolas.

IDLATTES: <http://lattes.cnpq.br/1164249317889517>



### **Coorientador: Johnatt Allan Rocha de Oliveira**

Prof. Dr. Johnatt Allan Rocha de Oliveira é professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências e tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Obteve seu título de doutor pela UNICAMP no ano de 2014. Atua na área de tecnologia e processamento de alimentos, aplicações enzimáticas para extração de compostos fenólicos, microbiologia, aproveitamento de resíduos agroindustriais, produção de etanol de segunda geração e ácido láctico.

IDLATTES: <http://lattes.cnpq.br/4620766111243038>



## RESUMO

A região amazônica apresenta um crescente desenvolvimento da meliponicultura, a atividade de criação racional de abelhas sem ferrão. No entanto, um importante produto dessa atividade, a geoprópolis (material elaborado a partir de substâncias resinosas coletadas das plantas, às quais as abelhas adicionam secreções salivares, cera, pólen e terra), ainda possui pouco valor no mercado devido à falta de informações sobre sua composição química e atividades biológicas. O objetivo deste trabalho é estudar a geoprópolis das abelhas sem ferrão urucu amarela (*Melipona flavolineata*), urucu boca de renda (*Melipona seminigra pernigra*) e urucu cinzenta (*Melipona fasciculata*), provenientes da cidade de Terra Alta, localizada no nordeste do estado do Pará, relativamente a sua composição química e mineral, determinação dos compostos bioativos, avaliação das propriedades antioxidantes, antimicrobianas e determinação do perfil cromatográfico (compostos voláteis) dos extratos etanólicos de geoprópolis obtidos por agitação e sonicação. Os extratos da condição ótima apresentaram teores de compostos fenólicos totais significativos, variando de  $5491,1 \pm 446,33$  a  $13019,19 \pm 186,56$  mg EAG/100 g, assim como também o teor de flavonoides totais que ficou entre  $190,31 \pm 2,61$  e  $2498,02 \pm 78,24$  mg QE/100 g. Em relação a atividade antioxidante, a amostra com melhor desempenho foi a de urucu amarela, que apresentou resultados de  $1537,66 \pm 19,52$   $\mu\text{mol trolox eq./g}$ ,  $1773,56 \pm 6,52$   $\mu\text{mol trolox eq./g}$  e  $7074,41 \pm 215,73$   $\mu\text{mol sulfato ferroso eq./g}$ , nos respectivos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP. As amostras provenientes da urucu boca de renda e urucu cinzenta apresentaram ação antimicrobiana, com concentração inibitória mínima igual a 0,5 e 2 mg/mL, respectivamente. A análise de compostos voláteis demonstrou perfis químicos distintos entre as amostras, uma vez que apenas 3 dos compostos identificados (menos de 4% do total) foram comuns em todas as amostras analisadas, sugerindo que as geoprópolis das três espécies são elaboradas a partir de diferentes fontes de resina, apesar das colmeias estarem localizadas no mesmo ambiente. A presente pesquisa de caráter exploratório contribui com informações importantes para o conhecimento das atividades exibidas pela geoprópolis produzida na região amazônica, auxiliando na progressão de estudos das abelhas sem ferrão.

**Palavras-chave:** produtos de abelhas nativas; extração; compostos bioativos; atividade biológica.

## ABSTRACT

The Amazon region presents a growing development of meliponiculture, the rational breeding of stingless bees. However, an essential product of this activity, geopropolis (a material made from resinous substances collected from plants to which bees add salivary secretions, wax, pollen, and earth), still has little value on the market due to the lack of information about its chemical composition and biological activities. The objective of this work is to study the geopropolis of stingless bees uruçu amarela (*Melipona flavolineata*), uruçu boca de renda (*Melipona seminigra pernigra*), and uruçu cinzenta (*Melipona fasciculata*), from the city of Terra Alta, located in the northeast of the state of Pará, regarding its chemical and mineral composition, determination of bioactive compounds, evaluation of antioxidant and antimicrobial properties and determination of the chromatographic profile (volatile compounds) of geopropolis ethanolic extracts obtained by agitation and sonication. The extracts from the optimal condition showed significant levels of total phenolic compounds, ranging from  $5491.1 \pm 446.33$  to  $13019.19 \pm 186.56$  mg EAG/100g, as well as the content of total flavonoids, which was between  $190.31 \pm 2.61$  and  $2498.02 \pm 78.24$  mg QE/100g. Regarding antioxidant activity, the sample with the best performance was yellow uruçu, which presented results of  $1537.66 \pm 19.52$   $\mu\text{mol trolox eq./g}$ ,  $1773.56 \pm 6.52$   $\mu\text{mol trolox eq./g}$  and  $7074, 41 \pm 215.73$   $\mu\text{mol ferrous sulfate eq./g}$ , in the respective DPPH, ABTS and FRAP tests. Samples from uruçu Boca de renda and uruçu content presented antimicrobial action, with a minimum inhibitory concentration of 0.5 and 2 mg/mL, respectively. The analysis of volatile compounds demonstrated distinct chemical profiles between the samples since only 3 of the identified compounds (less than 4% of the total) were standard in all analyzed samples, suggesting that the geopropolis of the three species are made from different resin sources, despite the hives being located in the same environment. This exploratory research contributes essential information to the knowledge of the activities exhibited by the geopropolis produced in the Amazon region, helping in the progression of studies on stingless bees.

**Keywords:** native bee products; extraction; bioactive compounds; biological activities.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Colmeia de abelha uruçú amarela ( <i>Melipona flavolineata</i> ) com favos de cria no centro e potes de alimento (mel e pólen) nas laterais indicados pelas setas .....	17
<b>Figura 2</b> - Estruturas de constituintes identificados na própolis da abelha sem ferrão <i>H. itama</i> : a) mangostina, b) mangiferina .....	21
<b>Figura 3</b> - Estruturas dos constituintes caracterizados da própolis da abelha sem ferrão <i>Scaptotrigona aff. postica</i> (Apidae, Meliponini): (a) Ácido benzóico; (b) ácido cinâmico; (c) chalcona; (d) glicósido de flavonol; (e) resorcinol; (f) xantona; (g) diterpeno; (h) triterpeno do tipo cicloartenol .....	22
<b>Figura 4</b> - Formas radicalar (a) e não radicalar (b) do DPPH .....	26
<b>Figura 5</b> - Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio .....	26
<b>Figura 6</b> - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe <sup>3+</sup> .....	27
<b>Figura 7</b> - Percentual extração de compostos fenólicos (CFT) e flavonoides totais (FT) obtidos nos ensaios do planejamento experimental em comparação com o extrato obtido por método convencional .....	48
<b>Figura 8</b> - Efeitos estipulados pelo gráfico de Pareto em função das variáveis independentes e suas interações para a obtenção das respostas do planejamento experimental .....	50
<b>Figura 9</b> - Curvas de contorno para análise das respostas obtidas no planejamento experimental .....	53
<b>Figura 10</b> - Perfil de valores preditos e desejabilidade para otimização do tempo de agitação (dias) e proporção massa/volume (%) para extração de geoprópolis utilizando agitação assistida por ultrassom.....	54
<b>Figura 11</b> - Contração inibitória mínima dos extratos de geoprópolis .....	57
<b>Figura 12</b> - Contração bactericida mínima dos extratos de geoprópolis .....	58
<b>Figura 13</b> - Cromatograma obtido para a amostra U.A .....	61
<b>Figura 14</b> - Cromatograma obtido para a amostra U.B.R .....	62
<b>Figura 15</b> - Cromatograma obtido para a amostra U.C .....	62
<b>Figura 16</b> - Estruturas dos constituintes majoritários identificados na geoprópolis da abelha sem ferrão uruçú boca de renda ( <i>Melipona seminigra pernigra</i> ): a) sesquiterpeno, b) composto fenólico .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estudos de composição química e atividades biológicas de própolis de abelhas sem ferrão .....	20
<b>Tabela 2</b> - Níveis das variáveis independentes .....	34
<b>Tabela 3</b> - Planejamento experimental aplicado na extração por método combinado (agitação assistida por ultrassom) .....	35
<b>Tabela 4</b> - Composição físico-química da geoprópolis bruta .....	42
<b>Tabela 5</b> - Composição mineral da geoprópolis bruta .....	44
<b>Tabela 6</b> - Resultados das análises do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (ensaio DPPH) obtidos no planejamento experimental para a amostra da abelha urucu cinzenta.....	47
<b>Tabela 7</b> - Resultados da análise de variância ( $p < 0,05$ ) para as respostas obtidas no planejamento experimental .....	51
<b>Tabela 8</b> - Resultados das análises do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante obtidos na condição ótima .....	55
<b>Tabela 9</b> - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.A .....	63
<b>Tabela 10</b> - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.B.R .....	64
<b>Tabela 11</b> - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.C .....	66

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
	2.1. Objetivo geral .....	15
	2.2. Objetivos específicos .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
	3.1 As abelhas sem ferrão (ASF) .....	16
	3.2 O Gênero <i>Melipona</i> .....	18
	3.3 A geoprópolis .....	18
	3.4 Composição química e compostos bioativos da geoprópolis .....	19
	3.4.1 Extração de compostos bioativos .....	23
	3.4.2 Planejamento de experimentos .....	24
	3.5 Capacidade antioxidante .....	25
	3.6 Atividade antimicrobiana .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
	4.1 Obtenção das amostras .....	31
	4.2 Caracterização físico-química da geoprópolis .....	31
	4.2.1 Composição centesimal .....	31
	4.2.2 Teor de cera .....	32
	4.2.3 Sólidos solúveis em metanol .....	33
	4.3 Determinação de minerais por absorção atômica .....	33
	4.4 Planejamento experimental aplicado para obtenção dos extratos de geoprópolis por método combinado (agitação assistida por ultrassom) .....	34
	4.5 Extração convencional de geoprópolis por agitação em shaker .....	36
	4.6 Teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais .....	36
	4.6.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos .....	36
	4.6.2 Quantificação dos flavonoides totais nos extratos .....	37
	4.7 Determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) .....	37
	4.8 Análises realizadas na condição otimizada dos extratos de geoprópolis .....	38
	4.8.1 Captura do Radical Livre ABTS <sup>•+</sup> .....	38
	4.8.2 Poder redutor de Fe <sup>+2</sup> (FRAP) .....	38
	4.8.3 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de geoprópolis .....	39
	4.8.3.1 Ativação do inóculo .....	39

4.8.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
4.8.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	40
4.8.4 Perfil de compostos voláteis dos extratos de geoprópolis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) .....	40
4.9 Análise estatística .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 Composição físico-química da geoprópolis bruta.....	42
5.2 Composição mineral da geoprópolis bruta .....	44
5.3 Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis obtidos no planejamento experimental .....	46
5.4 Análise estatística do planejamento experimental .....	49
5.5 Atividade antimicrobiana.....	56
5.6 Composição química dos extratos de geoprópolis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).....	61
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

As abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponíneos, são contribuintes vitais para a manutenção de muitos ecossistemas, pois são os principais polinizadores das árvores nas áreas onde vivem. Na natureza, eles preferem fazer seus ninhos em árvores ocas, atualmente mais de 600 espécies pertencentes ao grupo de abelhas sem ferrão já foram documentadas em todo o mundo, sendo que mais de 300 destas espécies são encontradas apenas no Brasil (BACELAR-LIMA et al., 2006; VALCANIA et al., 2022), dentre elas, temos a urucu amarela (*Melipona flavolineata*), urucu boca de renda (*Melipona seminigra pernigra*) e urucu cinzenta (*Melipona fasciculata*), que serão o objeto de estudo desta pesquisa.

O nome urucu tem origem na língua indígena tupi "eiru'su" e significa "abelhas grandes". No entanto, são conhecidas por diversos nomes populares, dependendo da região do país. Tais espécies são encontradas em áreas tropicais e subtropicais e possuem um alto nível de estrutura social (SILVA, A. et al., 2020).

A própolis é o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen (BRASIL, 2001). É utilizada pelas abelhas na proteção da colmeia, atuando em sua estabilidade estrutural e na vedação de frestas, sendo utilizada ainda para embalsamar invasores, impedindo sua decomposição e como agente antisséptico, prevenindo contra a presença de doenças e do crescimento e proliferação de micro-organismos que possam infectar a colônia (ZUNINI et al., 2010).

No caso das abelhas sem ferrão, a própolis é denominada de geoprópolis, recebendo esta designação devido as abelhas a misturarem ao barro; tanto a própolis como a geoprópolis são eficientes antioxidantes e suplementos com alto potencial preventivo para doenças crônicas degenerativas (SOUZA et al., 2013).

Assim o presente trabalho pretende avaliar a composição química e mineral, atividade antioxidante, antimicrobiana e perfil de compostos voláteis da geoprópolis de abelhas amazônicas do nordeste do estado do Pará, visto que até o presente momento, dados sobre suas propriedades são extremamente escassos na literatura. Dessa forma, a presente pesquisa de caráter exploratório, pretende contribuir com informações importantes para o conhecimento das atividades exibidas pela geoprópolis produzida na região amazônica, auxiliando na progressão de estudos das abelhas sem ferrão.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo desta Dissertação foi avaliar a composição química, capacidade antioxidante e antimicrobiana de extratos de geoprópolis de abelhas sem ferrão amazônicas.

### 2.2. Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos foram definidos para atingir o objetivo geral da Dissertação:

- Realizar a caracterização físico-química da geoprópolis bruta de três espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona flavolineata*, *Melipona seminigra pernigra* e *Melipona fasciculata*);
- Avaliar a composição mineral presente nas amostras brutas de geoprópolis;
- Otimizar a extração de geoprópolis por método combinado de agitação e sonicação utilizando planejamento experimental;
- Quantificar os compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes nos extratos através de análises de espectrofotometria;
- Determinar o potencial antioxidante dos extratos;
- Avaliar as propriedades antimicrobianas *in vitro* dos extratos;
- Determinar o perfil de compostos voláteis dos extratos da condição ótima (para cada uma das espécies);



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

---

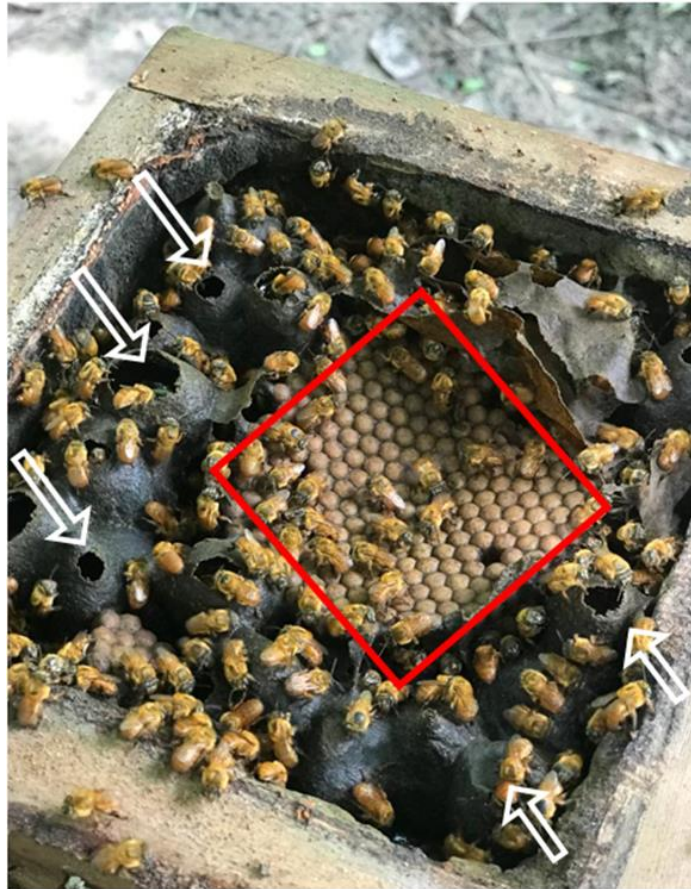
#### 3.1 As abelhas sem ferrão (ASF)

As abelhas sem ferrão, também conhecidas como abelhas nativas ou indígenas, fazem parte de um grupo de abelhas eussociais (se organizam em sociedade, com divisão de tarefas entre as diversas castas da colmeia) e habitam a região tropical e subtropical do globo terrestre, sendo encontradas na América do Sul e Central, África, Sudoeste da Ásia e Austrália. São pertencentes a família Hymenoptera, subfamília Meliponinae. Atualmente, mais de 600 espécies de abelhas sem ferrão já foram catalogadas em todo o mundo, estando classificadas em 32 gêneros, com possibilidade de ainda serem caracterizadas um número considerável de espécies, que até o momento não foram descobertas (ÁVILA et al., 2018; VALCANAI et al., 2022).

De acordo com Gomes et al. (2022) as diversas espécies da subfamília Meliponinae (abelhas sem ferrão) podem apresentar características diferentes das apresentadas por *Apis mellifera*, principalmente em relação ao seu tamanho, geralmente menor, cores variadas do corpo e ausência de ferrão (ferrão atrofiado). Além disso, as abelhas sem ferrão fazem voos mais curtos, possuindo um raio de alcance menor para coletar alimentos e demais materiais necessários para a manutenção da vida na colmeia, isso é interessante por exemplo, quando o meliponicultor busca a produção de um tipo de mel específico de determinada florada, o que também é possível com as abelhas *Apis mellifera*, no entanto, nesse último caso, precisa de uma área muito maior de cobertura da vegetação de interesse, uma vez que essas abelhas percorrem um raio maior para coleta de alimentos.

Gomes et al. (2022) ainda explicam que as ASF normalmente não fazem grandes seleções dos recursos florais, ou seja, coletam o que está mais acessível e disponível no momento. Em relação à colmeia, esta é dividida em um local onde ficam as células de cria no formato de favos ou cachos, e outro local destinado aos potes de armazenamento de alimento (mel e pólen), conforme pode ser observado na Figura 1. As variações também ocorrem entre as próprias espécies de ASF, que apresentam diferenças em relação a aspectos comportamentais, sistemas de defesa e comunicação, estratégias de forrageamento, densidades populacionais, arquiteturas das colmeias, entre outros, o que torna esse grupo muito interessante devido a essas características heterogêneas, sendo possível o desenvolvimento de diversos estudos, com resultados promissores para o campo da meliponicultura.

**Figura 1** - Colmeia de abelha urucu amarela (*Melipona flavolineata*) com favos de cria no centro e potes de alimento (mel e pólen) nas laterais indicados pelas setas.



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

As abelhas sem ferrão exercem um papel de suma importância na preservação da biodiversidade nas regiões tropicais e subtropicais, devido a seus eficientes serviços de polinização, sendo responsáveis por cerca de 40 a 90% da polinização das plantas nativas (PUCHOLOBEK et al., 2022).

Estudos desenvolvidos pelos mais variados órgãos de pesquisa, tem possibilitado o aperfeiçoamento de técnicas de manejo para a criação racional das ASF, o que tem possibilitado contínuo crescimento da meliponicultura, que vem se tornando uma fonte de renda a mais em diversas regiões, por meio da comercialização de diversos produtos, incluindo colônias, mel, própolis, geoprópolis e serviços de polinização em diversas culturas agrícolas (ZAWAWI et al., 2022).

A região amazônica apresenta uma vasta diversidade floral, com abundância de espécies fornecedoras de néctar, pólen e resinas, o que em conjunto com o clima quente se torna atrativo para uma grande variedade de espécies de abelhas que habitam essa região. Nessa região, o mel recebe destaque como o principal produto explorado, porém estudos apontam a existência de

diversas espécies de abelhas que apresentam potencial elevado para a produção de própolis, geoprópolis, batumes, cerumes e pólen (CONTRERA; MENEZES; VENTURIERI, 2011).

### 3.2 O Gênero *Melipona*

As espécies de abelhas do gênero *Melipona*, estão entre as espécies nativas das Américas, que são amplamente manejadas para a produção de mel e demais produtos, como a cera e o pólen, tendo uma longa história com os povos dessa região, pois essas abelhas já eram criadas antes mesmo da chegada dos europeus ao continente americano. Cada espécie possui preferências alimentares; embora sejam descritas como abelhas generalistas, por se adequarem aos recursos alimentares disponíveis (PIMENTEL et al., 2021).

Segundo Magalhães & Venturieri (2010), na mesorregião nordeste do Pará, duas espécies comumente manejadas são a *Melipona fasciculata* e a *Melipona flavolineata*, conhecidas popularmente como urucu cinzenta e urucu amarela, respectivamente, que são consideradas boas produtoras de mel, com registros de produtividade média variando de 3 a 4 L de mel por colmeia/ano.

Dessa forma, essas espécies foram escolhidas para compor o presente estudo por serem as espécies mais criadas pelos meliponicultores da região estudada e além disso, também acrescentamos outra espécie que ocorre naturalmente na região, a *Melipona seminigra pernigra* (conhecida como urucu boca de renda), por ser uma espécie com poucos dados na literatura, sobre seu manejo e características de seus produtos, indicando a necessidade de ampliar os conhecimentos sobre tal espécie.

Apesar da ocorrência natural de abelhas sem ferrão na maioria das regiões do Brasil e em outras regiões do mundo, ainda há necessidade de estudos sobre as características e composição da geoprópolis produzida por tais espécies.

### 3.3 A geoprópolis

A geoprópolis é uma mistura de fontes vegetais de resina, cera e solo preparada pelas abelhas sem ferrão (Meliponinae) e tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, hemorróidas, gastrite e tosse (COELHO et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2022).

Diversos estudos científicos têm comprovado que a geoprópolis possui propriedades antimicrobianas, antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias e cicatrizante (BARBOZA et al., 2020; SOUSA et al., 2019; SOUSA-FONTOURA et al., 2020). Essas propriedades são

atribuídas à presença de diversos compostos químicos presentes na geoprópolis, como os flavonoides, fenil e ésteres, lignanas, estilbenos, terpenos, açúcares, hidrocarbonetos e minerais (HUANG et al., 2014).

Segundo Ferreira (2018), a meliponicultura é descrita como a atividade de criação racional de ASF, para a obtenção de produtos como o mel, cera, própolis e geoprópolis, sendo o geoprópolis composto por extratos vegetais, enzimas digestivas, cera e solo, o que lhe confere concentrações elevadas em compostos minerais.

Na Amazônia, a geoprópolis de abelha sem ferrão ainda não ganhou importância comercial devido à falta de informações sobre sua composição química e benefícios à saúde, o que reforça a importância deste estudo, uma vez que tal região é altamente propícia para o desenvolvimento de novas pesquisas científicas, devido apresentar uma vasta biodiversidade e bom desenvolvimento da meliponicultura, que vem cada vez mais se desenvolvendo na região, sendo uma importante aliada na geração de renda de famílias da região amazônica, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida no campo e ainda se destaca como uma peça fundamental para conservação da floresta.

Como já abordado anteriormente, as características peculiares existente na região amazônica, como flora diversificada, grande número de espécies de abelhas e um clima quente e úmido, justificam os estudos sobre a composição química da geoprópolis, que são de extrema importância para a caracterização deste produto em nossa região (SIQUEIRA et al., 2022).

### **3.4 Composição química e compostos bioativos da geoprópolis**

A própolis de abelhas sem ferrão pode apresentar composição variável em função da espécie da abelha, colônia e condições ambientais, e principalmente da origem vegetal, pois os óleos florais podem conter ácidos graxos saturados, parafinas, óleos, ésteres, aminoácidos, carotenoides, fenólicos, isoprenoides, glicosídeos e saponinas, o que interfere também na sua composição (SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017). Estudos recentes têm focado em avaliar a composição química da própolis de abelhas sem ferrão, em relação a presença de compostos bioativos e suas potenciais funcionalidades ao organismo humano, conforme observado na Tabela 1.

Os compostos bioativos são metabólitos secundários produzidos por várias espécies de plantas, nas quais atuam como defesa contra parasitas, predadores e infecções por agentes patogênicos. Estes compostos trazem inúmeros benefícios para a saúde, pois atuam como sistema de defesa e contribuem para o bem-estar humano, possuindo também eficiente ação

antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, dentre outras, sendo ainda capazes de exercer prevenção e inibição da ação dos radicais livres no organismo humano (AGUIAR, 2017; BÁIDEZ et al., 2007).

**Tabela 1** - Estudos de composição química e atividades biológicas de própolis de abelhas sem ferrão.

<b>Espécie</b>	<b>Classe de compostos identificados</b>	<b>Mecanismo de ação avaliado (<i>in vitro</i>)</b>	<b>Autor</b>
<i>Geniotrigona thoracica</i> , <i>Heterotrigona itama</i> , e <i>Tetrigona binghami</i>	Ácidos aromáticos, terpenos, flavonoides e ácidos fenólicos	Atividade antimicrobiana contra cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e atividade antioxidante (ensaio DPPH)	Abdullah et al. (2020)
<i>Melipona quadrifasciata anthidioidesaff. Postica</i>	Ácidos fenólicos e flavonoides	Atividade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , <i>S. warningi</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>L. acidophilus</i> e atividade antioxidante (ensaio DPPH, ABTS, FRAP e ORAC)	Rubinho et al. (2020)
<i>Heterotrigona itama</i>	Terpenóides	Atividade anti-inflamatória (diminuição de mediadores inflamatórios iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-10 e aumento de mediadores antioxidantes HO-1)	Zhang et al. (2020)
<i>Melipona subnitida</i>	Compostos fenólicos	Atividade antioxidante (ensaio DPPH e $\beta$ -caroteno/ácido linoléico)	Ferreira et al. (2022)
<i>Melipona quadrifasciata</i> <i>quadrifasciata</i> e <i>Tetragonisca angustula</i>	Mono e sesquiterpenos (tendo o $\alpha$ -pineno como composto majoritário)	Atividade contra antimicrobiana <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Valcanaia et al. (2022)

Fonte: Dados da Pesquisa, (2024).

Nota: DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico); FRAP: poder antioxidante de redução do ferro; ORAC: capacidade de absorção dos radicais oxigenados; iNOS: enzima óxido nítrico sintase indusível; IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ ; IL-10: interleucina-10, HO-1: heme oxigenasse-1.

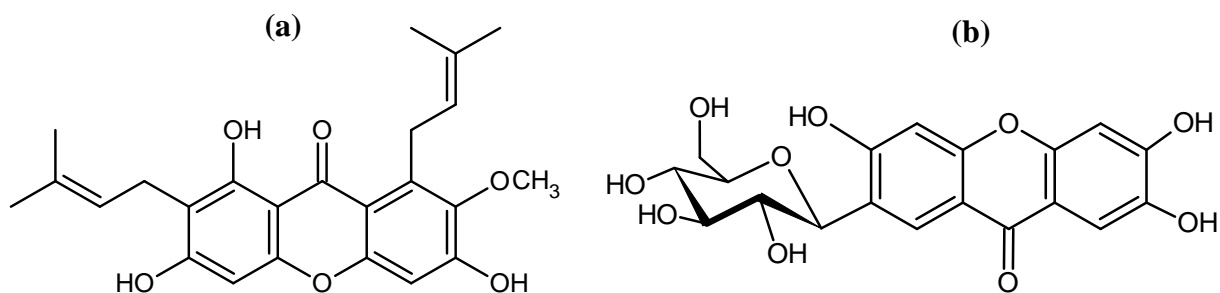
A própolis possui em sua composição diversos compostos bioativos, que lhe conferem diversas atividades biológicas, como ação antioxidante e antimicrobiana. Segundo Ribeiro (2011), dentre os compostos fenólicos da própolis, destacam-se os flavonoides, como uma das principais substâncias biologicamente ativas, assim como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos.

Estudos significativos foram conduzidos por Bankova et al. (1998) que identificaram mais de 50 compostos, incluído ácidos alifáticos, compostos aromáticos (ácidos, aldeídos e

álcoois), açúcares, flavonoides, di e triterpenos em geoprópolis de *Melipona compressipes* (coletada no estado do Piauí, Brasil), *M. quadrfasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes* (ambas coletadas no estado do Paraná, Brasil). Dutra et al. (2008) constataram a presença de elevado teor de compostos fenólicos, além de triterpenos e saponinas em amostras de geoprópolis da abelha *M. fasciculata*, coletadas na Baixada maranhense, Brasil.

Chong e Chua (2020) utilizaram a técnica de extração assistida por ultrassom para obter diferentes extratos de própolis da abelha sem ferrão *H. itama*, coletadas em Melaka, Malásia. O estudo demonstrou que o extrato com melhor atividade antioxidante foi o extrato etanólico ácido (com pH ajustado para 3,0), na qual foi identificada a presença de diversos compostos fenólicos. Este extrato apresentou elevados teores de flavononas, conhecidas pelo seu notável comportamento antioxidante, como galoil pinocembrina, galoil naringenina e galoil eriodictiol, além de mangostina (Figura 2 a) e mangiferina (Figura 2 b).

**Figura 2** - Estruturas de constituintes identificados na própolis da abelha sem ferrão *H. itama*: a) mangostina, b) mangiferina.

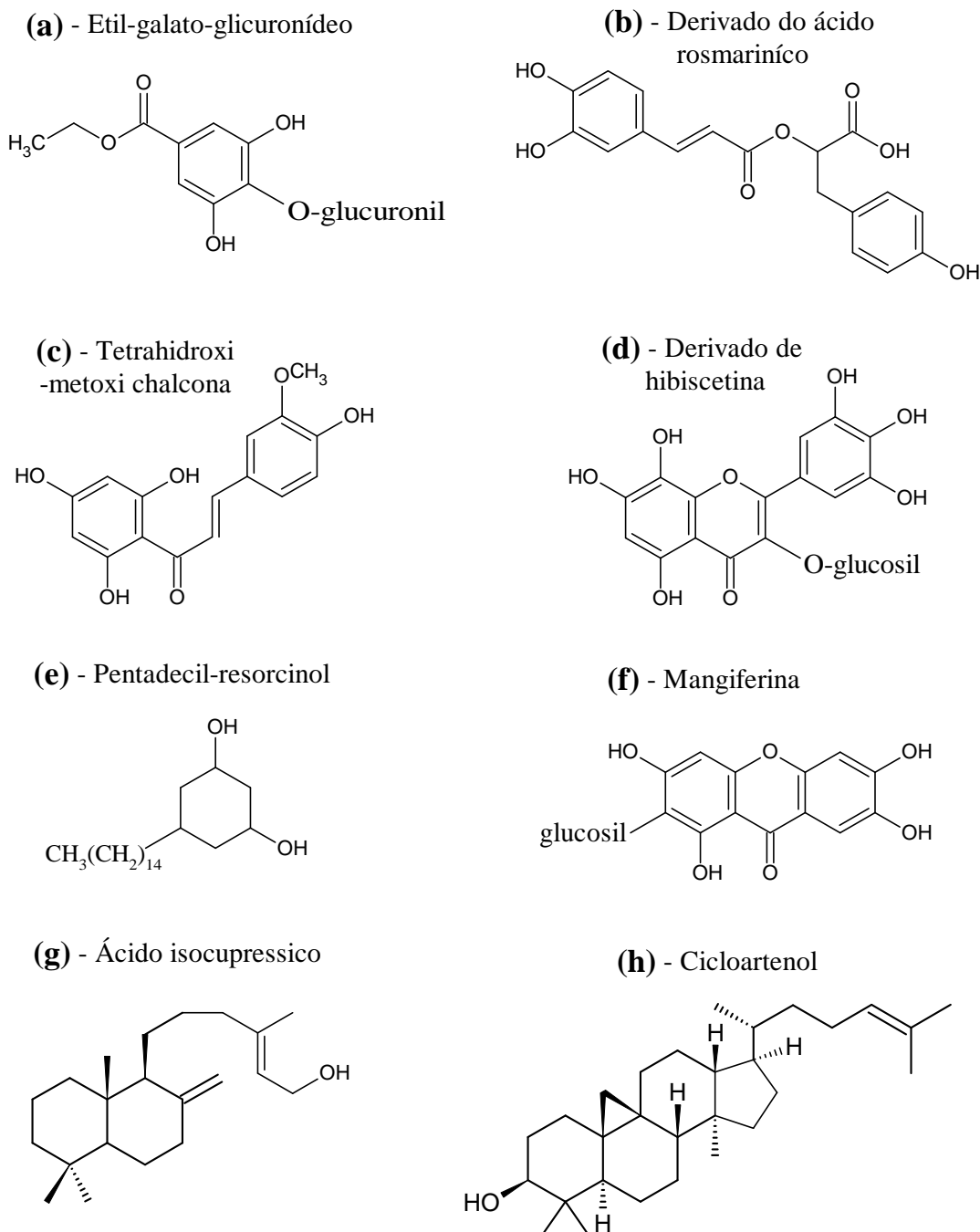


No trabalho de Souza, S. et al. (2018) a geoprópolis de jandaíra (*Melipona subnitida*), coletada na região semiárida, estado da Paraíba, Brasil, apresentou os compostos fenólicos galoil-hexosídeos, ácido elágico, acil-(cinamoil/cumaroil)-hexosídeos, acil-(cinamoil/cumaroil)-galoil-hexosídeos e flavonóides (agliconas e *O*-glicosídeos acilados), que interferem diretamente na capacidade da geoprópolis em exercer atividades biológicas, tais como a capacidade antioxidante.

Negri et al. (2022), realizaram análise em própolis da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. postica*, coletada no estado do Maranhão, Brasil, na qual foram caracterizados 100 compostos, com representantes de diferentes classes de metabólitos secundários, incluindo ácidos benzóico e cinâmico, flavonóides (chalconas, flavona- C -glicosídeos, flavonol agliconas e glicosídeos), alquil e alquenil resorcinóis, xantonas, diterpenos, triterpenóides do tipo cicloartano, triterpenóides pentacíclicos, alcalóides pirrolizidínicos e amidas de ácido

hidroxicinâmico. A Figura 3 contém representantes das classes de metabólitos caracterizados no estudo.

**Figura 3** - Estruturas dos constituintes caracterizados da própolis da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. postica* (Apidae, Meliponini): (a) Ácido benzóico; (b) ácido cinâmico; (c) chalcona; (d) glicósido de flavonol; (e) resorcinol; (f) xantona; (g) diterpeno; (h) triterpeno do tipo cicloartenol.



Os autores concluíram que ocorreu uma diferença entre os perfis químico das amostras de acordo com o período do ano (Jan–Mar, April–Set, Out–Dez) e que também ocorrem diferenças consideráveis na composição química anualmente, indicando que a composição

desse material produzido pelas abelhas sem ferrão é complexa e pode variar de acordo com a flora, a região geográfica, a espécie de abelha e o clima (NEGRI et al., 2022).

#### 3.4.1 Extração de compostos bioativos

A extração de compostos bioativos normalmente é realizada com a utilização de técnicas que incluem extração em Soxhlet, maceração e extração com solventes orgânicos, tais como o hexano por exemplo. No entanto, a utilização de solventes orgânicos convencionais muitas vezes implica em problemas ambientais como o alto consumo de energia, geração de resíduos e poluição, uma vez que muitos desses solventes são provenientes de fontes não renováveis (petróleo), além de representarem inconvenientes relacionados à segurança operacional (inflamáveis) e de saúde, relacionada a bioacumulação (HASHEMI et al., 2022).

Com isso, torna-se indispensável à utilização de métodos sustentáveis para a extração de compostos bioativos naturais, a chamada Química Verde, que tem se mostrado promissora, utilizando técnicas como extração com fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, utilização de solventes eutéticos e ainda os solventes de base biológica, como o etanol, que são obtidos a partir de fontes renováveis amplamente disponíveis, principalmente as biomassas vegetais (HASHEMI et al., 2022).

Nesse contexto, o etanol é um solvente verde, que além de ser produzido a partir de fontes sustentáveis, ainda pode ser facilmente recuperado e reutilizado, sendo considerado biodegradável e seguro, e surge como uma alternativa viável para utilização nos processos de extração de compostos bioativos, substituindo solventes orgânicos já consolidados (SANTOS, 2018).

Uma outra tecnologia verde que também vem sendo utilizada com resultados promissores é a extração assistida por ultrassom, técnica considerada adequada para a otimização de extração de compostos bioativos, devido aumentar a escala e eficiência do processo, alcançando elevados rendimentos (WEN et al., 2018).

Segundo Chemat et al. (2017), essa técnica representa uma alternativa economicamente viável às abordagens convencionais para extração de compostos de alimentos e produtos naturais. Os principais benefícios incluem redução significativa no tempo de extração e processamento, bem como no consumo de energia e solventes, resultando em economia de custos e diminuição dos impactos ambientais.



Recentemente, estudos têm aplicado esse método para obter extratos de própolis e geoprópolis, sendo destacado por Medina-Jaramillo et al. (2022) como um processo de baixo custo para melhorar o rendimento na extração de compostos bioativos dessas matérias-primas.

O aumento no rendimento da extração ocorre devido a aceleração da taxa de transferência de massa entre a própolis e o solvente. Nesse processo a energia ultrassônica produz bolhas de cavitação que ativam continuamente os processos de formação, crescimento e implosão de bolhas, produzindo altas forças de cisalhamento e proporcionando uma extração completa (CHONG, F. & CHUA, L. 2020).

Segundo Chemat et al. (2017) a extração assistida por ultrassom ocorre através de diferentes mecanismos independentes ou combinados, como fragmentação (devido a colisões entre partículas e a ondas de choque criadas pelo colapso de bolhas de cavitação no líquido), erosão, capilaridade, detexturização e sonoporação (que resulta na liberação do conteúdo celular no meio extrativo).

#### 3.4.2 Planejamento de experimentos

Para realização de uma investigação mais aprofundada sobre os compostos bioativos presentes na geoprópolis, torna-se interessante a utilização de um planejamento de experimentos, o que segundo (Matos; Vale & Mesquita, 2022) permite a execução de experimentos com mudanças nas variáveis de entrada, possibilitando o estabelecimento de condições, quantidades e fatores que terão impacto significativo nas respostas.

O modelo matemático obtido no planejamento é capaz de expressar as relações entre os fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes), e pode ser utilizado para tomadas de decisões importantes, viabilizando melhorias em processos e sistemas. Assim, a utilização do planejamento de experimentos pretende atender a dois grandes objetivos: menor custo e maior precisão estatística na resposta (MATOS; VALE; MESQUITA, 2022).

Nesse sentido é de fundamental importância a escolha de planejamentos experimentais adequados, que sejam capazes possibilitar a redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade dos resultados, fornecendo informações e dados estatísticos precisos (LOPES; LOPES; FARIA, 2022).

Dentre os diferentes tipos de design experimental, o planejamento composto central (do inglês, central composite design –CCD) tem sido bastante utilizado como parte do processo de otimização na busca do produto ideal. O CCD também é um tipo de planejamento muito útil

quando combinado à metodologia de superfície de resposta. Este planejamento pode levar à criação de modelos de segunda ordem (quadrático) sem a necessidade de utilizar um experimento fatorial completo de três níveis, uma vez que o CCD tem como característica peculiar a presença de pontos axiais, que servem para medir curvaturas nas superfícies de resposta o que pode por vezes levar a um modelo de superfície quadrática (NJOKU et al., 2023).

Embora existam trabalhos como o de Cardozo et al. (2015), que utilizaram planejamento de experimentos para extração de compostos fenólicos e flavonoides da própolis de *T. angustula* e geoprópolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. marginata*, coletadas no estado do Paraná, Brasil, são raros os trabalhos na literatura atual que têm utilizado o planejamento de experimentos para otimizar a extração de compostos bioativos de geoprópolis, enfatizando a necessidade de adoção deste procedimento, visando proporcionar uma extração mais efetiva, de forma que se aproveite ao máximo os compostos presentes nesse material.

### **3.5 Capacidade antioxidante**

Segundo Barbosa et al. (2010), a ação desenvolvida pelo sistema de defesa antioxidante é a inibição e/ou redução da ação danosa provocada pelos radicais livres ou espécies reativas não radicais, que por possuir a capacidade de reduzir a atividade oxidativa, diminui os danos cumulativos que eventualmente podem levar ao aparecimento de doenças como o câncer.

O autor ainda explica que a atividade antioxidante pode ser exercida por meio de diversos mecanismos de ação, sendo eles: impedimento da formação dos radicais livres ou espécies reativas não radicais (sistema de prevenção), impedimento da sua ação (sistemas varredores) e ainda reconstrução e reparação das estruturas afetadas (sistema de reparo).

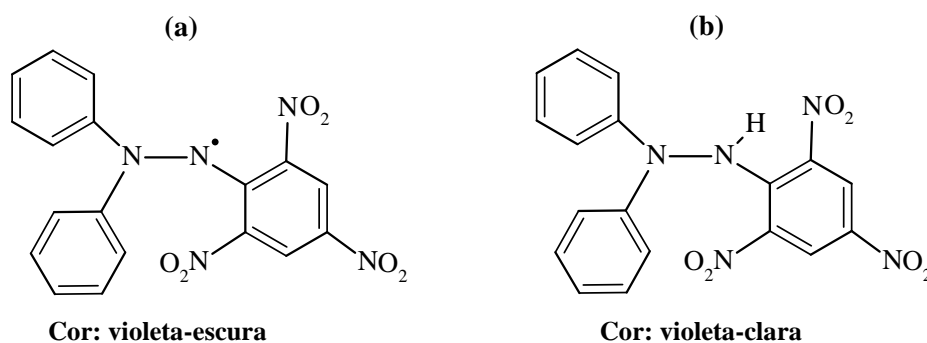
Alves et al. (2010) esclarece que o efeito deletério exercido pelos radicais livres sobre as células e sua relação com determinadas doenças, atuando como causador ou agravante, tem impulsionado a busca por novas substâncias com capacidade para prevenir ou minimizar os danos oxidativos causados às células vivas. Além disso, como os radicais livres também causam danos a plantas e alimentos, a adição de antioxidantes aos alimentos industrializados tem se tornado uma prática comum, justificando o atual interesse pela pesquisa de novos compostos antioxidantes.

De acordo com Aguiar (2017) as diversas espécies radicais livres e as diferentes formas que agem no organismo, não permitem, até o presente momento, a aplicação de um método simples e preciso que determine a atividade antioxidante de forma universal, assim tem surgido diferentes métodos para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, como por exemplo, os

métodos espectrofotométricos: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS - ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e o FRAP (“Ferric Reducing Antioxidant Power”) que por serem simples, rápidos e possuir reprodutibilidade são uns dos mais utilizados.

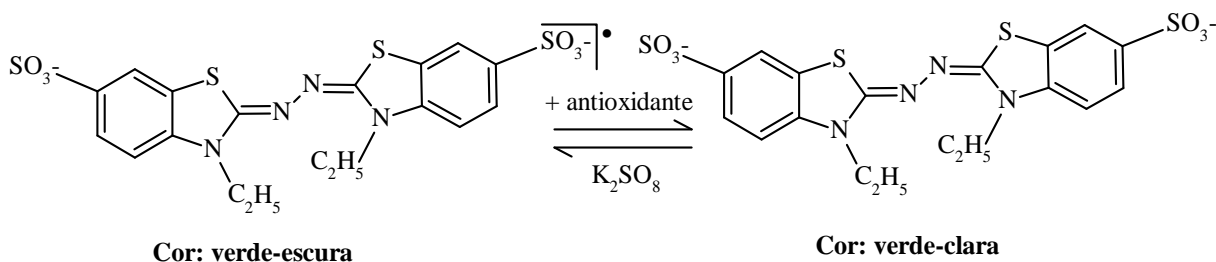
A molécula de DPPH é um radical livre, não biológico e estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado no átomo de Nitrogênio. Essa deslocalização confere à molécula uma cor violeta, com uma banda de absorção em etanol em torno de 520 nm. O método baseia-se em medir a capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 4), reduzindo-o a hidrazina. Quando uma substância antioxidante, atuando por transferência de elétrons ou por doação de átomos de hidrogênio, é adicionada à solução de DPPH, ocorre a formação de hidrazina, acompanhada por uma mudança de cor de violeta para amarelo pálido (ALVES et al. 2010).

**Figura 4** - Formas radicalar (a) e não radicalar (b) do DPPH.



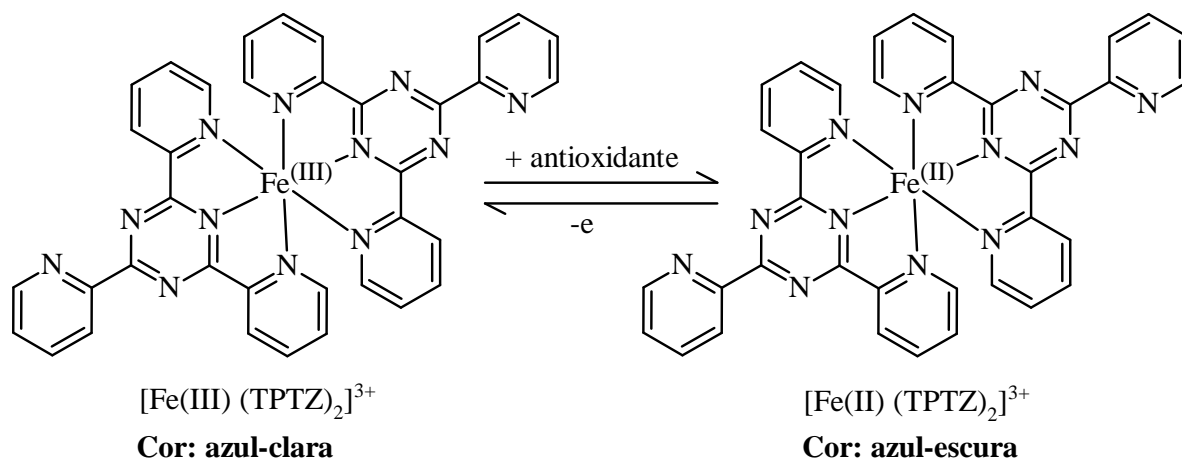
Outro método bastante utilizado é o que tem como princípio a redução do radical ABTS - ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). A reação entre o radical ABTS (que pode ser pré-formado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática) e o antioxidante padrão ou amostra a ser analisada, resulta na descoloração do ABTS (Figura 5), que é medido pela diminuição da sua absorbância (ARNAO; CANO; ACOSTA, 2001; RUFINO et al., 2007).

**Figura 5** - Estabilização do radical  $ABTS^{\bullet+}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



O ensaio FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) proposto por Benzie & Strain (1996), avalia o poder antioxidante, através da redução de íon férrico para ferroso em pH baixo, o que resulta na formação de um complexo ferroso-tripiridiltriazina de coloração azul escuro (Figura 6). Os valores FRAP são obtidos comparando a alteração da absorvância a 593 nm nas misturas de reação de teste com aquelas contendo íons ferrosos em concentração conhecida.

**Figura 6** - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^{3+}$ .



A capacidade de uma substância em atuar como agente antioxidante é muito importante, sendo considerada uma variável de extremo interesse no desenvolvimento de medicamentos que atuem na prevenção de doenças cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas e cancerígenas, relacionadas ao estresse oxidativo (Kurek-Górecka (2022)).

Pesquisas tem sido desenvolvidas utilizando simultaneamente os diferentes métodos disponíveis, afim de analisar de forma mais abrangente o potencial da geoprópolis como agente antioxidante. Kasote et al. (2019) avaliaram extratos de sete amostras de própolis de abelha sem ferrão coletadas na Índia, constatando que todas as amostras exerceram atividades antioxidantes nos ensaios DPPH, ABTS e FRAP. Rubinho et al. (2020) também constataram que a geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* coletada em Minas Gerais, Brasil, exerceu a ação antioxidante nos ensaios DPPH, ABTS, FRAP e ORAC.

Diversos estudos têm demonstrado que a capacidade antioxidante da própolis e geoprópolis está diretamente relacionada com a presença de compostos fenólicos (RAMÓN-SIERRA et al., 2019; RUBINHO et al., 2020; SILVA, P. et al., 2020; SOUSA-FONTOURA et al., 2020), enfatizando a relevância da geoprópolis como uma potente fonte de compostos bioativos naturais, com potenciais benefícios à saúde.

No trabalho de Sousa-Fontoura et al. (2020) amostras de geoprópolis de jandaíra (*Melipona subnitida*) apresentaram significativa atividade sequestrante de radicais

livres, eficientes para evitar os efeitos tóxicos provocados pelos radicais livres. Os autores sugeriram que a elevada diversidade de compostos fenólicos totais encontrados nessa matéria prima, principalmente os fenilpropanóides e flavonóides foram os responsáveis por essa ação.

### **3.6 Atividade antimicrobiana**

Substâncias com ação antimicrobiana são aquelas que inibem o crescimento ou causam a morte de microrganismos, podendo ser de origem natural (antibióticos) ou sintética (quimioterápicos) (MOTA et al., 2010). Os antibióticos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas, reduzindo significativamente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas em todo o mundo. No entanto, ao longo do tempo, observou-se que certos microrganismos podem desenvolver mecanismos de sobrevivência na presença desses agentes, tornando-se tolerantes ou resistentes aos antimicrobianos (CALDAS; DE OLIVEIRA; DA SILVA, 2022).

A utilização irregular de antibióticos, bem como a capacidade desses microrganismos em se adaptar aos ambientes em constante mudança e aumento de determinados estresses, são apontados como uma das causas para o desenvolvimento dessa tolerância ou resistência, o que pode comprometer as opções de tratamento, tornando o controle de microrganismos em um dos mais importantes aspectos de saúde pública, bem como na conservação de alimentos (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

O aumento de casos de infecções de natureza bacteriana resistentes, somado a dificuldade do controle da proliferação bacteriana em instalações da indústria alimentícia, tem impulsionado a busca ativa de novas alternativas terapêuticas aos antimicrobianos atualmente disponíveis, e nessa vertente, o uso de bioativos naturais tem sido apontado como a possível solução para esse problema (SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015).

Os antimicrobianos naturais são compostos que possuem a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, como bactérias e fungos. Esses agentes podem ser derivados de fontes microbianas, animais ou vegetais. O interesse por antimicrobianos naturais tem aumentado devido ao seu potencial uso como conservantes alimentares. Eles ajudam a garantir a segurança e a qualidade dos produtos, além de aumentar a vida útil de alimentos perecíveis, oferecendo uma alternativa mais natural e saudável aos conservantes sintéticos (BARROS et al., 2020).

A verificação da atividade antimicrobiana da própolis contra uma variedade de bactérias já foi estudada para algumas espécies e a especificidade em termos de sua composição química

pode ser a vantagem deste produto, com ação antibacteriana. Em relação à atividade antimicrobiana da geoprópolis de abelhas sem ferrão, tem-se como principais responsáveis os flavonóides e alguns ácidos fenólicos (SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017).

Pesquisas com própolis e geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão coletadas em diversos países do mundo, tem demonstrado que este material possui propriedades antimicrobianas que já foram comprovadas contra cepas gram-positivas e também contra cepas gram-negativas. Abdullah et al. (2020) avaliaram própolis das abelhas sem ferrão *Geniotrigona thoracica*, *Heterotrigona itama*, e *Tetrigona binghami* coletadas no distrito de Tutong, Brunei Darussalam, constatando que exibiram ação antimicrobiana contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Dos santos et al. (2023), observaram que o extrato de geoprópolis da abelha *Melipona subnitida* coletada em Pernambuco, Brasil, exibiu ação contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e a própolis de *Scaptotrigona depilis*, coletada no mesmo local, foi eficiente contra *E.coli*; Isidorov et al. (2022) avaliaram própolis e geoprópolis das abelhas *Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes*, *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi* coletadas na província de Misiones, Argentina, constatando que foram eficazes contra *E. coli* e *S. aureus*;

Dentre os microrganismos de interesse, relatados como agentes causadores de contaminação de alimentos, encontram-se as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambos sendo responsáveis por inúmeros casos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's) (MILLEZI et al., 2014).

*E. coli* é um agente causador de gastroenterites, a contaminação ocorre principalmente através do contato com material fecal ou com superfícies contaminadas, é uma bactéria Gram-negativa que possui diferentes fatores de virulência, capazes de gerar produtos e subprodutos tóxicos, além de conter endotoxina em sua parede celular, exercendo uma série de efeitos biológicos que desencadeiam uma reação inflamatória (ANDRADE et al., 2019)

A bactéria *S. aureus*, por sua vez, é responsável por causar surtos de toxiose, sendo que o principal hábitat em seres humanos e animais é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal, é uma bactéria Gram-positiva, considerada um patógeno oportunista devido causar doenças nos hospedeiros com a imunidade comprometida. A intoxicação ocorre pela ingestão de alimentos contendo a toxina pré-formada. O agente causador não é a bactéria em si, mas sim as toxinas produzidas por ela (ANDRADE et al., 2019; MILLEZI et al., 2014).

Devido ao pouco conhecimento sobre as propriedades da geoprópolis produzida na região amazônica, a comprovação de que os extratos de geoprópolis de abelhas sem ferrão dessa

região possuem atividade antimicrobiana abre caminho para estudos sobre esse material em diversas áreas, podendo resultar no desenvolvimento de fármacos, cosméticos e diversas aplicações na área alimentícia, como por exemplo a incorporação desses extratos em formulações de filmes biodegradáveis aplicados na conservação de frutas e hortaliças.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Obtenção das amostras

As amostras de geoprópolis brutas foram coletadas em um meliponário localizado na cidade de Terra Alta-PA (Latitude: 01° 02' 28" S; Longitude: 47° 54' 27" W) e imediatamente acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas ao abrigo da luz, sob refrigeração.

Foram coletadas amostras das três espécies de abelhas (*Melipona flavolineata*, *Melipona seminigra pernigra* e *Melipona fasciculata*, conhecidas popularmente no Brasil como uruçú amarela, uruçú boca de renda e uruçú cinzenta, que foram codificadas como U.A, U.B.R e U.C, respectivamente).

Ao chegar no laboratório as amostras foram pesadas (uruçú amarela 233,40 g; uruçú boca de renda 162,26 g e uruçú cinzenta 166,55 g), selecionadas para retirada de impurezas e materiais estranhos, em seguida, foram congeladas, trituradas, peneiradas, homogeneizadas e armazenadas sob congelamento a -18 °C até o momento das análises.

As amostras foram registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, Cadastro nº A92815D.

### 4.2 Caracterização físico-química da geoprópolis

#### 4.2.1 Composição centesimal

A composição centesimal das amostras brutas foi realizada seguindo a metodologia da AOAC (2016), sendo realizada em triplicata e os resultados finais são apresentados como suas médias. O teor de umidade foi determinado por gravimetria, em estufa a 105 °C (método nº. 934,06), cinzas (resíduo mineral fixo) por gravimetria em forno mufla a 550 °C (método nº AOAC 940.26), proteína bruta método micro Kjeldahl (nº 920.152), que se baseia na determinação da quantidade de nitrogênio total presente na amostra (o teor de proteína bruta foi calculado multiplicando o nitrogênio total pelo fator 6,25), lipídios totais, extraídos em aparelho soxhlet (método nº 983.23), carboidratos totais (calculados por diferença), pH utilizando potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 4 e 7 e aplicação do valor energético total (kcal/100g), de acordo com a metodologia de Atwater e Bryant (1899), considerando-se os fatores 4; 4 e 9 kcal/g para carboidratos totais, proteínas e lipídios, respectivamente, de acordo com a Equação 1.



$$\text{VET(kcal/100g)} = 4xC + 4xP + 9xL \quad (1)$$

Onde:

C: teor de carboidratos totais

P: teor de proteínas

L: teor de lipídeos

#### 4.2.2 Teor de cera

Aproximadamente 10 g de geoprópolis bruta triturada foram colocados em um cartucho de papel filtro e pesados após secagem por 1 hora a 105 °C. O frasco destinado ao solvente foi preenchido com cerca de 150 mL de metanol. O sistema foi submetido a refluxo em aparelho Soxhlet por 8 horas. O extrato foi colocado em um béquer de 200 mL após o resfriamento, e duas alíquotas de metanol foram adicionadas como resultado da lavagem do frasco.

O volume final do extrato foi medido e armazenado em um recipiente selado e protegido da luz, ficando sob refrigeração por 24 horas e depois por mais 30 minutos em freezer. Com o auxílio de um funil de Buchner, a solução foi filtrada a vácuo a 400 mmHg (com papel de filtro previamente seco e pesado).

A cera no papel de filtro foi lavada com metanol resfriado até ficar transparente. O volume do extrato não ceroso foi estimado e preservado em recipiente de vidro hermeticamente fechado. A combinação filtro /cera passou por exaustão durante 1 hora para eliminar qualquer solvente remanescente. O conjunto foi levado para estufa a 105 °C, por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O processo foi repetido até peso constante. O teor de cera foi calculado pela razão entre a massa de cera retida no filtro e a massa inicial de geoprópolis utilizada na extração, de acordo com a Equação 2, sendo expresso em porcentagem (WOISKY & SALATINO, 1998).

$$\text{TC(\%)} = \left( \frac{\text{MC}}{\text{MA}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

TC: teor de cera em porcentagem

MC: massa de cera

MA: massa da amostra

#### 4.2.3 Sólidos solúveis em metanol

O cartucho utilizado na extração do Soxhlet (item anterior) foi colocado em um vidro de relógio e levado ao exaustor por 1 hora para evaporação do solvente excedente. O conjunto permaneceu em estufa por 2 horas a 105 ° C em forno pré-aquecido e após decorrido o tempo, foi dessecado e o cartucho pesado separadamente. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do cartucho foi repetido a cada 1 hora até peso constante.

Os sólidos solúveis foram determinados pela diferença entre a massa da amostra e a massa de sólidos insolúveis (material retido no cartucho), de acordo com a Equação 3. O resultado foi expresso em percentagem (WOISKY & SALATINO, 1998).

$$SS(\%) = (MA - MSI) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

SS: sólidos solúveis em porcentagem

MA: massa da amostra

MSI: massa de sólidos insolúveis

#### 4.3 Determinação de minerais por absorção atômica

Foi realizada a determinação da concentração dos elementos Al, Ca, Cd, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn. Inicialmente as amostras foram submetidas à digestão úmida em um reator Milestone Ethos D (Milestone Srl, Italy) utilizando o método EPA-3015A (2007).

O método consistiu em depositar 0,5 g de amostra previamente triturada e 5 mL de ácido nítrico concentrado (P.A.) em tubos Teflon, os tubos foram então irradiados com micro-ondas, utilizando uma rampa de aquecimento de 20 minutos e manutenção durante 10 minutos na temperatura de 170 °C e posterior rampa de decréscimo de temperatura durante 30 minutos.

As amostras digeridas foram diluídas e filtradas com água deionizada até volume final de 50 mL. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, porém utilizando apenas ácido nítrico concentrado. O procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra. Após o processo descrito para a digestão, as amostras tiveram a determinação dos metais realizadas em um espectrômetro de absorção atômica de chama (ICE 3000 series, Thermo Scientific, USA). A quantificação foi realizada através da utilização curvas analíticas, construídas com padrões de cada elemento, utilizando as seguintes concentrações em mg/L: Al (10,0 a 50,0), Ca (2,0 a 10,0), Cd (0,6 a 3,0), Cr (2,0 a 10,0), Fe (2,0 a 10,0), K (0,3 a 1,5), Mg (0,1 a 0,5), Mn (0,8 a 4,0), Na (0,2 a 1,0), Pb (3,0 a 15,0) e Zn (0,4 a 2,0).

#### 4.4 Planejamento experimental aplicado para obtenção dos extratos de geoprópolis por método combinado (agitação assistida por ultrassom)

Baseando-se na literatura, foi observado que a utilização de um método combinado de agitação seguida de ultrassom é capaz de proporcionar um maior rendimento na extração de compostos fenólicos e flavonoides da própolis, quando comparado com a extração realizada com as mesmas técnicas de forma isolada, conforme observado no trabalho de Pobiega et al. (2019). Dessa forma, utilizou-se o método combinado no presente trabalho, com um tempo fixo de 30 minutos em ultrassom, devido ser o mais eficiente para esta matéria prima, segundo a literatura.

Um planejamento experimental foi aplicado para obtenção dos extratos de geoprópolis, com o intuito de realizar a otimização da extração. Nesta etapa, optou-se por utilizar a amostra de uma espécie específica de abelha, com o objetivo de reduzir o tempo da etapa de otimização, bem como redução do uso de equipamentos e solventes (a amostra de urucu cinzenta foi escolhida de forma aleatória). O ponto ótimo definido no planejamento experimental foi aplicado de forma consistente para todas as outras espécies de abelhas analisadas, tanto na avaliação da atividade antimicrobiana quanto nos testes cromatográficos. Isso assegura uma comparação direta e precisa dos resultados obtidos entre as diferentes espécies, facilitando a interpretação dos dados e a identificação de padrões consistentes ou variáveis nas análises realizadas.

A determinação das variáveis e condições utilizadas, foi baseada em literaturas que utilizaram esse processo para extração de compostos bioativos em amostras de própolis e geoprópolis. Foi utilizado o planejamento composto central (central composite design) com 2<sup>2</sup> variáveis independentes, sendo elas o tempo de tratamento (1 e 3 dias de agitação em incubadora shaker) e a proporção massa/volume (10 e 20% de massa de geoprópolis), incluindo 2 x 2 pontos axiais + 3 repetições no ponto central, constituindo um total de 11 ensaios. As variáveis dependentes (respostas) foram o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (ensaio DPPH). As Tabela 2 e 3 apresentam os níveis de cada variável e a matriz experimental, respectivamente.

**Tabela 2** - Níveis das variáveis independentes.

Variáveis		Níveis			
<b>Código</b>	$-\alpha$ 1,41	-1	0	+1	$+\alpha$ 1,41
X <sub>1</sub>	0,59	1	2	3	3,41
X <sub>2</sub>	7,93	10	16	20	22,07

Nota: X<sub>1</sub> = Tempo de agitação (dias); X<sub>2</sub> = Proporção massa/volume (%).

**Tabela 3** - Planejamento experimental aplicado na extração por método combinado (agitação assistida por ultrassom).

Ensaio	Tempo de agitação (dias)	Proporção massa/volume (%)
1	-1 (1)	-1 (10)
2	-1 (1)	+1 (20)
3	+1 (3)	-1 (10)
4	+1 (3)	+1 (20)
5	- $\alpha$ 1,41 (0,59)	0 (15)
6	+ $\alpha$ 1,41 (3,41)	0 (15)
7	0 (2)	- $\alpha$ 1,41 (7,93)
8	0 (2)	+ $\alpha$ 1,41 (22,07)
9	0 (2)	0 (15)
10	0 (2)	0 (15)
11	0 (2)	0 (15)

A extração foi realizada de acordo com metodologia de Pobiega et al. (2019) com modificações. As massas de amostra de geprópolis triturada foram pesadas de acordo com o planejamento experimental, feita a proporção para um volume de 25 mL de etanol a 70%. Os frascos erlenmeyers contendo as amostras foram levados para uma incubadora shaker de bancada, da Americanlab, modelo AL- 222 (a 150 rpm) em temperatura de 28 °C, onde permaneceram de acordo com os tempos determinados no planejamento experimental.

Em seguida as amostras foram sonicadas por um tempo fixo de 30 min, em banho ultrassônico, da MYLABOR equipamentos, modelo SSBu 3,8 L, na potência de 100 watts e frequência de 40 kHz, seguido por resfriamento em banho de gelo. Em seguida, os extratos foram centrifugados (1780 x g) por 10 min e filtrados por gravidade em papel filtro Whatman N°. 1, para remover ceras e substâncias menos solúveis e armazenados a -18 °C até o momento das análises.

#### 4.5 Extração convencional de geoprópolis por agitação em shaker

Para efeito de comparação, foi realizada uma extração convencional, onde o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais foram avaliados e comparados com os resultados obtidos no planejamento experimental. Para a extração convencional pesou-se 2,5 g de amostra previamente triturada e homogeneizada, que foram transferidas para erlenmeyers de 150 mL. Em seguida, foram adicionados 25 mL de etanol 70%, obtendo assim uma solução final na proporção de 1:10 (p/v).

Os frascos erlenmeyers contendo as amostras foram levados para uma incubadora shaker de bancada, da Americanlab, modelo AL- 222 (a 150 rpm) em temperatura de 28 °C por 3 dias. Os extratos obtidos foram centrifugados (1780 x g) por 10 min e em seguida filtrados por gravidade em papel filtro Whatman N°. 1, para remover ceras e substâncias menos solúveis e armazenados a -18 °C até o momento das análises (POBIEGA, K. et al., 2019).

#### 4.6 Teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais

Os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais foram medidos por métodos colorimétricos, utilizando o equipamento Thermo Fisher Scientific Oy, Multiskan Go-SN-1530-8001397, Finlândia. Para estas análises foram preparadas soluções padrão de ácido gálico e quercetina, respectivamente. Essas soluções foram utilizadas para criar curvas de calibração, permitindo a quantificação precisa dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais nas amostras analisadas.

##### 4.6.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos

Para essa análise seguiu-se a metodologia proposta por Singleton & Rossi (1965) e modificada por Pereira et al. (2018). A reação foi realizada em uma microplaca de 96 poços, na qual foram inseridos 25 µL de extrato de geoprópolis (sendo feitas diluições caso necessário), posteriormente foram adicionados 125 µL de reagente *Folin-Ciocalteu* 10%, e deixado reagir por 2 minutos.

Após este tempo, foram adicionados 100 mL de carbonato de sódio à 7,5%. A placa foi levada ao espectrofotômetro para agitação por 30 segundos e em seguida deixada em repouso por um tempo de 30 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 765 nm.

A concentração de compostos fenólicos nos extratos foi determinada a partir da equação da reta obtida na curva padrão do ácido gálico, construída na faixa de concentração de 10 a 200 mg/L ( $y = 0,0048x - 0,0483$  e  $R^2 = 0,9969$ ), e os resultados foram expressos em (mg EAG/100g). Considerando-se nos cálculos as diluições efetuadas na amostra.

#### 4.6.2 Quantificação dos flavonoides totais nos extratos

Os teores de flavonoides totais nos extratos foram quantificados de acordo com o método descrito por Pękal & Pyrzyńska (2014), com modificações. Para isso, em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 115  $\mu$ L de extrato de geoprópolis (sendo feitas diluições caso necessário) e 115  $\mu$ L de solução de  $AlCl_3$  a 2%. A placa foi então levada ao espectrofotômetro para agitação por 30 segundos e em seguida deixada em repouso por um tempo de 10 minutos. A absorbância foi então medida a 425 nm.

Os teores de flavonoides totais foram calculados a partir da equação da reta obtida na curva padrão de quercetina, construída na faixa de concentração de 1 a 50 mg/L ( $y = 0,0167x - 0,0188$  e  $R^2 = 0,9978$ ), e os resultados foram expressos em (mg QE/100g). Considerando-se nos cálculos as diluições efetuadas na amostra, multiplicando o resultado por esse fator.

#### 4.7 Determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Os extratos foram submetidos a testes para avaliação do potencial antioxidante, através do método espectrofotométrico DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), descrito por Brand-Williams; Cuvelier & Berset (1995), com pequenas modificações. Os extratos que ficaram muito concentrados foram diluídos em metanol 70% para se enquadrar na curva padrão de trolox, que foi usado como antioxidante padrão.

A reação iniciou com a adição de 50  $\mu$ L de solução de extrato de geoprópolis em uma placa de 96 poços, seguida pela adição de 150  $\mu$ L de solução metanólica de DPPH, resultando em um volume final de 200  $\mu$ L por poço. A mistura reacional foi incubada no escuro por 40 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm.

Os poços de controle consistiram em 50  $\mu$ L de metanol 70% e 150  $\mu$ L de solução de DPPH. A quantificação dos resultados foi realizada através da interpolação da absorbância das amostras em relação a uma curva de calibração de trolox, construída na faixa de concentração de 15 a 300  $\mu$ mol/mL ( $y = -0,0022x + 0,7599$  e  $R^2 = 0,9958$ ), realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol de equivalente de trolox por grama de amostra.

#### 4.8 Análises realizadas na condição otimizada dos extratos de geoprópolis

Os extratos de geoprópolis (das três espécies de abelhas sem ferrão) elaborados na condição ótima de extração, além de terem sido submetidos às análises descritas anteriormente (compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante pelo método DPPH), também foram submetidos à análises adicionais que serão descritas a seguir, sendo elas a determinação da atividade antioxidante pelos métodos ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e FRAP (ferric reducing antioxidant power), atividade antimicrobiana e determinação do perfil de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).

##### 4.8.1 Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>

O método de captura do radical ABTS<sup>•+</sup> foi utilizado seguindo a metodologia de Rufino et al. (2007), com pequenas modificações.

O procedimento consistiu em transferir uma alíquota de 30 µL do extrato de geoprópolis para tubos de ensaio contendo 3,0 mL do radical ABTS<sup>•+</sup>, que foram homogeneizados em agitador de tubos.

Decorridos 6 minutos, a mistura foi lida em 734 nm, utilizando-se álcool etílico como branco, para calibrar o espectrofotômetro. Os resultados foram obtidos através interpolação da absorbância das amostras com a curva de calibração de trolox, construída na faixa de concentração de 100 a 2000 µM ( $y = -0,0003x + 0,6793$  e  $R^2 = 0,9919$ ), e expressos em (µmol trolox eq./g de amostra).

##### 4.8.2 Poder redutor de Fe<sup>+2</sup> (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada baseando-se na metodologia desenvolvida por Benzie & Strain (1996) conforme descrito por Rufino et al. (2006) com alguns ajustes.

O reagente FRAP é a combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, com 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20 mM).

Para a análise, 90 µL de extrato previamente diluído ou do padrão sulfato ferroso foram pipetados em tubos de ensaio, com posterior adição de 270 µL de água destilada e misturados com 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram mantidos por 30 minutos em banho-maria a 37

°C e protegidos da luz. Mensurou-se a absorvância a 595 nm em espectrofotômetro calibrado com o reagente FRAP.

Os resultados foram obtidos através interpolação da absorvância das amostras com a curva de calibração do padrão sulfato ferroso, construída na faixa de concentração de 100 a 2000  $\mu\text{M}$  ( $y = 0,0006x + 0,0112$  e  $R^2 = 0,9937$ ), e expressos em  $\mu\text{M}$  equivalentes de sulfato ferroso por grama de amostra ( $\mu\text{M Fe}^{+2}/\text{g}$ ).

#### 4.8.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de geoprópolis

Para esta análise foi utilizado o método conhecido como microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015) com modificações. A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos de geoprópolis foi realizada com testes *in vitro* frente a duas bactérias, sendo uma gram-negativa: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e outra gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

##### 4.8.3.1 Ativação do inóculo

O inóculo bacteriano foi preparado a partir do cultivo prévio das bactérias em placas de Petri contendo meio específico, para que se tenha certeza de identificação de cada espécie. As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram repicadas em placas de petri contendo Ágar Mueller-Hinton, e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Decorridas essas 24 horas de incubação, 3 a 4 unidades formadoras de colônias dessas bactérias foram retiradas e transferidas para tubo estéril contendo 1 mL de caldo Mueller-Hinton. Seguindo-se com o ajuste da sua turbidez em espectrofotômetro (625 nm), de acordo com a solução padrão de McFarland de 0,5 (0,09 a 0,11 de absorvância), correspondendo a  $1 \times 10^8$  UFC/mL;

Após esse processo foi realizado uma diluição seriada até a obtenção do inóculo  $1 \times 10^3$  UFC/mL.

##### 4.8.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Caldo Mueller Hinton foi adicionado às microplacas de 96 poços e foram processadas diluições seriadas (2,0–0,016 mg/mL) dos extratos de geoprópolis da condição ótima, ficando cada poço com um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do inóculo



( $1 \times 10^3$  UFC/mL) em cada poço. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico cloranfenicol a (250 µg/mL). Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após 24 horas, foi acrescentado 30 µL de resazurina a 0,01% em todos os poços da microplaca, que foi incubada por mais 3 horas, para determinar a CIM.

A CIM é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo. Já a resazurina é um indicador de coloração azul, que sofre oxidação-redução na presença de células viáveis (passando de resazurina a resofurina), tornando-se rosa.

Dessa forma, após as 3 horas de incubação, a manutenção da cor azul indicará ausência de crescimento, enquanto a presença de coloração rosa indicará que houve crescimento bacteriano. A CIM, foi considerada a menor concentração de extrato de geoprópolis que pode proporcionar a inibição do crescimento dos microrganismos testados, expressa em (mg/mL).

#### 4.8.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foram retirados 10 µL de todos os poços de coloração azul e semeados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, para posteriormente serem observadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

A CBM foi definida como a menor concentração de extrato de geoprópolis que resulta em ausência de crescimento ou aparecimento de menos de três unidades formadoras de colônias, o que significa a eliminação de 99,9% das bactérias, expressa em (mg/mL).

#### 4.8.4 Perfil de compostos voláteis dos extratos de geoprópolis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS)

A análise GC-MS foi realizada em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biofísica, do Programa de Pós-Graduação em Toxinologia (PPGTox) do Instituto Butantan e a empresa Shimadzu do Brasil Comércio Ltda. A análise cromatográfica foi realizada com o equipamento GCMS-QP2050, utilizando o autoamostrador AOC-30i e coluna SH-I-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O programa de temperatura foi de 10 a 330 °C e o tempo total da corrida foi de 70 minutos, o gás de arraste utilizado foi o Hélio a uma taxa de fluxo de 1,20 mL/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C.

As amostras não tiveram necessidade de preparo, apenas transferiu-se uma alíquota de 100 µL dos extratos de geoprópolis diretamente para os vials com insert e as injeções foram

realizadas através do autoamostrador AOC-30i utilizando o volume de injeção de 1,0 µL e o modo de amostragem para amostras viscosas. A identificação dos compostos voláteis presentes nos extratos de geoprópolis foi realizada por meio da comparação do espectro de massas obtidos em cada amostra, com a biblioteca NIST23 (do inglês, National Institute of Standard and Technology).

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados obtidos para todas as análises realizadas foram avaliados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para a determinação do teste de diferença de médias.

As respostas do planejamento experimental (compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante) passaram por análise de variância, sendo feito o teste F de regressão e F da falta de ajuste para validação destes dados e geração de superfícies de resposta.

As análises foram realizadas com o auxílio do software Statistic (Versão 7) e o nível de confiança adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição físico-química da geoprópolis bruta

A Tabela 4 apresenta os resultados da composição físico-química da geoprópolis bruta em base seca, expressa em termos percentuais.

**Tabela 4** - Composição físico-química da geoprópolis bruta.

Amostra	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	pH	Teor de Cera (%)	Sólidos Solúveis (%)	VET (kcal/100g)
U.A	5,61 ± 0,31 <sup>a</sup>	73,83 ± 0,48 <sup>b</sup>	6,16 ± 0,48 <sup>c</sup>	1,30 ± 0,09 <sup>a</sup>	18,72 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,95 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,02 ± 0,02 <sup>b</sup>	135,48 ± 4,22 <sup>b</sup>
U.B.R	5,93 ± 0,14 <sup>a</sup>	68,07 ± 0,16 <sup>c</sup>	25,26 ± 0,46 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,05 <sup>b</sup>	5,68 ± 0,44 <sup>b</sup>	5,96 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,04 <sup>a</sup>	26,35 ± 0,16 <sup>a</sup>	254,06 ± 2,85 <sup>a</sup>
U.C	6,28 ± 0,53 <sup>a</sup>	83,19 ± 0,66 <sup>a</sup>	10,34 ± 0,25 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,11 ± 0,30 <sup>b</sup>	6,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,49 ± 0,26 <sup>b</sup>	118,95 ± 3,08 <sup>c</sup>

Fonte: Dados da pesquisa, (2024).

Nota: Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não se diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). U.A: uruçú amarela; U.B.R: uruçú boca de renda; U.C; uruçú cinzenta; pH: potencial hidrogeniônico; VET: valor energético total.

O teor de umidade nas amostras variou de 5,61 a 6,28%, estando de acordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira para a própolis de *Apis mellífera*, que estabelece o valor máximo de 8%. Valores similares foram encontrados por Araújo et al. (2016), que realizaram um estudo comparando a geoprópolis de abelhas sem ferrão (*M. scutellaris* e *M. fasciculata*) com a própolis de *A. mellífera* e obtiveram valores variando de 2,94 a 6,97%.

Com relação ao teor de cinzas, os valores observados no presente trabalho (68,07 a 83,19%) ficaram muito acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para a própolis de *Apis mellífera*, para a qual o limite máximo é de 5%, porém ficaram próximos aos valores encontrados por Cruz et al. (2020), que obtiveram o valor de 73,78% ao analisar a geoprópolis de *Melipona scutellaris*. Os autores atribuem esses valores elevados ao fato de que a geoprópolis é uma mistura de argila/terra e resina, o que faz com que seu teor de cinzas seja consequentemente maior.

Ferreira et al. (2020) encontraram valores de cinzas de 77,51 a 80,18 para geoprópolis de *Melipona mondury*, 51,97 a 66,01 para *Melipona quadrifasciata* e 70,17 a 78,29 para *Melipona scutellaris*, atribuindo esses valores mais uma vez às próprias características de composição dessa matriz.

Manta (2022) ressalta o fato de que o padrão de qualidade atualmente em vigor na legislação brasileira foi desenvolvido especificamente para a própolis de *Apis mellífera* e que a

geoprópolis das abelhas nativas apresenta em sua composição características e propriedades particulares, sendo necessário atualizar a legislação existente para definir um padrão de identidade e qualidade específico para a geoprópolis de abelhas sem ferrão.

O teor de lipídeos da geoprópolis foi estatisticamente diferente entre as três espécies, sendo que os valores para a uruçu amarela e uruçu cinzenta, ficaram mais próximos, com os respectivos valores de 6,16 e 10,34%, porém para a uruçu boca de renda o valor foi bem mais elevado (25,26%), o que provavelmente está relacionado a diferentes fontes vegetais de coleta de resina.

O valor de proteínas encontrado para a espécie uruçu boca de renda (0,99%) diferiu estatisticamente dos valores observados para uruçu amarela e uruçu cinzenta, que tiveram as respectivos teores de 1,30 e 1,35%. Em relação ao teor de carboidratos, a geoprópolis de uruçu amarela apresentou um percentual bem mais elevado (18,72%) quando comparado com os valores obtidos para uruçu boca de renda (5,68%) e uruçu cinzenta (5,11%). Esses resultados enfatizam que apesar de estarem localizadas no mesmo ambiente, essas espécies produzem geoprópolis com características físico-químicas distintas.

Na análise de pH a diferença foi observada para a espécie uruçu cinzenta, que diferiu estatisticamente das demais, apresentando um valor mais próximo da neutralidade (6,27), enquanto uruçu amarela e uruçu boca de apresentaram resultados semelhantes, com valores de 5,95 e 5,96, respectivamente. Resultados mais baixos de pH foram relatados por Coutinho et al. (2023), que obtiveram valores de pH variando entre 4,1 e 4,2 para geoprópolis de *Melipona scutellaris*.

Para o teor de cera foram observados valores oscilando entre 0,16 e 0,45%, estando dentro dos valores estabelecidos na legislação brasileira (máximo 25%) e próximo aos valores descritos por Araújo et al. (2016), que obtiveram os valores de 0,95 e 4,33% para a geoprópolis de *M. fasciculata* e *M. scutellaris*, respectivamente.

Os autores ainda explicam que amostras com menores teores de cera (o que foi observado na geoprópolis abelhas *Meliponinae*, devido à presença de argila e terra em sua composição) são preferíveis quando há o interesse em extrair compostos fenólicos desse tipo de matriz, uma vez que os compostos fenólicos não estão presentes na cera.

O teor de sólidos solúveis das amostras provenientes das espécies uruçu amarela e uruçu cinzenta foi estatisticamente semelhante, apresentando valores de 3,02 e 3,49%, enquanto a amostra de uruçu boca de renda foi a que apresentou resultados mais elevados (26,35%), o que provavelmente está relacionado com o elevado teor de lipídeos encontrado nessa amostra,

resultando em um aumento na sua taxa de solubilização devido a uma maior afinidade entre esse componente e o solvente.

Teores mais elevados de sólidos solúveis foram encontrados por Ferreira et al. (2017), que obtiveram o valor de 55% ao analisar a própolis da abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica*, assim como também no trabalho de Abduh et al. (2020) que obtiveram teor de sólidos solúveis variando de 40,8 a 69,2% na própolis da abelha sem ferrão *Tetragonula laeviceps*, o que provavelmente está relacionado ao fato dessas espécies de abelhas sem ferrão produzirem própolis, que possui um teor maior de resinas, aumentando a sua solubilidade quando comparada com a geoprópolis.

Em relação ao valor energético total, foi verificado houve diferença entre as três amostras, sendo que o maior valor foi observado na amostra proveniente da abelha uruçú boca de renda, com valor de 254,06 kcal/100g, o que mais uma vez deve-se ao seu elevado teor de lipídeos, quando comparado as demais amostras. Em seguida temos a amostra de uruçú amarela, com valor de 135,48 kcal/100g, estando relacionado com o seu elevado teor de carboidratos, e por último, a amostra de uruçú cinzenta, com valor de 118,95 kcal/100g.

## 5.2 Composição mineral da geoprópolis bruta

A Tabela 5, apresenta os resultados obtidos na análise de minerais, em base úmida.

**Tabela 5** - Composição mineral da geoprópolis bruta.

Elemento (mg/Kg)	U.A	U.B.R	U.C
Fe	4391,39 ± 204,10 <sup>c</sup>	6044,44 ± 55,61 <sup>b</sup>	7733,36 ± 208,87 <sup>a</sup>
Zn	2,30 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,63 ± 0,35 <sup>a</sup>
Mn	8,74 ± 0,09 <sup>b</sup>	8,27 ± 0,17 <sup>b</sup>	9,39 ± 0,36 <sup>a</sup>
Na	<LOD	<LOD	105,43 ± 2,97
K	641,12 ± 11,03 <sup>a</sup>	345,17 ± 3,52 <sup>c</sup>	548,61 ± 18,83 <sup>b</sup>
Al	7019,81 ± 105,08 <sup>c</sup>	14251,29 ± 154,53 <sup>b</sup>	16106,88 ± 814,00 <sup>a</sup>
Mg	179,03 ± 1,13 <sup>b</sup>	111,95 ± 15,61 <sup>c</sup>	256,11 ± 4,51 <sup>a</sup>
Ca	210,71 ± 16,91 <sup>b</sup>	120,80 ± 1,63 <sup>c</sup>	618,91 ± 15,82 <sup>a</sup>
Cr	<LOD	<LOD	10,50 ± 0,09
Cd	<LOD	<LOD	<LOD
Pb	<LOD	<LOD	<LOD

Fonte: Dados da pesquisa, (2024).

Nota: Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de tukey (p<0,05). U.A: uruçú amarela; U.B.R: uruçú boca de renda; U.C; uruçú cinzenta; <LOD: Abaixo do limite de detecção.

A maioria dos elementos identificados estavam presentes em maior quantidade na amostra proveniente da espécie urucu cinzenta, exceto o potássio (K) que esteve presente em maior quantidade na amostra da espécie urucu amarela.

Pode ser verificado ainda que estes valores possuem uma grande relação com o teor de cinzas observados nas amostras, que foram na ordem de U.C>U.A>U.B.R (conforme mostrado anteriormente na Tabela 4), visto que a quantidade dos elementos identificados na análise de minerais também seguiu essa ordem, na maioria dos casos.

Os dois elementos presentes em maior quantidade nas três amostras de geoprópolis bruta foram o alumínio (Al) e o ferro (Fe) que apresentaram quantidades variando de 7019,81 a 16106,88 (mg/Kg) e 4391,39 a 7733,36 (mg/Kg), respectivamente. No trabalho de Bonsucesso et al. (2018) que avaliaram a geoprópolis da abelha *Melipona scutellaris*, o Fe foi o elemento encontrado em maior quantidade, o que segundo os autores pode ser atribuído à sua abundância natural no solo incorporado na geoprópolis.

Semelhante ao que foi verificado em nosso trabalho, Ferreira et al. (2021), também relataram que o Al (20414,40 a 36911,11 mg/Kg) e o Fe (11536,47 a 21973,96 mg/Kg) foram os elementos que estavam presentes em maior quantidade nas amostras de geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Segundo os autores o Al está presente na dieta humana em níveis moderados, na qual sua ingestão diária é inferior a 15 mg, entretanto, também pode ser tóxico para os organismos vivos quando ingerido em concentrações elevadas. Com relação ao Fe, é um elemento importante para a manutenção da homeostase celular, incluindo transporte de oxigênio e elétrons, além da síntese de ácidos nucléicos em diversos organismos. Além disso, semelhante ao presente trabalho também foi constatado a presença de micro elementos essenciais, como Manganês e Zinco (FERREIRA et al., 2021).

De acordo com Abdullah et al. (2020) em geral, os principais elementos minerais da própolis são K, Mg, Ca, Mn, Na e Al, demonstrando que a própolis é uma matriz muito rica em relação a esses elementos minerais. Porém, a sequência que vai da maior para a menor quantidade desses elementos depende da espécie de abelha sem ferrão, bem como da origem geográfica.

Dentre os metais potencialmente tóxicos avaliados (cromo, cádmio e chumbo), foi verificado que Cd e Pb apresentaram valores abaixo do limite de detecção em todas as amostras, enquanto o Cr foi quantificado apenas na amostra U.C, na quantidade de 10,50 mg/Kg, sendo importante a avaliação deste elemento em amostras coletadas em diferentes estações, afim de identificar se esse resultado se repete ao longo do ano ou se é algo pontual.

Segundo Chen et al. (2018) o cromo é um elemento que pode interagir com o DNA ou proteínas, exercendo efeito tóxico e prejudicial ao organismo humano, além disso, a superexposição ao cromo através da ingestão de alimentos contaminados pode levar ao surgimento de câncer e doenças degenerativas devido a indução do estresse oxidativo.

Por este motivo torna-se essencial a avaliação do perfil mineral, a partir do qual é possível dispor de matérias primas de qualidade. Souza et al. (2024) estudaram a geoprópolis de *Melipona scutellaris*, na qual foram encontrados níveis indetectáveis de elementos tóxicos, o que indica alta qualidade das amostras e do ambiente, sendo um fator importante para a valorização econômica desse material.

Os minerais desempenham um papel crucial no organismo humano, porém, dependendo de suas quantidades e características, eles podem ser considerados tóxicos e prejudiciais à saúde. O teor de minerais na geoprópolis está diretamente relacionado à composição do solo ao redor das colmeias. Portanto, a caracterização mineral deste produto da meliponicultura pode servir como um indicador útil para avaliar o nível de poluição ambiental, especialmente considerando a concentração de metais potencialmente tóxicos acumulados (FERREIRA, 2018).

Conforme discutido por Bonsucesso et al. (2018), a análise dos minerais presentes na geoprópolis pode eventualmente ser empregada para distinguir amostras de acordo com a região geográfica em que as colmeias estão localizadas. Isso se mostra um parâmetro significativo na definição de padrões de identidade e qualidade deste produto, fornecendo informações importantes sobre sua origem e potencial influência ambiental.

### **5.3 Teor de compostos bioativos e atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis obtidos no planejamento experimental**

A Tabela 6 expressa os resultados do planejamento experimental aplicado na extração combinada (agitação assistida por ultrassom).

Conforme pode ser observado, as alterações nos níveis das variáveis independentes realmente exercem efeitos sobre respostas, uma vez que ao avaliar os diferentes ensaios, percebe-se que houve diferenças significativas nas três variáveis dependentes estudadas ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao teor de compostos fenólicos totais (CFT), os valores ficaram situados entre 2179,77 e 7302,74 (mg EAG/100g), sendo que os melhores resultados ocorreram nos ensaios 1 e 7. O ensaio 1 é a condição que utiliza o tempo de agitação de 1 dia e 10% de

proporção massa/volume enquanto o ensaio 7 utilizou o ponto central para o tempo (2 dias) e a menor massa de todo o planejamento experimental (7,9%). O fato de os melhores resultados estarem atrelados as menores massas, indica que para a faixa estudada, ao aumentar a concentração de sólidos houve uma diminuição da solubilização, devido ao líquido reacional conter menos solvente dificultando o processo de transferência de massa da parte sólida para a fração líquida.

**Tabela 6** - Resultados das análises do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (ensaio DPPH) obtidos no planejamento experimental para a amostra da abelha urucu cinzenta.

Ensaio	Tempo de agitação (dias)	Proporção massa/volume (%)	CFT (mg EAG/100g)	FT (mg QE/100g)	Ensaio DPPH ( $\mu\text{mol trolox eq./g}$ )
1	-1 (1)	-1 (10)	7302,74 $\pm$ 153,71 <sup>a</sup>	202,80 $\pm$ 6,44 <sup>a</sup>	1515,33 $\pm$ 12,90 <sup>a</sup>
2	-1 (1)	+1 (20)	2179,77 $\pm$ 103,14 <sup>h</sup>	50,09 $\pm$ 2,16 <sup>e</sup>	513,59 $\pm$ 4,38 <sup>i</sup>
3	+1 (3)	-1 (10)	4706,44 $\pm$ 68,00 <sup>c</sup>	160,76 $\pm$ 3,60 <sup>b</sup>	1143,03 $\pm$ 6,86 <sup>b</sup>
4	+1 (3)	+1 (20)	3649,51 $\pm$ 169,58 <sup>e,f</sup>	138,79 $\pm$ 1,93 <sup>c</sup>	720,14 $\pm$ 9,65 <sup>h</sup>
5	$-\alpha$ 1,41 (0,59)	0 (15)	3901,05 $\pm$ 147,16 <sup>d,e</sup>	98,14 $\pm$ 3,76 <sup>d</sup>	816,37 $\pm$ 2,49 <sup>d</sup>
6	$+\alpha$ 1,41 (3,41)	0 (15)	4186,91 $\pm$ 109,44 <sup>d</sup>	154,68 $\pm$ 2,62 <sup>b</sup>	795,61 $\pm$ 11,95 <sup>d</sup>
7	0 (2)	$-\alpha$ 1,41 (7,92)	5061,18 $\pm$ 114,06 <sup>b</sup>	152,04 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	1029,91 $\pm$ 9,35 <sup>c</sup>
8	0 (2)	$+\alpha$ 1,41 (22,07)	2698,90 $\pm$ 81,93 <sup>g</sup>	153,96 $\pm$ 3,30 <sup>b</sup>	565,95 $\pm$ 6,18 <sup>h</sup>
9	0 (2)	0 (15)	3371,93 $\pm$ 37,23 <sup>f</sup>	153,37 $\pm$ 2,67 <sup>b</sup>	745,02 $\pm$ 17,92 <sup>e,f</sup>
10	0 (2)	0 (15)	3443,29 $\pm$ 70,12 <sup>f</sup>	133,38 $\pm$ 2,09 <sup>c</sup>	759,13 $\pm$ 7,59 <sup>e</sup>
11	0 (2)	0 (15)	3592,13 $\pm$ 66,68 <sup>e,f</sup>	139,31 $\pm$ 2,21 <sup>c</sup>	709,36 $\pm$ 15,84 <sup>g</sup>

Fonte: Dados da pesquisa, (2024).

Nota: médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ). CFT: Compostos Fenólicos Totais; FT: Flavonoides totais, DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl.

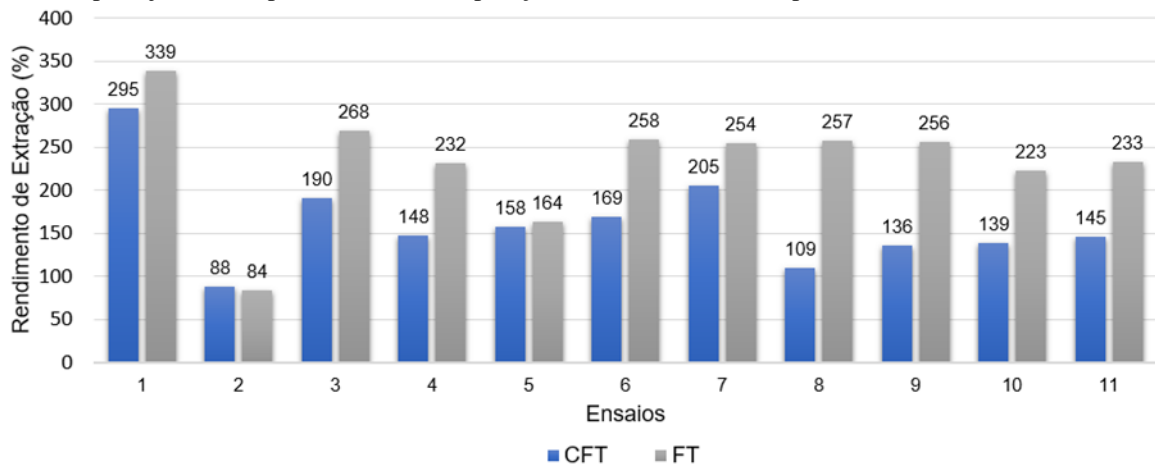
Para os flavonoides totais (FT), a melhor condição também foi encontrada no ensaio 1 (202,80 mg QE/100g), enquanto o ensaio 2 foi o menos eficiente (50,09 mg QE/100g), ambos utilizaram mesmo tempo de agitação, entretanto o ensaio 1 continha 10% de proporção massa/volume e o ensaio 2 continha 20%, assim, o melhor resultado foi encontrado para a condição de menor tempo e menor proporção massa/volume, devido novamente a diminuição da solubilização conforme ocorre o aumento de massa.



Torres et al. (2018) avaliaram extratos de própolis e geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão, encontrando valores de CFT iguais a 126 e 387 mg de GAE/100g, enquanto o teor de flavonoides foi de 15 e 14 mg QE/100g para *Tetragonisca angustula* e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, respectivamente. Esses valores foram mais baixos quando comparados aos resultados encontrados no presente trabalho para os extratos obtidos por agitação combinada com ultrassom, provavelmente em função do método de extração utilizado pelos autores (sob agitação a 70°C por 30 min), assim como outros fatores, incluindo espécie de abelha, local e época de colheita das amostras.

A Figura 7 apresenta o percentual de extração de compostos fenólicos e flavonoides obtidos para os ensaios do planejamento experimental, em comparação ao extrato de geoprópolis de urucu cinzenta, obtido pelo método convencional (descrita no item 4.5), no qual foram obtidos valores de 2472,52 (mg EAG/100g) para CFT e 59,88 (mg QE/100g) para FT.

**Figura 7** - Percentual de extração de compostos fenólicos (CFT) e flavonoides totais (FT) obtidos nos ensaios do planejamento experimental em comparação com o extrato obtido por método convencional.



Fonte: Dados da pesquisa, (2024).

A extração assistida por ultrassom elevou consideravelmente o rendimento de compostos bioativos, estando entre 88 e 295% para os compostos fenólicos e 84 a 339% para os flavonoides, sendo interessante observar que, com exceção do ensaio 2, todos os demais ensaios apresentaram rendimento acima de 100%.

A melhora no rendimento da extração assistida por ultrassom, segundo Chemat et al. (2017), deve-se a implosão de bolhas de cavitação no meio líquido, o que leva a macroturbulências e a uma micromistura, com fragmentação da matriz e maior contato com o solvente.

Medina-Jaramillo et al. (2022), avaliaram extratos de própolis e geoprópolis de três espécies de abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula*, *Melipona eburnea* e *Scaptotrigona*

*spp*), verificando que o teor de compostos fenólicos dos extratos obtido por extração convencional para as três respectivas espécies, passou de 545, 35 e 141 (mgGAE/100g) para 732, 52 e 148 ao utilizar a extração por ultrassom, o que indica que essa técnica pode ser considerada uma importante alternativa para aumentar o rendimento de extração da própolis bruta, sem alterar suas propriedades físicas.

A alta performance exercida pela técnica de ultrassom também refletiu em bons resultados no ensaio DPPH, conforme observado anteriormente na Tabela 6, onde todos os ensaios exerceram atividade antioxidante, que variou de 513,59 a 1515,33  $\mu\text{mol trolox eq./g}$  de amostra bruta, sendo os melhores resultados encontrados nos ensaios 1, 3 e 7, demonstrando que seu valor está diretamente ligado ao teor de CFT e FT, que foram mais elevados nesses ensaios.

Asem et al. (2020) avaliaram o potencial antioxidante da própolis de três espécies de abelhas sem ferrão, sendo elas, *Tetrigona apicalis*, *Heterotrigona itama* e *Geniotrigona thoracica*, utilizando diferentes métodos, os resultados mostram que todos os extratos de avaliados foram ativos contra as atividades de eliminação de DPPH e ABTS, no entanto, a amostra de *G. thoracica* que possuía os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante equivalente Trolox, em ambos os ensaios.

#### **5.4 Análise estatística do planejamento experimental**

A Figura 8 apresenta os valores absolutos dos efeitos exercidos pelas variáveis independentes e suas interações sobre as diferentes respostas do planejamento experimental, ao nível de 95% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

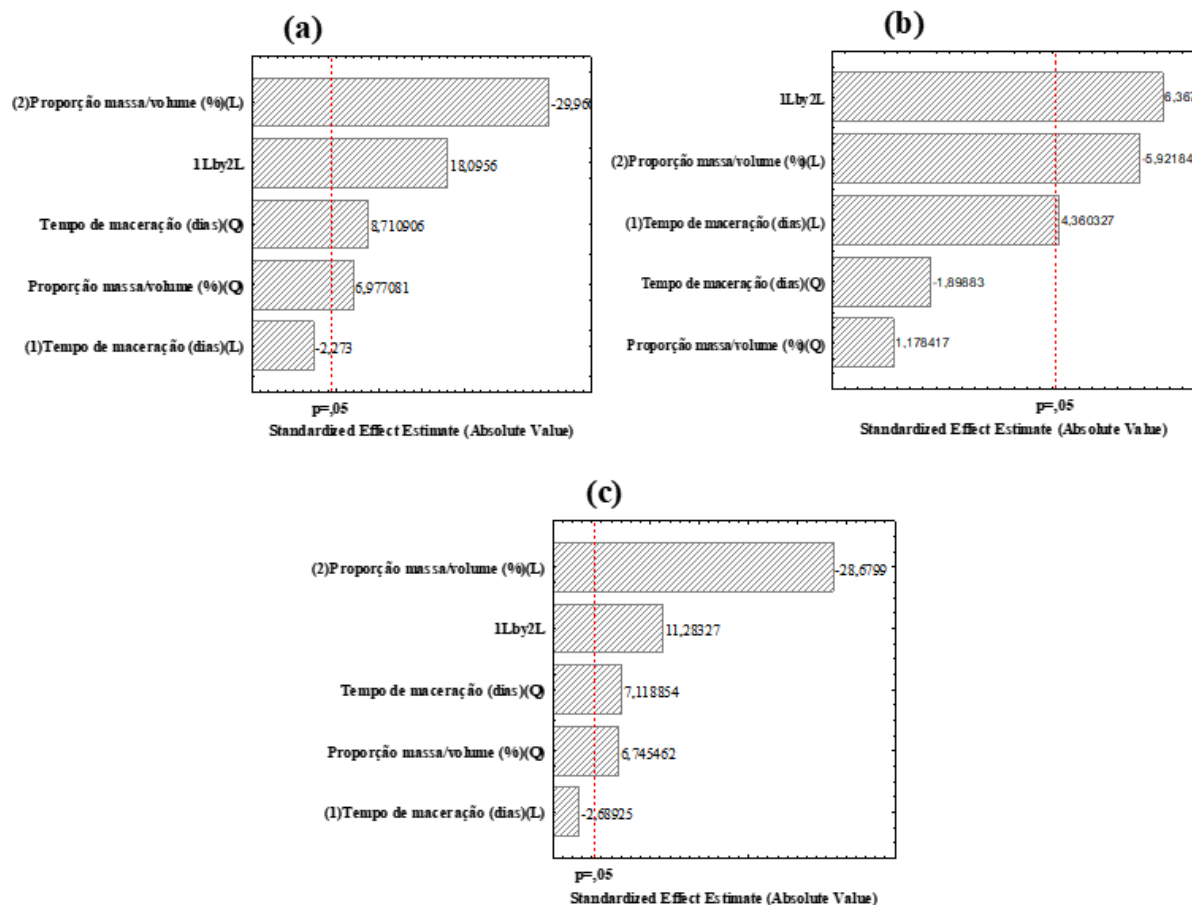
Em relação ao teor de CFT, percebe-se que com exceção do tempo de agitação linear, todas as demais variáveis apresentaram efeito significativo. A proporção massa/volume linear com valor de -29,960 foi a que exerceu maior influência na resposta, seu valor negativo indica que o aumento dessa concentração promove uma diminuição no teor de compostos fenólicos, estando de acordo com observado anteriormente na Tabela 6, onde verifica-se que as menores proporções de massa/volume resultaram nos maiores valores de CFT.

A interação 1L\*2L apresentou-se como a segunda mais influente, com valor de 18,0956, indicando que a interação entre as duas variáveis independentes estudadas é capaz de promover o aumento da resposta. Em seguida temos as variáveis tempo de agitação e proporção massa/volume quadráticas, indicando que há uma região onde a resposta será máxima, ou seja,

a mudança nos valores dessas variáveis é capaz aumentar a resposta, porém chega a um limite (região máxima), a partir do qual a resposta começa a decrescer.

Para o teor de FT o gráfico mostra que apenas as variáveis lineares e a interação 1L\*2L foram significativas, sendo esta última a que mais interfere na resposta, com valor de 6,367. Ambas as variáveis quadráticas não foram significativas, assim foram removidas no momento de gerar a ANOVA, resultando em um modelo de primeira ordem, conforme expresso na Tabela 7.

**Figura 8** - Efeitos estipulados pelo gráfico de Pareto em função das variáveis independentes e suas interações para a obtenção das respostas do planejamento experimental.



Nota: (a) compostos fenólicos totais; (b) flavonoides totais e (c) atividade antioxidante (ensaio DPPH).

As variáveis com efeito significativo na atividade antioxidante, foram a proporção massa/volume linear com valor de -28,6799, a interação 1L\*2L, com valor de 11,28327, o tempo de agitação quadrático, com valor de 7,118854 e a proporção massa/volume quadrática, com valor de 6,745462, resultado em um modelo de segunda ordem. O efeito do tempo de agitação linear influenciou de forma negativa (-2,68925), porém não foi significativo.

A Tabela 7, apresenta os dados da análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância ( $p \leq 0,05$ ), após a reparametrização (parâmetros não significativos foram removidos).

**Tabela 7** - Resultados da análise de variância ( $p < 0,05$ ) para as respostas obtidas no planejamento experimental.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calc.</sub>	F <sub>tab.</sub> ( $p < 0,05$ )	Modelo
<b>(a)</b>						
Regressão	16690661,57	4	4172665,39	13,27	4,53	CFT= 411,83.X1 <sup>2</sup> - 1190,08.X2+329,86.X2 <sup>2</sup> +1016,51.X1.X2+3469 ,12
Resíduos	1886213,73	6	314368,96			
Falta de ajuste	1860969,19	4	465242,30	36,86	19,25	
Erro puro	25245,55	2	12622,27			
Total	18576875,30	10				
% de variação explicada (R <sup>2</sup> )	89,85%					
% máxima de variação explicável	99,86%					
<b>(b)</b>						
Regressão	9973,77	3	3324,59	4,64	4,35	FT= 15,83.X1- 21,50.X2+32,69.X1.X2 +139,76
Resíduos	5016,33	7	716,62			
Falta de ajuste	4805,51	5	961,10	9,12	19,3	
Erro puro	210,82	2	105,41			
Total	14990,10	10				
% de variação explicada (R <sup>2</sup> )	66,54%					
% máxima de variação explicável	98,59%					
<b>(c)</b>						
Regressão	673895,18	4	168473,80	7,18	4,53	Ativ. Antioxidante (DPPH)= 76,842.X1 <sup>2</sup> - 260,095.X2+72,811.X2 <sup>2</sup> +144,713.X1.X2+737, 837
Resíduos	140748,23	6	23458,04			
Falta de ajuste	139432,30	4	34858,08	52,98	19,25	
Erro puro	1315,93	2	657,96			
Total	814643,41	10				
% de variação explicada (R <sup>2</sup> )	82,72%					
% máxima de variação explicável	99,84%					

Fonte: Dados da Pesquisa, (2024).

Nota: CFT: Compostos Fenólicos Totais; FT: Flavonoides totais; DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl.

Os resultados dos testes F realizados em função da significância das condições experimentais para a extração de CFT do extrato de geoprópolis mostram que o F calculado da

regressão (13,27) foi maior do que o F tabelado (4,53), indicando que o modelo foi significativo ao nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ), porém, o F calculado da falta de ajuste (36,86) foi maior que o F tabelado. Dessa forma, o modelo obtido não é capaz de prever respostas que estejam além da faixa de estudo, sendo considerado significativo, mas não preditivo, podendo ser usado apenas como indicador de tendência.

Para o teor de FT o valor calculado do F para a regressão (4,64) foi superior ao valor tabelado (4,35), enquanto o valor calculado para a falta de ajuste (9,12) foi inferior ao valor tabelado (19,3), porém o F para a regressão não foi de quatro a cinco vezes maior que o F tabelado. Portanto, o modelo foi considerado significativo a um nível de confiança de 95%. No entanto, embora significativo, o modelo não pode ser utilizado para fins preditivos precisos, sendo mais apropriado para indicar tendências dentro da faixa de estudo realizada no presente trabalho.

Em relação a atividade antioxidante, a análise mostra que o modelo obtido foi significativo, sendo o F calculado da regressão (7,18), maior que o F tabelado (4,53), porém ao verificar o teste para a falta de ajuste é observado que o F calculado (52,97) foi maior que o F tabelado (19,25), sendo assim o modelo apresentou falta de ajuste.

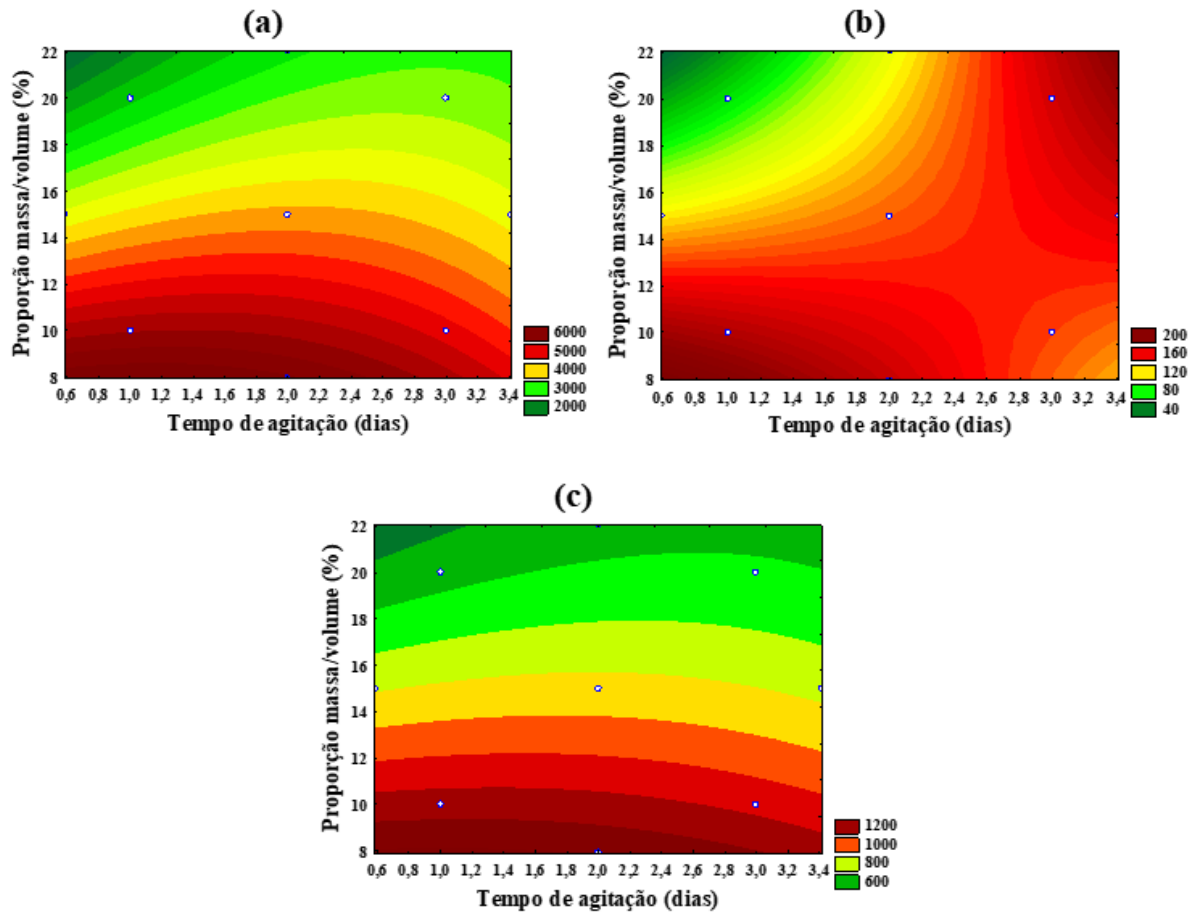
Quando um modelo apresenta falta de ajuste em um planejamento experimental, significa que ele não consegue explicar adequadamente a variação nos dados que não pode ser atribuída ao erro experimental. Esse tipo de situação ocorre quando há padrões nos dados que o modelo não consegue capturar, indicando que a relação entre as variáveis de entrada e a resposta não é linear ou não está bem representada pelo modelo escolhido. Isso pode ocorrer por diversos motivos, como a presença de variáveis não consideradas no modelo, interações complexas entre os fatores, ou mesmo uma inadequação do próprio modelo matemático escolhido para descrever o sistema estudado.

Porém, o modelo será utilizado no presente trabalho somente para a faixa de estudo, no entanto, deve-se ser transparente sobre as limitações do modelo e interpretar seus resultados com cautela.

As superfícies de contorno foram geradas em função da proporção massa/volume e do tempo de agitação, e estão dispostas na Figura 9.

Ao analisar a figura é claramente perceptível o quanto que a proporção massa/volume é importante na obtenção do teor de CFT, visto que os melhores resultados (em vermelho escuro) foram encontrados ao utilizar as menores proporções de massa (10%). Embora o tempo não tenha exercido grande interferência na resposta, é possível perceber, que tempos menores, são ligeiramente mais favoráveis.

**Figura 9** - Curvas de contorno para análise das respostas obtidas no planejamento experimental.



Nota: (a) compostos fenólicos totais; (b) flavonoides totais e (c) atividade antioxidante (ensaio DPPH).

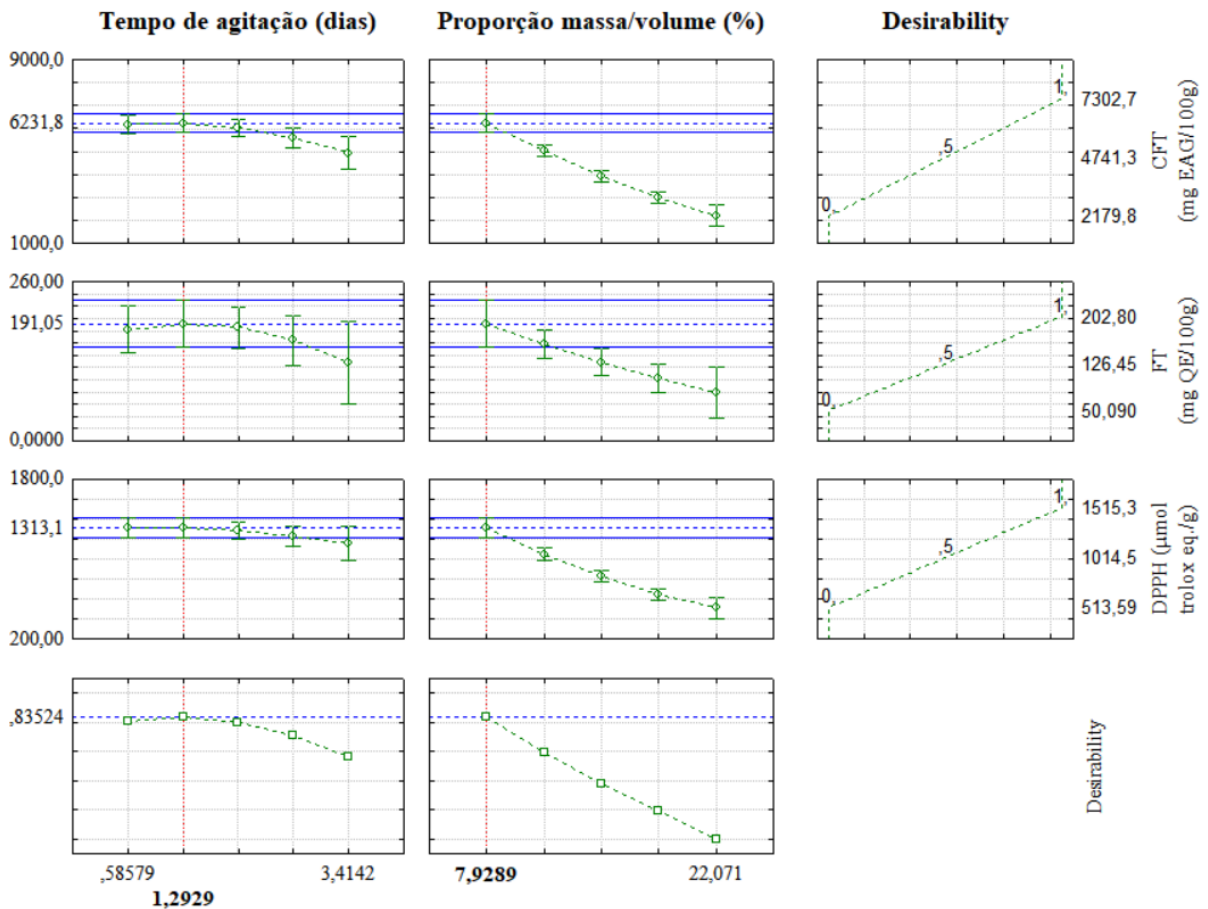
Verifica-se que a superfície de contorno para o teor de flavonoides totais aparentemente apresenta duas regiões distintas para os melhores resultados, a primeira localizada na interseção entre os menores níveis das variáveis (menores tempos e menores proporções de massa) e a segunda nas regiões de maiores níveis, entretanto ao fazer uma correlação com a Tabela 6, é claramente perceptível que a melhor região seria a primeira, um vez que a intercessão entre os menores níveis (ensaio 1) resultou no valor de 202,80 (mg QE/100g), enquanto a intercessão entre os maiores níveis (ensaio 4), resultaram em um valor bem menor, de apenas 138,79 (mg QE/100g).

Para a atividade antioxidante, é possível perceber que a proporção massa/volume é mais uma vez a variável que mais interfere na resposta, onde os melhores resultados (em vermelho escuro) estão localizados nas regiões com menores proporções de massa. Com relação ao tempo de agitação é visto que não há uma grande mudança na resposta ao percorrer os diferentes níveis estudados, indicando que esta variável teve pouca influência na resposta.

Foi utilizada a função desejabilidade, cujos os gráficos apresentados na Figura 10 têm o objetivo de fornecer os melhores valores de cada variável e assim, realizar a otimização do processo.

Os gráficos de cima representam o comportamento predito pelo modelo e os da linha de baixo mostram as melhores condições via desejabilidade, nos quais as linhas vermelhas mostram as condições ótimas para cada variável individualmente.

**Figura 10** - Perfil de valores preditos e desejabilidade para otimização do tempo de agitação (dias) e proporção massa/volume (%) para extração de geoprópolis utilizando agitação assistida por ultrassom.



A função desejabilidade apresentou valor 0,83524 que significa que pode prever os termos observados para a faixa deste estudo, onde podemos ainda trabalhar com condições mais econômicas para o processo.

Os resultados mostram que a melhor resposta predita pelo modelo para o teor de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante seria alcançada utilizando os menores valores da variável tempo de agitação, como existe mais de um valor possível, optou-se por utilizar o menor tempo, uma vez que resultará na obtenção mais rápida do produto e

menor gasto de energia durante a elaboração do extrato (reduzindo os custos do processo). Referente a variável proporção massa/volume a melhor condição em todos os casos avaliados, foi obtida utilizando seu menor valor.

Dessa forma, a função desejabilidade apontou as melhores condições de extração, que foi encontrada utilizando-se o tempo de agitação de 0,59 dias (aproximadamente 14 horas) e 7,92% de massa de geoprópolis, no qual os valores preditos para CFT, FT e atividade antioxidante (DPPH), respectivamente, foram de 6231,8 (mg EAG/100g), 191,05 (mg QE/100g) e 1313,1 ( $\mu\text{mol}$  trolox eq./g).

Na sequência, foi realizada a extração na condição ótima (para a geoprópolis das três espécies de abelhas sem ferrão do estudo), na qual as variáveis respostas foram novamente avaliadas, bem como foi realizado mais dois testes de atividade antioxidante (ABTS e FRAP), tendo seus resultados expressos na Tabela 8.

**Tabela 8** - Resultados das análises do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante obtidos na condição ótima.

Amostra	CFT (mg EAG/100g)	FT (mg QE/100g)	Ensaio DPPH ( $\mu\text{mol}$ trolox eq./g)	Ensaio ABTS ( $\mu\text{mol}$ trolox eq./g)	Ensaio FRAP ( $\mu\text{mol}$ Sulfato ferroso eq./g)
U.A	13019,19 $\pm$ 186,56 <sup>a</sup>	190,31 $\pm$ 2,61 <sup>b</sup>	1537,66 $\pm$ 19,52 <sup>a</sup>	1773,56 $\pm$ 6,52 <sup>a</sup>	7074,41 $\pm$ 215,73 <sup>a</sup>
U.B.R	5491,1 $\pm$ 446,33 <sup>c</sup>	2498,02 $\pm$ 78,24 <sup>a</sup>	905,90 $\pm$ 25,34 <sup>c</sup>	726,67 $\pm$ 4,71 <sup>c</sup>	889,79 $\pm$ 24,62 <sup>c</sup>
U.C	7367,57 $\pm$ 155,59 <sup>b</sup>	219,57 $\pm$ 5,49 <sup>b</sup>	1079,92 $\pm$ 9,45 <sup>b</sup>	1132,93 $\pm$ 10,92 <sup>b</sup>	4425,92 $\pm$ 69,98 <sup>b</sup>

Fonte: Dados da Pesquisa, (2024).

Nota: Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de tukey ( $p < 0,05$ ). U.A: urucu amarela; U.B.R: urucu boca de renda; U.C; urucu cinzenta; CFT: Compostos Fenólicos Totais; FT: Flavonoides totais; DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); FRAP: poder antioxidante de redução do ferro.

O ponto ótimo da amostra de U.C apresentou erros abaixo de 20% sendo considerado um nível de confiança de 80% devido à limitações do modelo devido ao seu uso apenas a indicações de tendências e também pela falta de ajuste do modelo matemático, mas ainda assim, pode-se obter valores satisfatórios gerados a partir do planejamento, sendo os valores encontrados para CFT e FT superiores ao que foi previsto na desejabilidade, que previa os valores de 6231,80 mg EAG/100g para CFT e 191,05 (mg QE/100g) para CFT. Esta condição encontrada no planejamento foi utilizada nas demais espécies, onde os resultados também estão expressos na Tabela 8.



Todas as amostras apresentaram atividades antioxidantes, sendo observado que com exceção da amostra U.B.R, as demais apresentaram valores mais elevados nos ensaios ABTS e FRAP, quando comparado ao método do DPPH. Comportamento similar foi verificado no estudo de Kasote et al. (2019), em que todas as sete amostras de extratos de própolis de abelhas sem ferrão estudadas apresentaram atividades antioxidantes mais altas no ensaio ABTS do que no método DPPH, o que pode ser atribuído à capacidade do radical ABTS em reagir com uma gama mais ampla de antioxidantes fenólicos, incluindo hidrofílicos e lipofílicos.

Rubinho et al. (2020) analisaram a composição química da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* e avaliaram a sua capacidade antioxidante por meio de diferentes ensaios tais como DPPH, ABTS, FRAP e ORAC, os autores relacionaram a capacidade antioxidante observada nas amostras a presença de flavonoides e ácidos fenólicos identificados durante o estudo.

Silva, P. et al. (2020) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes amostras de geoprópolis de mandaçaia (*Melipona mandacaia*), constatando que o extrato etanólico com melhor desempenho nos ensaios de sequestro de DPPH e ABTS foi o que continha a maior valor de compostos fenólicos totais (213,89 mg EAG/g), que de acordo com os autores, são os responsáveis pela sua ação antioxidante.

Ramón-Sierra et al. (2019) constataram que o extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona beecheii* possui potencial antioxidante, sendo verificada sua ação por pelo menos dois mecanismo: a captação de radicais livres (DPPH) e a redução de íons metálicos em solução (poder redutor do Ferro), que mais uma vez foi atribuída à presença de quantidades significativas de compostos bioativos analisados, sendo eles o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e flavanonas totais-diidroflavonóis.

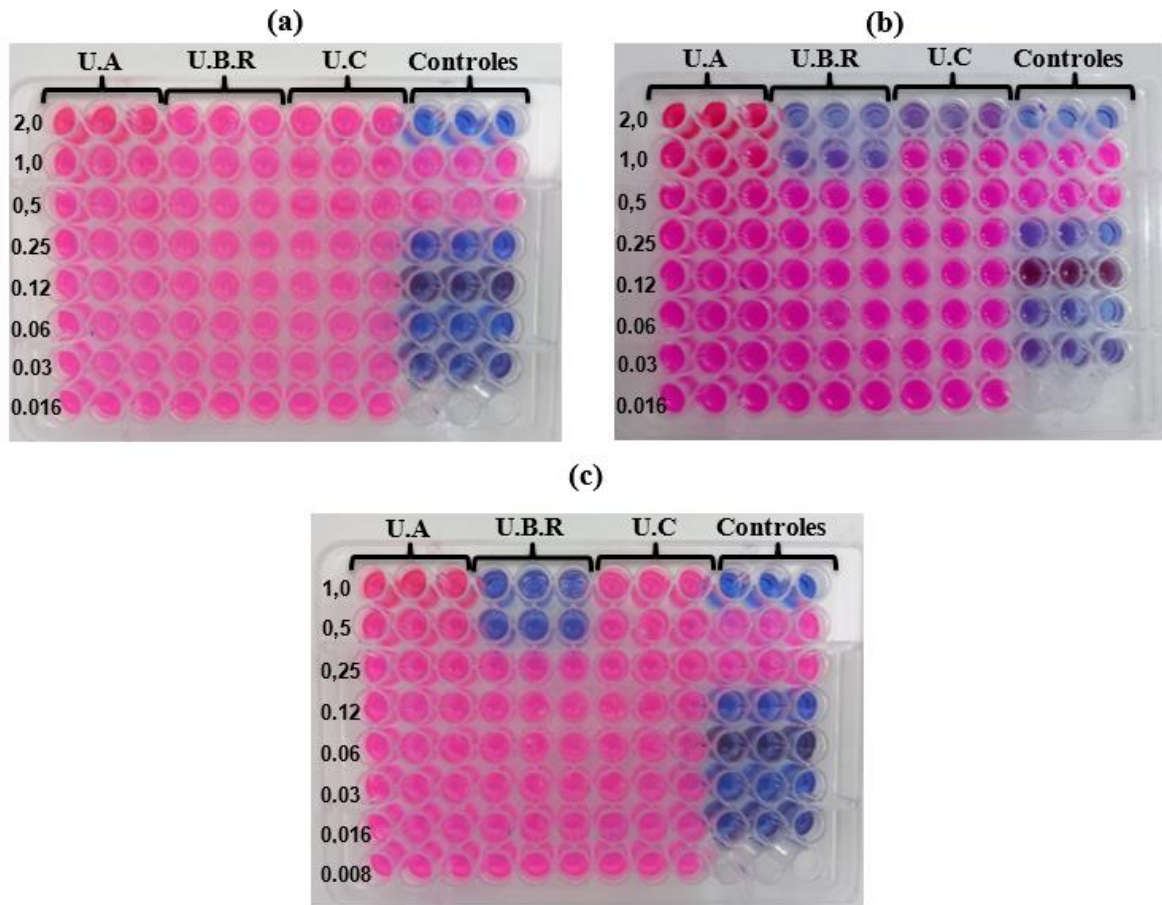
## 5.5 Atividade antimicrobiana

Os resultados da análise de contração inibitória mínima dos extratos de geoprópolis na condição ótima são mostrados na Figura 11. Observou-se que nenhuma das concentrações dos extratos testados foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *E. coli* evidenciado pelo aparecimento da coloração rosa (conforme apresenta a Figura 11 a).

O extrato de geoprópolis da abelha urucu boca de renda nas concentrações de 2,0 e 1,0 mg/mL, bem como o extrato de geoprópolis da abelha urucu cinzenta na contração de 2,0 mg/mL, conseguiram inibir o crescimento da bactéria *S. aureus*, conforme mostra a Figura 11 b. Nesta placa também foi possível perceber que a geoprópolis de urucu boca de renda na

concentração de 0,5 mg/mL apresentava uma coloração diferente, por este motivo optou-se por repetir o teste para *S. aureus*, com objetivo de confirmar esse resultado (com concentração inicial dos extratos de 1,0 mg/mL), conforme visto na Figura 11 c.

**Figura 11** - Contração inibitória mínima dos extratos de geoprópolis.

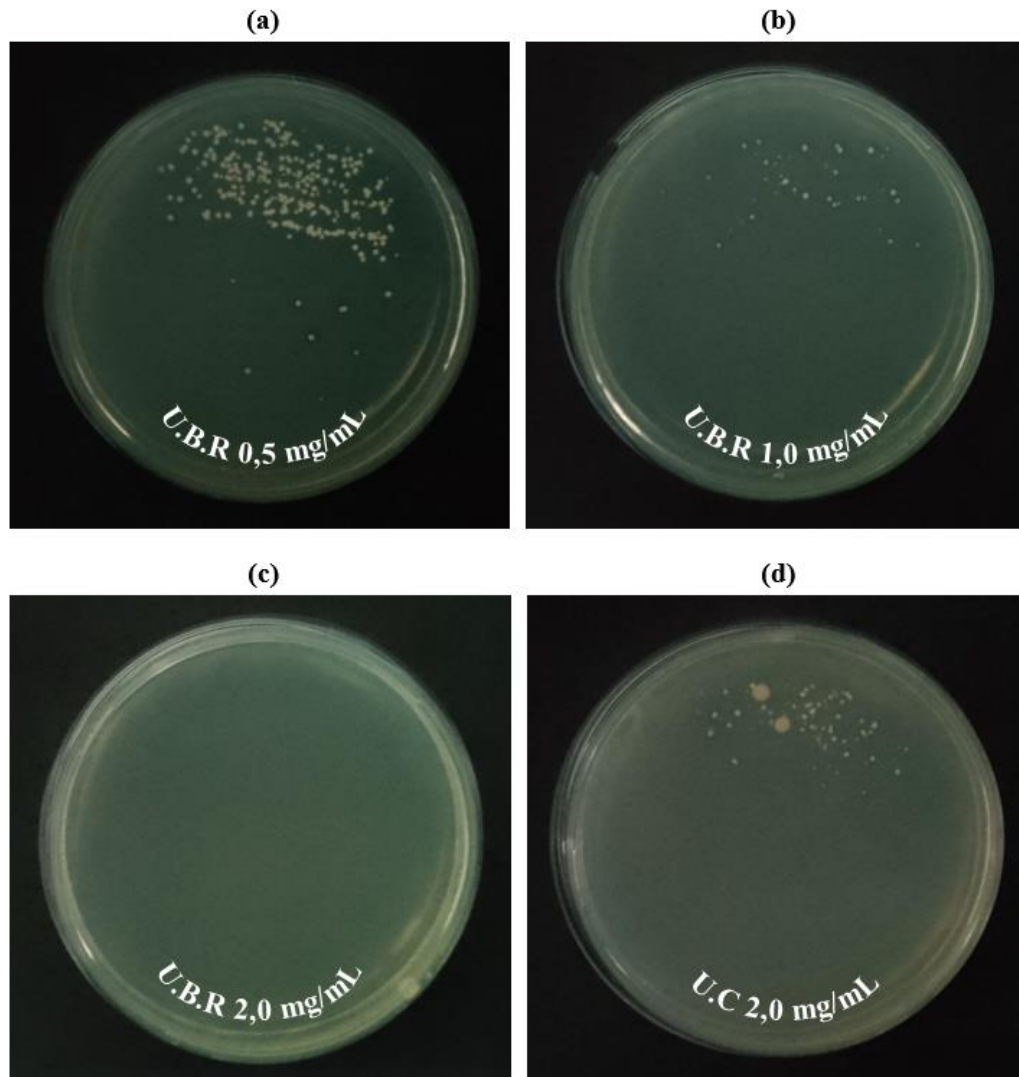


Nota: (a) placa de *E. coli* ; (b) placa de *S. aureus* e (c) placa de *S. aureus* (repetição a partir de 1 mg/mL de extrato). U.A: urucu amarela; U.B.R: urucu boca de renda e U.C: urucu cinzenta.

Como resultado final, os extratos provenientes da espécie urucu boca de renda e urucu cinzenta apresentaram ação antimicrobiana frente a bactéria *S. aureus*, exercendo as respectivas CIM's, de 0,5 mg/mL (Figura 11 c) e 2,0 mg/mL (Figura 11 b), enquanto o extrato U.A não apresentou atividade antimicrobiana, o que provavelmente está atrelado ao teor de flavonoides presentes nas amostras, uma vez que a amostra U.B.R foi a que apresentou a melhor atividade antimicrobiana e também possuía o maior teor de flavonoides totais, conforme foi mostrado anteriormente na Tabela 8.

Todas as concentrações dos extratos que inibiram o crescimento de *S. aureus* passaram para o ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM), apresentado na Figura 12.

**Figura 12** - Contração bactericida mínima dos extratos de geoprópolis.



Nota: U.B.R: uruçu boca de renda e U.C: uruçu cinzenta.

Para a espécie uruçu boca de renda, a placa com o extrato na concentração de 0,5 mg/mL teve uma elevada quantidade de colônias (Figura 12 a), na concentração de 1,0 mg/mL houve o aparecimento de uma quantidade bem menor de colônias, porém ainda foi superior a 3 colônias (Figura 12 b), já a concentração de 2,0 mg/mL, resultou no aparecimento de uma quantidade inferior a 3 colônias, conforme pode ser observado na Figura 12 c, confirmando que esta última concentração corresponde a CBM deste extrato.

A CBM do extrato da espécie uruçu cinzenta apresentou um valor superior a 2,0 mg/mL, visto que frequentemente o valor da CBM é maior que o valor da CIM, e como a concentração máxima testada desse extrato foi 2,0 mg/mL, não foi possível determinar a sua CBM, conforme visto na Figura 12 d, onde houve um crescimento superior a 3 colônias na placa de ágar Mueller-Hinton, nesta concentração de extrato.

Rubinho et al. (2020) ao analisarem a geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, obtiveram resultados semelhantes, ao constatarem que o extrato testado não apresentou ação frente às bactérias gram-negativas. Entretanto, foi eficiente frente aos microrganismos gram-positivos (incluindo cepas resistentes), obtendo CIM de 0,06 a 0,12 mg/mL frente a cepa de *S. aureus* ATCC 6538 e CIM de 0,12 a 0,25 mg/mL frente às cepas multirresistentes de *S. aureus* (PFD7, PFD11, PFD13 e PFD14), sendo esses valores menores do que os encontrados no presente trabalho.

Kasote et al. (2019) avaliaram extratos de sete amostras de própolis de abelha sem ferrão da Índia, constatando que todas as amostras foram eficazes contra microrganismos gram-positivos e leveduras, entretanto apresentaram atividade fraca-moderada contra microrganismos gram-negativos, especialmente contra *E. coli*.

Campos et al. (2015), constataram que o extrato de própolis da abelha *Tetragonisca fiebrigi* também apresentou maior atividade contra bactérias gram-positivas, com CIM de 0,55; 0,77 e 0,88 mg/mL e MBC de 1,50; 1,75 e 3,8 mg/mL frente as cepas de *S. aureus* (ATCC 43300); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 43300), respectivamente, entretanto foi considerada inativa contra bactérias gram-negativas, uma vez que os valores de CIM foram superiores a 3,00 mg/mL, frente as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Proteus mirabilis* (ATCC 43300).

Torres et al. (2018), avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, constatando que também houve um efeito mais proeminente do extrato contra bactérias gram-positivas, em comparação com bactérias gram-negativas, podendo estes resultados estarem interligados as características da parede celular, que é mais complexa nas bactérias gram-negativas.

Por este motivo, os autores realizaram um ensaio de liberação de constituintes celulares para investigar um possível mecanismo de ação do extrato de geoprópolis, ou seja, avaliaram a ruptura da membrana celular, o que causaria a liberação de grandes moléculas para o meio. O ensaio revelou uma liberação significativa de constituintes intracelulares de *S. aureus* e *E. coli*, para o meio de incubação na presença do extrato de *M. quadrifasciata quadrifasciata* (a liberação relativa para *S. aureus* foi 6,61 vezes maior que o controle, enquanto para *E. coli* a liberação foi 5,65 vezes maior que o controle), sendo constatado que o extrato foi capaz de causar lise celular.

Isidorov et al. (2022) obtiveram CIM mais baixas que as encontradas no presente trabalho, ao avaliarem própolis e geoprópolis de quatro espécies de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes*, *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi*), onde a CIM contra *S.aureus* variou de 0,03 a 0,12 mg/mL, porém diferente do presente trabalho, essas amostras também foram eficientes contra *E. coli*, apresentando CIM variando de 0,12 a 0,5 mg/mL. Em relação a CBM, os extratos de própolis das espécies *S. postica* e *T. fiebrigi* apresentaram valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho (2,0 mg/mL) contra *S. aureus*, enquanto os extratos das espécies *T. clavipes* e *M. quadrifasciata quadrifasciata* apresentaram valores menores, com CBM igual a 0,12 mg/mL.

Dos santos et al. (2023), observaram que o extrato de geoprópolis da abelha *Melipona subnitida* exibiu CIM de 0,064 mg/mL contra as cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), bem como CIM igual a 0,25 mg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), enquanto o extrato de própolis de *Scaptotrigona depilis* apresentou atividade antibacteriana significativa apenas para a cepa de *E.coli*, com valor de CIM igual a 0,17 mg/mL. Dessa forma os autores constataram ação contra cepas gram-positivas e gram-negativas, o que diverge parcialmente dos nossos achados, em que não foi observado ação contra cepas Gram-negativas, reforçando o fato de que as atividades biológicas variam de acordo com as diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

Outros trabalhos também têm demonstrado a ação antimicrobiana da geoprópolis frente a outros microrganismos. Valcanaia et al. (2022) avaliaram a ação de óleos de geoprópolis e própolis das abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*, tendo como resultado que todas as amostras demonstraram atividade promissora contra *Mycoplasma pneumoniae*, com CIMs de 0,10 a 0,22 mg/mL.

Coutinho et al. (2023), avaliaram extratos de geoprópolis de *Melipona scutellaris*, observando que dentro as cepas de referência testadas, o microrganismo mais resistente ao extrato foi *Candida albicans* (ATCC 10231), para o qual o extrato apresentou MIC variando de 1,35 a 2,5 mg/mL, em seguida a MIC contra *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) com valor de 0,50 a 1,00 mg/mL, enquanto a MIC contra *S. aureus* (ATCC 4330) foi de 0,05 a 0,10 mg/mL e MBC de 1,25 a 2,01 (que foi semelhante ao encontrado em nosso trabalho), sendo considerado o microrganismo mais sensível ao extrato testado.

Os autores explicam que a diferença observada na eficiência da própolis para o controle de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode ser devida à diferença na estrutura da parede celular, sendo que as Gram-negativas são mais complexas, o que pode impedir a ação de compostos com efeito antimicrobiano (COUTINHO et al., 2023).

Coelho et al. (2018) constataram que a geoprópolis de *Scaptotrigona postica*, possui eficiente atividade antiviral contra a rubéola, com capacidade de inibir a ligação do vírus e consequentemente impedir sua replicação, além de inibir a produção de partículas infecciosas do vírus em células SIRC infectadas pós-tratadas e pré-tratadas. Os autores atribuíram essa atividade aos altos teores dos flavonoides vicenina-2 e escaftosideo, que possivelmente atuaram bloqueando a ligação do vírus ao receptor da membrana celular das células.

### 5.6 Composição química dos extratos de geoprópolis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS)

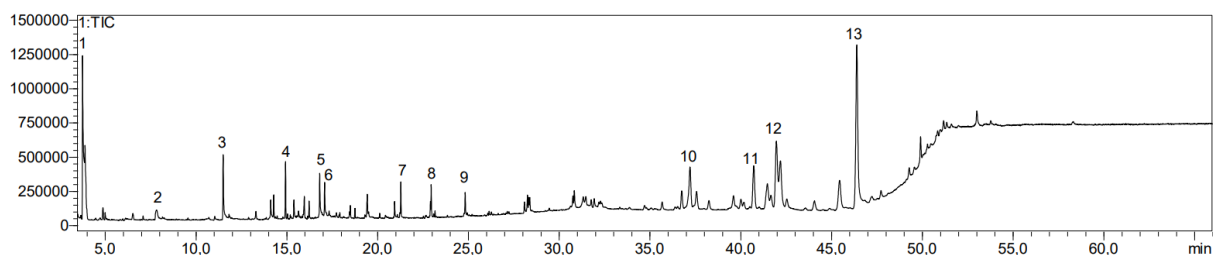
A identificação dos compostos presentes nos extratos de geoprópolis foi realizada por meio da comparação do espectro de massas obtidos em cada amostra, com a biblioteca NIST23 (do inglês, National Institute of Standard and Technology).

Os cromatogramas dos extratos obtidos das espécies urucu amarela, urucu boca de renda e urucu cinzenta estão apresentados nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente, no qual estão enumerados os principais compostos presentes em cada amostra. Vale ressaltar que foi realizada a ampliação de alguns cromatogramas para melhor visualização do cromatograma TIC (Total Ion Chromatogram).

Os picos 1,2,3,4,5,7,8 e 9 observados na Figura 13 representam os compostos Etano, 1,1-dietoxi; Glicerina; Catecol; Cariofileno; 1,3,5-Benzenotriol; Ácido hexadecanóico, éster etílico; Oleato de etila e 9-Octadecenamida, (Z)-, respectivamente.

Em relação ao picos 6,10,11,12 e 13, não foi possível realizar sua identificação, devido à baixa similaridade com a biblioteca NIST23, entretanto esses picos se destacam no cromatograma devido ao seu tamanho e juntamente com os outros compostos identificados podem ser os responsáveis pela elevada ação antioxidante observada na amostra U.A.

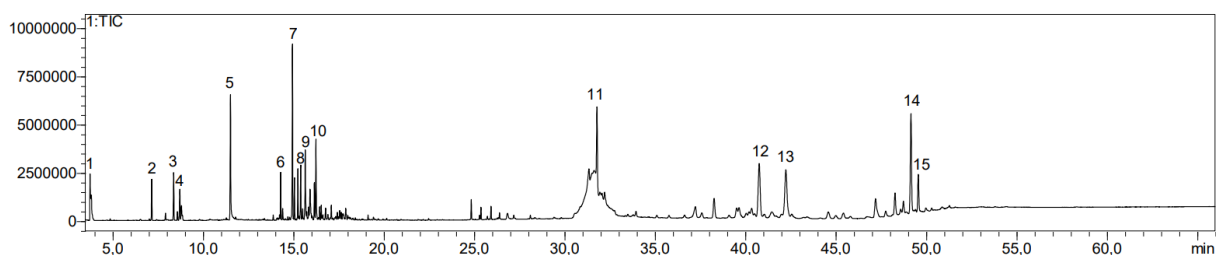
**Figura 13** - Cromatograma obtido para a amostra U.A.



Fonte: Resultados obtidos em parceria com a Shimadzu Brasil, 2024.

Os picos 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, observados na Figura 14 representam os compostos Etano, 1,1-dietoxi;  $\alpha$ -pineno;  $\alpha$ -Fellandreno; o-Cimeno; Catecol; Copaeno; Cariofileno; Humuleno;  $\gamma$ -Muuroleno e Naftaleno,1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, [1S-(1 $\alpha$ ,4 $\alpha$  $\beta$ ,8 $\alpha\alpha$ )]-, respectivamente. Em relação ao picos 11,12,13,14 e 15, não foi possível realizar sua identificação, devido à baixa similaridade com a biblioteca NIST23.

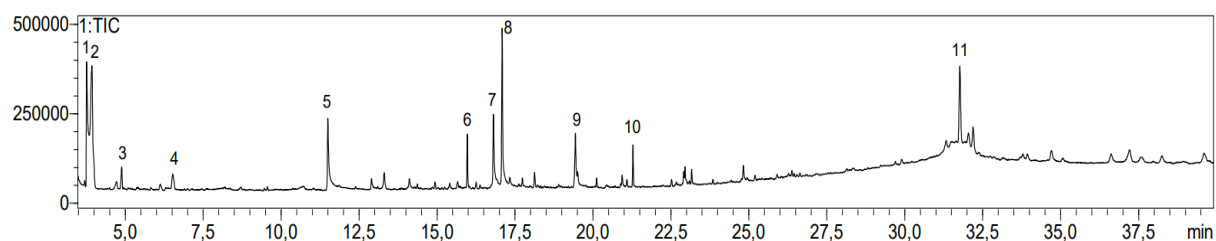
**Figura 14** - Cromatograma obtido para a amostra U.B.R.



Fonte: Resultados obtidos em parceria com a Shimadzu Brasil, 2024.

Os picos 1,2,3,4,5,6,7 e 10, observados na Figura 15 representam os compostos Etano, 1,1-dietoxi; 1-Pentanol; Ácido butanóico, éster etílico; Ácido pentanóico, éster etílico; Catecol; 2,4-Di-terc-butilfenol; 1,3,5-Benzenotriol e Ácido hexadecanóico, éster etílico, respectivamente. Em relação ao picos 8,9 e 11 não foi possível realizar sua identificação, devido à baixa similaridade com a biblioteca NIST23.

**Figura 15** - Cromatograma obtido para a amostra U.C.



Fonte: Resultados obtidos em parceria com a Shimadzu Brasil, 2024.

Nas Tabelas 9, 10 e 11 estão apresentados todos os compostos individuais encontrados em cada amostra, conforme a similaridade com a biblioteca NIST. Para este estudo foram cuidadosamente considerados apenas os compostos que apresentaram uma similaridade superior a 90%.

**Tabela 9** - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.A.

Nome	Tempo de Retenção (min)	Área	Similaridade (%)	CAS#
Etano, 1,1-dietoxi	3,772	4627291	97	105-57-7
2,3-Butanodiol	5,014	118824	95	513-85-9
Ácido pentanóico, éster etílico	6,543	198016	93	539-82-2
Glicerina	7,849	583488	94	56-81-5
Catecol	11,515	1526558	97	120-80-9
1,2,3-Benzenotriol	14,132	482688	92	87-66-1
Copaeno	14,301	412696	95	3856-25-5
Cariofileno	14,949	848679	96	87-44-5
Humuleno	15,412	398941	90	6753-98-6
2,4-Di-terc-butilfenol	15,985	455573	94	96-76-4
Naftaleno, 1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, [1S-(1a,4a,8a)]	16,247	255750	94	523-47-7
1,3,5-Benzenotriol	16,831	1099840	97	108-73-6
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimetil	18,517	170964	95	4602-84-0
2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimetil-, (E,E)	18,773	135830	92	502-67-0
ácido n-hexadecanóico	20,956	287260	93	57-10-3
Ácido hexadecanóico, éster etílico	21,3	518052	95	628-97-7
Éster etílico do ácido linoléico	22,928	193793	94	544-35-4
Oleato de etila	22,97	479282	94	111-62-6
Ácido octadecanóico, éster etílico	23,184	85471	90	111-61-5
9-Octadecenamida, (Z)-	24,842	461121	94	301-02-0

Fonte: Resultados obtidos em parceria com a Shimadzu Brasil, 2024.

Nota: CAS#: número com um registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service.



**Tabela 10** - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.B.R.

(continua)				
Nome	Tempo de Retenção (min)	Área	Similaridade (%)	CAS#
Etano, 1,1-dietoxi-	3,752	6401031	97	105-57-7
Ácido butanóico, éster etílico	4,867	156437	96	105-54-4
Ácido pentanóico, éster etílico	6,543	183044	93	539-82-2
Biciclo[3.1.0]hex-2-eno, 2-metil-5-(1-metiletil)-	7,031	152504	95	2867-05-2
$\alpha$ -pineno	7,163	4186246	97	80-56-8
$\beta$ -pineno	7,926	788505	96	127-91-3
5-Hepten-2-ona, 6-metil-	8,061	160439	91	110-93-0
$\alpha$ -Fellandreno	8,379	5312706	96	99-83-2
1,3-Ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metiletil)-	8,587	980767	96	99-86-5
o-Cimeno	8,719	4064044	97	527-84-4
$\beta$ -Fellandreno	8,811	2326169	93	555-10-2
Eucaliptol	8,864	487633	96	470-82-6
Cânfora	10,803	51612	93	76-22-2
Terpinen-4-ol	11,291	241697	92	562-74-3
Catecol	11,521	17104804	97	120-80-9
2-Ciclohexen-1-ona, 3-metil-6-(1-metiletil)-	12,506	58800	91	89-81-6
$\alpha$ -Cubebeno	13,886	473758	94	17699-14-8
1,2,3-Benzenotriol	14,122	239073	92	87-66-1
Ylangene	14,234	539621	95	14912-44-8
Copaeno	14,298	4522065	95	3856-25-5
(1S,5S)-2-Metil-5-((R)-6-metilhept-5-en-2-il)biciclo[3.1.0]hex-2-eno	14,408	1179568	95	159407-35-9
3H-3a,7-Metanoazuleno, 2,4,5,6,7,8-hexahidro-1,4,9,9-tetrametil-, [3aR-(2S,4R,7S)]	14,696	316375	95	2387-78-2
Cariofileno	14,949	18833289	96	87-44-5

Tabela 10 - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.B.R.

(continuação)

Nome	Tempo de Retenção (min)	Área	Similaridade (%)	CAS#
cis- $\alpha$ -bergamoteno	15,059	3947053	94	18252-46-5
((3R,3aR,7R,8aS)-3,8,8-Trimetil-6-metilenooctahidro-1H-3a,7-metenoazuleno	15,143	102117	91	79120-98-2
cis- $\beta$ -Farneseno	15,25	4634013	95	28973-97-9
sibireno	15,31	438129	92	14029-18-6
Humuleno	15,405	5646533	96	6753-98-6
1H-Ciclopropa[a]naftaleno, 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahidro-1,1,7,7a-tetrametil- (1aR, (1aR,7a,7a,7b))	15,51	1123808	93	17334-55-3
$\gamma$ -Muuroleno	15,658	8981019	94	30021-74-0
(1S,5S)-4-Metileno-1-((R)-6-metilhept-5-en-2-il)biciclo[3.1.0]hexano	15,741	841031	91	58319-04-3
Naftaleno, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metilenoil)-, [2R-(2a,4a,8a)]	15,792	261404	91	473-13-2
1H-Ciclopropa[a]naftaleno, 1a,2,3,3a,4,5,6,7b-octahidro-1,1,3a,7-tetrametil- (1aR, (1aR,3a,7b))	15,848	1486952	92	489-29-2
(R)-1-Metil-4-(6-metilhept-5-en-2-il)ciclohexa-1,4-dieno	16,034	593833	93	28976-67-2
Naftaleno, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)-, (1a,4a,8a,9a)	16,159	3705328	95	39029-41-9
Naftaleno, 1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, [1S-(1a,4a,8a,9a)]	16,247	9124445	93	523-47-7
Naftaleno, 1,2,3,4,4a,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-	16,383	380103	90	16728-99-7
Naftaleno, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1,8a-dimetil-7-(1-metilenoil)-, [1R-(1a,7a,8a)]	16,454	1388576	91	4630-07-3
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-, (E)-	16,635	484569	94	40716-66-3
Óxido de cariofileno	17,096	1519546	95	1139-30-6
4a(2H)-Naftalenol, 1,3,4,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, (1S,4D,4aS,8aD)	17,434	1024757	92	19912-67-5
4a(2H)-Naftalenol, 1,3,4,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, (1S,4D,4aS,8aD)	17,65	888285	90	19912-67-5
$\tau$ -Cadinol	17,732	970644	90	5937-11-1
$\alpha$ -Cadinol	17,893	1308363	91	481-34-5
3-Ciclohexen-1-ol, 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-	18,015	519040	94	15352-77-9

**Tabela 10** - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.B.R.

(conclusão)

Nome	Tempo de Retenção (min)	Área	Similaridade (%)	CAS#
1-Naftalenol, decahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletilideno)-, [1R-(1 $\alpha$ ,4a $\beta$ ,8a $\alpha$ )]-	18,428	197350	91	473-04-1
Benzoato de Benzila	19,129	459950	95	120-51-4
1-Hexadecanol	20,163	190162	95	36653-82-4
Ácido benzenoacético, éster 2-feniletílico	20,727	70050	91	102-20-5
Fitol	22,481	117673	94	150-86-7

Fonte: Resultados obtidos em parceria com a Shimadzu Brasil, 2024.

Nota: CAS#: número com um registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service.

**Tabela 11** - Resultados da identificação dos compostos da amostra U.C.

Nome	Tempo de Retenção (min)	Área	Similaridade (%)	CAS#
Etano, 1,1-dietoxi-	3,775	1219384	97	105-57-7
1-Pentanol	3,943	1977296	96	71-41-0
Ácido butanóico, éster etílico	4,898	144556	95	105-54-4
Ácido pentanóico, éster etílico	6,537	176216	93	539-82-2
Catecol	11,512	678856	97	120-80-9
1,2-Benzenodiol, 3-metil-	12,911	69410	91	488-17-5
2,4-Di-terc-butilfenol	15,983	260989	96	96-76-4
1,3,5-Benzenotriol	16,822	628041	97	108-73-6
Naftaleno, 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-	18,142	83836	90	483-78-3
Ácido hexadecanóico, éster etílico	21,297	199031	95	628-97-7
Oleato de etila	22,965	127064	92	111-62-6
Ácido octadecanóico, éster etílico	23,18	73081	91	111-61-5

Fonte: Resultados obtidos em parceria com a Shimadzu Brasil, 2024.

Nota: CAS#: número com um registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service.

O total de 82 compostos foram identificados nas três amostras, sendo que a amostra U.B.R. apresentou uma maior quantidade em comparação com outras, na qual foram identificados 50 constituintes individuais, seguida da amostra U.A com um total de 20 constituintes identificados e por último a amostra U.C com 12 constituintes.

A identificação dos compostos presentes nos extratos revelou uma grande diferença entre as amostras. Observou-se que poucos constituintes foram comuns em todos os extratos, uma vez que dentre o total de compostos, apenas 3 (menos de 4%) estavam presentes nas três amostras, sendo eles o Etano, 1,1-dietoxi; ácido pentanóico, éster etílico e catecol.

Comportamento semelhante foi observado por Isidorov et al. (2022), que avaliou o perfil de quatro amostras de própolis, produzidas por diferentes espécies de abelhas sem ferrão, onde foi verificado que menos 10% dos compostos identificados eram comuns a todas as amostras, evidenciando que embora existissem compostos comuns nos diferentes extratos avaliados, a composição da própolis é individual é bastante específica.

Os dados químicos publicados até o momento demonstram uma enorme diversidade química das resinas utilizadas pelas abelhas sem ferrão em geral (POPOVA et al., 2021). O que também foi verificado em nossos resultados, que mostraram diferenças químicas entre as amostras de geoprópolis, o que reforça o fato de que as diferentes espécies de abelhas podem utilizar recursos florais diferentes, embora estejam presentes no mesmo habitat.

Souza, E. et al, (2018) chegaram a mesma conclusão ao avaliar extratos de própolis produzidos pelas abelhas *Frieseomelitta longipes* e *Apis mellifera*, onde foram encontrados diferentes componentes entre os dois extratos, embora estivessem expostos à mesma flora no mesmo período. Dessa forma, os autores explicam que as diferentes espécies também devem ter preferências distintas quanto à coleta de resinas.

Levando-se em consideração que a composição química da própolis varia de acordo com a flora da qual é obtida, alguns desses mesmos metabólitos identificados no presente trabalho já foram encontrados em própolis de outras espécies de abelhas sem ferrão, como é o caso do ácido linoleico, ácido octadecanóico, ácido hexadecanóico, glicerol e óxido de cariofileno, identificado em própolis de *Geniotrigona thoracica* (NAZIR, et al., 2018).

Os ácidos octadecanóico e hexadecanóico também foram identificados por Popova et al. (2022) ao avaliarem extratos de própolis de seis espécies de abelhas sem ferrão coletadas no Vietnã (*Tetragonula iridipennis*, *T. laeviceps*, *Lepidotrigona terminata*, *L. ventralis*, *Lisotrigona carpenteri* e *Homotrigona apicalis*).

Outro composto que estava presente nas amostras U.A e U.C foi o 2,4-Di-terc-butilfenol, que também foi relatado por estar presente em extratos de própolis da abelha

*Heterotrigona itama*, conforme descrito por Chong e Chua (2020). Os autores explicam que este composto é conhecido por exercer atividade antioxidante, em termos de sequestro de radicais livres, e que a ausência desse composto provavelmente poderia explicar a menor capacidade antioxidante do extrato de própolis, o que foi observado na amostra U.B.R, que não apresentou este composto e teve a menor atividade antioxidante nos três métodos avaliados, conforme foi mostrado anteriormente na Tabela 8.

Isidorov et al. (2022), também identificaram a presença de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -Fellandreno,  $\beta$ -Fellandreno, o-Cimeno, Cânfora,  $\alpha$ -Cubebeno, Ylangeno, Copaeno, Cariofileno, Humuleno,  $\gamma$ -Muuroleno, Óxido de cariofileno e  $\alpha$ -Cadinol, ao avaliarem extratos de própolis das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*, *Tetragona clavipes*, *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi*, onde foi demonstrado que todos os extratos também exerceram atividades antimicrobianas.

Souza, E. et al. (2018), também relataram a presença dos monoterpenos ( $\alpha$ -fellandreno,  $\beta$ -fellandreno e Cânfora), bem como os sesquiterpenos ( $\alpha$ -cubebeno, ylangene, copaeno, cis- $\alpha$ -bergamoteno, cariofileno, humuleno,  $\gamma$ -muuroleno e óxido de cariofileno) ao avaliar extratos de própolis das abelhas *Frieseomelitta longipes* e *Apis mellifera*, sendo que destes o cariofileno ( $\beta$ -Cariofileno), foi o composto majoritário. Entretanto também foram detectadas diferenças entre as duas amostras, pois a própolis de *F. longipes* continha mono e sesquiterpenos, enquanto a própolis de *A. mellifera* continha apenas sesquiterpenos. A avaliação de atividades biológicas desses extratos, demonstrou que ambos apresentaram atividade antimicrobianas significativas.

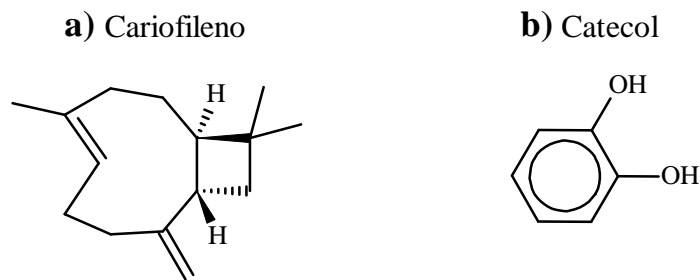
Os compostos de sesquiterpenos podem ser divididos em dois tipos, sendo eles os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, tais como  $\beta$ -cariofileno (cariofileno), copaeno, e ciclohexano, 1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metil etenil)-, [1S-(1. $\alpha$ , 2. $\beta$ , 4. $\beta$ .)] e sesquiterpenos oxigenados, como 1H-cicloprop[e]azulen-7-ol, deca hidro-1,1, 7-trimetil-4-metileno e óxido de  $\beta$ -cariofileno (óxido de cariofileno), que são compostos relatados na literatura por sua alta atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (MOHAMED et al., 2020).

O composto majoritário identificado na amostra U.B.R foi o sesquiterpeno Cariofileno (Figura 16 a), que apresentou-se em uma quantidade 22 vezes superior ao encontrado na amostra U.A, na qual também foi identificado. De acordo com Francomano et al. (2019), dados pré-clínicos confirmam que o Cariofileno ( $\beta$ -Cariofileno) é potencialmente útil em infecções por *Streptococcus*, osteoporose, esteato-hepatite e pode ainda ser capaz de exercer efeitos anticonvulsivantes, analgésicos, miorelaxantes, sedativos e antidepressivos.

O segundo composto majoritário da amostra U.B.R foi o composto fenólico Catecol (Figura 16 b) que apresentou-se em uma quantidade 10 vezes superior ao encontrado na amostra U.A e 25 vezes superior ao encontrado na amostra U.C, de acordo com os dados de área, constantes nas tabelas 9, 10 e 11, anteriormente.

Jeong et al. (2009) verificaram que o Catecol foi capaz de inibir significativamente o crescimento de *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, e também inibiu moderadamente o crescimento de *E. coli*, ao mesmo tempo que não inibiu o crescimento de bactérias benéficas (*Bifidobacterium breve*, *B. longum* e *Lactobacillus casei*), sendo constatado sua atividade seletiva de inibição do crescimento de bactérias, indicando que este composto pode ser útil como agente preventivo contra doenças causadas por bactérias intestinais prejudiciais.

**Figura 16** - Estruturas dos constituintes majoritários identificados na geoprópolis da abelha sem ferrão uruçú boca de renda (*Melipona seminigra pernigra*): a) sesquiterpeno, b) composto fenólico.



No presente trabalho a amostra U.B.R, além de possuir o catecol como um de seus componentes majoritários, também apresentou 12 sesquiterpenos ( $\alpha$ -cubebeno, ylangene, copaeno, cariofileno (principal composto majoritário), cis- $\alpha$ -bergamoteno, cis- $\beta$ -farneseno, sibireno, humuleno,  $\gamma$ -muuroleno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -cadinol,  $\tau$ -cadinol) e foi a única que continha monotepenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -fellandreno,  $\beta$ -fellandreno, o-cimeno, eucaliptol, cânfora e terpinen-4-ol), o que em conjunto com seu elevado teor de flavonoides totais podem ter sido os responsáveis pela sua maior atividade antibacteriana em comparação com as demais amostras, porém essa ação antimicrobiana poderá ser melhor explicada mediante sua determinação em compostos isolados do extrato de geoprópolis em estudos futuros.

## 6 CONCLUSÃO

---

A extração por método combinado de agitação assistida por ultrassom demonstrou ser uma técnica promissora na obtenção de extratos de geoprópolis, com resultados muito interessantes em relação ao teor de compostos fenólicos e flavonoides. A aplicação do planejamento experimental permitiu uma análise mais aprofundada sobre o comportamento da extração, com o qual foi possível realizar a otimização do processo, constatando-se que o ponto ótimo, obtido através da função desejabilidade, compreende o menor tempo de extração (0,59 dias) e a menor massa de geoprópolis (7,92%).

Foi verificado que todos os extratos de geoprópolis avaliados exerceram atividade antioxidante. As espécies urucu boca de renda e urucu cinzenta apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, porém tanto a atividade antioxidante quanto a antimicrobiana poderão ser mais bem explicadas em estudos futuros, mediante a determinação dessas atividades em compostos isolados do extrato de geoprópolis.

Os dados de composição físico-química e mineral, bem como a cromatografia gasosa mostraram que existem diferenças nos perfis químicos das amostras, embora as colmeias estivessem presentes no mesmo local. Dessa forma, as diferentes espécies de abelhas também possuem hábitos distintos no que diz respeito às suas preferências por plantas das quais recolhem as resinas para elaboração da geoprópolis. Diante das observações da presente pesquisa, a geoprópolis demonstrou potencial como material base para extração de compostos bioativos, o que incentiva o desenvolvimento de estudos sobre a aplicação destes extratos em diversas áreas, podendo resultar no desenvolvimento de fármacos, cosméticos e diversas aplicações na área alimentícia, como por exemplo a incorporação dos extratos de geoprópolis em formulações como agente antioxidante e aplicações na conservação de alimentos.

## REFERÊNCIAS

---

- ABDUH, M. Y. et al. Production of propolis and honey from *Tetragonula laeviceps* cultivated in Modular *Tetragonula* Hives. **Heliyon**, v. 6, n. 11, p. e05405. 2020.
- ABDULLAH, N. A. et al. Phytochemicals, mineral contents, antioxidants, and antimicrobial activities of propolis produced by Brunei stingless bees *Geniotrigona thoracica*, *Heterotrigona itama*, and *Tetrigona binghami*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 2902–2911. 2020.
- AGUIAR, J. M. V. **Determinação de compostos bioativos em frutas e vegetais consumidos na Região Autónoma da Madeira**. Dissertação (Mestrado em bioquímica aplicada). 2017. 158f. Universidade da Madeira. Disponível em: <https://digituma.uma.pt/bitstream/10400.13/1919/1/MestradoJoselin%20Vieira.pdf>. Acesso em: 20 de dez. de 2022.
- ARAÚJO, K. S. DA S. et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 61–68. 2016.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202–2210, 2010.
- ANDRADE, A. P. C. DE et al. A ação antimicrobiana dos extratos alcoólicos e aquosos da folha da goiabeira (*Psidium guajava* L.) no controle de *Staphylococcus aureus* ATCC 27922, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* SCOTT A. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 26, p. e019028–e019028. 2019.
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 239–244. 2001.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International** (20th ed.). Rockville: AOAC. 2016.
- ASEM, N. et al. Correlation between total phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity of Malaysian stingless bee propolis extract. **JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH**, v. 59, n. 4, p. 437–442. 2020.
- ATWATER, W. O.; BRYANT, A. P. The availability and food values of food materials. **12th Annual Report of the Storrs, CT Agricultural Experimental Station**, 1900.
- ÁVILA, S. et al. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 37–50. 2018.
- BACELAR-LIMA, C. G. et al. Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 343–348. 2006.



- BÁIDEZ, A. G. et al. Dysfunctionality of the Xylem in *Olea europaea* L. Plants Associated with the Infection Process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of Phenolic Compounds in Plant Defense Mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3373–3377. 2007.
- BANKOVA, V. et al. Constituents of Brazilian Geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1 jun. 1998.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643. 2010.
- BARBOZA, J. R. et al. Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. **Biology (Basel)**, v. 9, n. 9, p. 1bc–1bc, 1 set. 2020.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76. 1996.
- BARROS, D. DE M. et al. Potencial Utilização de Sistemas Antimicrobianos Naturais como Conservantes Alimentares / Potential Use of Natural Antimicrobial Systems as Food Conservatives. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 40476–40491, 24 jun. 2020.
- BONSUCCESSO, J. S. et al. Metals in geopropolis from beehive of *Melipona scutellaris* in urban environments. *Science of The Total Environment*, v. 634, p. 687–694. 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 ANEXO VI Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 jan. 2001.
- CALDAS, A. F.; DE OLIVEIRA, C. S.; DA SILVA, D. P. Resistência bacteriana decorrente do uso indiscriminado de antibióticos. **Scire Salutis**, v. 12, n. 1, p. 1–7. 2022.
- CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 296186, 2015.
- CARDOZO, D. V. et al. Variabilidade Química de Geoprópolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2456–2474, 23 set. 2015.
- CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540–560. 2017.

CHEN, L. et al. Interaction of chromium(III) or chromium(VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: An in vitro study. **Food Chemistry**, v. 244, p. 378–385, 1 abr. 2018.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5884–5892. 2012.

CHONG, F.; CHUA, L. Effects of Solvent and pH on Stingless Bee Propolis in Ultrasound-Assisted Extraction. **AGRIENGINEERING**, v. 2, n. 2, p. 308–316. 2020.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard: M07-A10**. 10. ed. v. 32, n. 2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COELHO, G. R. et al. Antiviral activity of geopropolis extract from *Scaptotrigona aff. postica* against Rubella virus. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 6, p. 91–106, 2018.

CONTRERA, F. A. L.; MENEZES, C.; VENTURIERI, G. C. New horizons on stingless beekeeping (Apidae, Meliponini). p. 4, 2011.

COUTINHO, S. et al. *Melipona scutellaris* Geopropolis: Chemical Composition and Bioactivity. **Microorganisms**, v. 11, n. 11, p. 2779, 2023.

CRUZ, L. F. DA S. 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.

DOS SANTOS, D. C. et al. Antibacterial and Toxic Activity of Geopropolis Extracts from *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) (Hymenoptera: Apidae) and *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera: Apidae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 11, p. e202300931, 2023.

DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 557–562. 2008.

EPA Method 3015A. **Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts**. Pittsburgh, United States: Duquesne University. 2007.

FERREIRA, B. L. **Caracterização Química da Geoprópolis Produzida por Abelhas Sem Ferrão no Estado de Santa Catarina**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2018. 126f. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/214247>. Acesso em: 18 de nov. de 2022.

FERREIRA, B. L. et al. Dataset about Southern-Brazilian geopropolis: Physical and chemical perspectives. **Data in Brief**, v. 29, p. 105109, 2020.

FERREIRA, J. et al. CHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GEOPROPOLIS FROM *Melipona subnitida* COLLECTED INSIDE AND OUTSIDE THE NEST. **Química Nova**, 2022.

FERREIRA, J. M. et al. Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 1, p. 4024721, 2017.

FERREIRA, R. DA C. et al. Essential and Potentially Toxic Elements from Brazilian Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Using ICP OES. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 9, p. 3527–3539. 2021.

FRANCOMANO, F. et al.  $\beta$ -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. **Applied Sciences**, v. 9, n. 24, p. 5420, jan. 2019.

GOMES, V. V. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of honey samples of *Apis mellifera* and different species of Meliponinae subfamily from the Brazilian eastern Amazon region. **Food Science and Technology**, v. 42, 13 jul. 2022.

HASHEMI, B. et al. Green solvents and approaches recently applied for extraction of natural bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 157, p. 116732, dez. 2022.

HUANG, S. et al. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632. 2014.

ISIDOROV, V. A. et al. Chemical Composition and Biological Activity of Argentinian Propolis of Four Species of Stingless Bees. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 22, p. 7686, 2022.

JEONG, E.-Y. et al. Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1006–1010. 2009.

KASOTE, D. et al. Chemical profiling, antioxidant, and antimicrobial activities of Indian stingless bees propolis samples. **JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH**, v. 58, n. 4, p. 617–625, 8 ago. 2019.

KUREK-GÓRECKA, A. et al. Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1203, jan. 2022.

LOPES, B. S.; LOPES, B. G.; FARIA, G. A. Levantamento do planejamento experimental e análises de dados utilizados em experimentos com piscicultura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e115111335049–e115111335049, 30 set. 2022.

MAGALHÃES, T. L. DE; VENTURIERI, G. C. **Aspectos Econômicos da Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste Paraense**. p. 38, 2010.

MANTA, V. G. **Avaliação *in vitro* do Potencial Antimicrobiano do Extrato Hidroalcoólico de Geoprópolis de *Melipona Quadrifasciata Quadrifasciata* Frente à Bactérias da Microbiota Cutânea**. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2022. 50f. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/30994>. Acesso em: 02 de ago. de 2023.

MATOS, M. S. V.; VALE, J. C. B.; MESQUITA, A. L. A. Redução do número de simulações

para identificação de parâmetros de modelos DEM usando redes neurais e planejamento de experimentos. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 27, p. e13137. 2022.

MEDINA-JARAMILLO, C.; CARVAJAL-DÍAZ, L. M.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A. F. Propolis from native Stingless Bees: ultrasound-assisted extraction. **Vitae (Medellín)**, v. 29, n. 2, 2022.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 18–24, mar. 2014.

MOHAMED, W. A. S. et al. GC-MS Evaluation, Antioxidant Content, and Cytotoxic Activity of Propolis Extract from Peninsular Malaysian Stingless Bees, *Tetrigona Apicalis*. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2020, p. 8895262–9, 2020.

MOTA, L. M. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, p. 164–172, 30 jun. 2010.

NAZIR, H. et al. Chemical Constituents of Malaysian *Geniotrigona thoracica* Propolis. **PERTANIKAJOURNAL OF TROPICAL AGRICULTURAL SCIENCE**, v. 41, n. 3, p. 955–962, ago. 2018.

NEGRI, G. et al. A highly complex stingless bee propolis: Composition and influence of the period of collection. **JSFA reports**, v. 2, n. 2, p. 64–80, 2022.

NJOKU, C. N. et al. Application of Central Composite Design with Design Expert v13 in Process Optimization. Em: **Response Surface Methodology - Research Advances and Applications**. IntechOpen, 2023.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776–1782, 1 out. 2014.

PEREIRA, G. A.; ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples. **REBRAPA - Brazilian Journal of Food Research**, v. 9, n. 1, p. 125–140, 2018.

PIMENTEL, A. D. A. et al. Polliniferous flora foraged by *Melipona* bees along the Rio Negro in the Brazilian Amazon. **Grana**, v. 60, n. 5, p. 385–397, 3 set. 2021.

PUCHOLOBEK, G. et al. Determination of the Ca, Mn, Mg and Fe in honey from multiple species of stingless bee produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130652, jan. 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, 1 dez. 2019.

POPOVA, M. et al. A Preliminary Study of Chemical Profiles of Honey, Cerumen, and Propolis of the African Stingless Bee *Meliponula ferruginea*. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 997, 2021.

POPOVA, M. et al. Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Propolis from *Tetragonula*, *Lepidotrigona*, *Lisotrigona* and *Homotrigona* Stingless Bee Species in Vietnam. **Molecules**, v. 27, n. 22. 2022.

RAMÓN-SIERRA, J. et al. Partial characterization of ethanolic extract of *Melipona beecheii* propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 319–324. 2019.

RIBEIRO, M. **Atividade Antimicrobiana do Extrato de Própolis Vermelha e Verde Frente ao Microrganismo *Staphylococcus aureus***. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química). Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA. 2011. 56 p. Disponível em: <https://cepein.femanet.com.br/BDigital/arqTccs/0811290670.pdf>. Acesso em: 02 de ago. de 2023.

RUBINHO, M. P. et al. A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis and their antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. **Natural Product Research**, v. 34, n. 21, p. 3139–3144, 1 nov. 2020.

RUFINO, M. do S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. 2006.

RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>**. 2007.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (*Meliponini*). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50–57, 1 jan. 2017.

SANTOS, F. E. D. **Extração de Óleo de Soja Utilizando Etanol Hidratado como Solvente: Equilíbrio do Sistema e Cinética do Processo em Coluna**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis). 2018. 112f. Universidade Federal da Fronteira Sul. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/bitstream/prefix/2997/1/SANTOS.pdf>. Acesso em: 22 de nov. de 2022.

SILVA, A. C. et al. Atividade antimicrobiana e toxicidade dos méis das abelhas sem ferrão *Melipona rufiventris* e *Melipona fasciculata*: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e897986325–e897986325. 2020.

SILVA, P. R. et al. PALYNOLOGICAL ORIGIN, PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GEOPROPOLIS COLLECTED BY MANDAÇAIA (*MELIPONA MANDACAIA*) STINGLESS. **Revista Caatinga**, v. 33, p. 246–252. 2020.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1 jan. 1965.

SIQUEIRA, J. S. et al. Determination of inorganic elements in geopropolis samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Apicultural Research**, v. 61, n. 3, p. 400–407, 27 maio 2022.

SOUSA, J. P. L. M. et al. Chemical and Antimicrobial Potential Study of Brazilian Propolis Produced by Different Species of Bees. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480–1497,

2019.

SOUSA-FONTOURA, D. M. N. DE et al. Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 3, p. 367–373, 1 jun. 2020.

SOUZA, E. et al. CHEMICAL COMPOSITIONS AND ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF PROPOLIS PRODUCED BY *Frieseomelitta longipes* AND *Apis mellifera* BEES. **Química Nova**, 2018.

SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 528–533, dez. 2015.

SOUZA, J. L. et al. Analysing chemical composition and antimicrobial activity of geopropolis from *Melipona scutellaris*: HPLC-DAD and in vitro/in silico investigations. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2024.

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

SOUZA, S. et al. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. e801383, 14 jul. 2013.

TORRES, A. R. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 51, n. 6, p. e7118–e7118, 2018.

VALCANAI, C. P. et al. Antimicrobial Activity of Volatile Oils from Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* Propolis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 8, p. e202200369, ago. 2022.

WEN, C. et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 538–549, nov. 2018.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1 jan. 1998.

ZHANG, W. et al. Optimized extraction based on the terpenoids of *Heterotrigona itama* propolis and their antioxidative and anti-inflammatory activities. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. e13296, 2020.

ZAWAWI, N. et al. Unique physicochemical properties and rare reducing sugar trehalulose mandate new international regulation for stingless bee honey. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131566, mar. 2022.

ZUNINI, M. P. et al. PHENOLIC CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN CENTRAL-SOUTHERN URUGUAYAN PROPOLIS EXTRACTS. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 55, n. 1, p. 141–146, 2010.