

# POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO: COMPOSIÇÃO BIOATIVA, ATIVIDADES DE OXIDAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMIMICROBIANA

FUJIMOTO, G.

Fatec Capão Bonito - Coordenadoria de Tecnologia em Agroindústria  
graciela.fujimoto@fatec.sp.gov.br

*Potential biological activity of stingless bee propolis: bioactive composition, oxidation activity and antimicrobial activity*

Eixo Tecnológico: Produção Alimentícia

## Resumo

A meliponicultura é o manejo sustentável de abelhas nativas sem ferrão (ASF), atividade fundamental para a polinização e preservação de ecossistemas naturais e agrícolas. A exploração dos produtos desta atividade se tornou uma oportunidade de geração de renda para o pequeno produtor rural, sendo a própolis um dos produtos com maior potencial de agregação de valor. Esta é uma substância resinosa, coletada pelas abelhas de materiais vegetais e pode apresentar diversos compostos bioativos. Ainda são escassos os estudos que avaliem a composição, potencial de atividade biológica de ASF, sendo estes fundamentais para a exploração comercial destes produtos. O objetivo do presente trabalho foi identificar as principais diferenças de composição, concentração de compostos bioativos e atividade antimicrobiana de amostras de própolis de quatro espécies de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*, *Scaptotrigona xantotricha*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona bipunctata*). No total foram avaliadas 7 amostras de própolis neste estudo, sendo: *S. xantotricha* (1); *S. postica* (2), *T. angustula*(2) *S. bipunctata*(2). As amostras foram avaliadas quanto aos aspectos de composição (umidade, cinzas, cera, massa mecânica e substâncias solúveis em etanol -SSE), concentração de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides) e potencial de atividade antimicrobiana contra os patógenos *Bacillus cereus* NCTC 1143 e *Listeria innocua* ATCC 3090. Todas as amostras apresentaram baixo índice de oxidação (<3,3 segundos), indicando a presença de compostos antioxidantes. Além disso, as amostras de própolis de *S. bipunctata* se destacaram pelas maiores concentrações de SSE, fenólicos e flavonoides, além de apresentar atividade inibitória contra *L. innocua*. Os resultados apresentados neste estudo são promissores para a agregação de valor da própolis de abelhas sem ferrão, em virtude do baixo índice de oxidação de todas as amostras estudadas e potencial antimicrobiano da própolis de *S. bipunctata*.

**Palavras-chave:** *Meliponicultura Scaptotrigona spp, Tetragonisca sp, Antimicrobiano, Antioxidante.*

## Abstract

Meliponiculture is the sustainable management of native stingless bees (ASF), a fundamental activity for the pollination and preservation of natural and agricultural ecosystems. Exploiting the products of this activity has become an opportunity to generate income for small rural producers, with propolis being one of the products with the greatest potential for adding value. Propolis is a resinous substance collected by bees from plant materials and can contain various bioactive compounds. There are still few studies evaluating the composition and potential biological activity of ASF, which is essential for the commercial exploitation of these products. The aim of this study was to identify the main differences in composition, concentration of bioactive compounds and antimicrobial activity of propolis samples from four species of stingless bees (*Scaptotrigona postica*, *Scaptotrigona xantotricha*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona bipunctata*). A total of 7 propolis samples were evaluated in this study: *S. xantotricha* (1), *S. postica* (2), *T. angustula* (2) and *S. bipunctata* (2). The samples were evaluated in terms of composition (moisture, ash, wax, mechanical mass and ethanol-soluble substances - ESS), concentration of bioactive compounds (phenolics and flavonoids) and potential antimicrobial activity against the pathogens *Bacillus cereus* NCTC 1143 and *Listeria innocua* ATCC 3090. All the samples showed a low oxidation rate (<3.3 seconds), indicating the presence of antioxidant compounds. In addition, the *S. bipunctata* propolis samples stood out for their higher concentrations of SSE, phenolics and flavonoids, as well as their inhibitory activity against *L. innocua*. The results presented in this study are promising for adding value to stingless bee propolis, due to the low oxidation rate of all the samples studied and the antimicrobial potential of *S. bipunctata* propolis.

**Keywords:** *Meliponiculture, Scaptotrigona spp, Tetragonisca sp, Antimicrobial, Antioxidante*

## 1. Introdução

A meliponicultura é definida como o manejo sustentável de abelhas nativas sem ferrão. Esta atividade tem aumentado nos últimos anos dada as perspectivas de crescimento econômico, social e de preservação ambiental [1]. A exploração de produtos da meliponicultura tem se tornado uma atividade promissora do setor, sendo a própolis um dos produtos com maior potencial de agregação de valor. A própolis é originária de material vegetal coletado pelas abelhas que acrescentam secreções salivares formando um material resinoso depositado nas frestas das colmeias [2,3]. Este composto pode apresentar mais de 300 substâncias, incluindo os compostos fenólicos que se destacam como principais compostos bioativos [3,4]

A exploração comercial de própolis ainda é direcionada para a apicultura (manejo de *Apis mellifera*). Em 2019 o Brasil ocupou a 9ª posição em exportação de própolis com o equivalente a US\$ 7,7 milhões [5]. Estima-se que o mercado mundial de própolis passe por um crescimento de 5,82% entre 2020 e 2027, podendo atingir US\$ 829,23 milhões até 2027 [6].

Apesar da valorização da própolis de *Apis mellifera* no mercado internacional, a produzida por espécies nativas ainda é pouco explorada comercialmente. Fator relacionado a diversidade de espécies nativas; falta de padronização dos métodos de manejo de espécies nativas direcionados a produção de própolis, falta de regulamentação específica para os produtos da meliponicultura.

No Brasil, estima-se que existem cerca de 250 espécies de abelhas sem ferrão destas, 95 com manejo na meliponicultura [7,8]. As espécies *Scaptotrigona postica* (Mandaguari preta), *Scaptotrigona xantotricha* (Mandaguari amarela), *Tetragonisca angustula* (Jataí), *Scaptotrigona bipunctata* (tubuna); possuem iniciativas de manejo em diversos estados do Brasil, e possuem potencial zootécnico para a produção de própolis.

O potencial de atividade biológica da própolis está diretamente relacionado à sua composição fenólica, variável conforme a origem botânica, fatores sazonais, espécie de abelha, ações enzimáticas presente na saliva e características de manejo [4,9]. Já se sabe que as própolis de diversas espécies de abelhas nativas apresentam composição diferenciada (terpenos, diterpenos, triterpenos, além de ácidos fenólicos e flavonoides), podendo estar associadas a efeitos citotóxicos, antioxidantes, antimicrobianos, antitumorais, entre outros [9].

Sabe-se que diferentes categorias de compostos fenólicos presentes em extratos de própolis podem apresentar mecanismos de ação antimicrobiana diversificados [10]. Algumas categorias de compostos fenólicos podem atuar na inibição da síntese de DNA e RNA, na alteração da permeabilidade da membrana plasmática ou na ruptura de processos enzimáticos relacionados ao crescimento celular de bactérias [11,12].

A própolis é um dos produtos de maior valor agregado da apicultura, no entanto, pouco se conhece sobre a própolis oriunda da meliponicultura, dada a diversidade de espécies no Brasil, o que leva a dificuldade de exploração e regulamentação deste produto. O objetivo do presente trabalho foi identificar as principais diferenças de composição, concentração de compostos bioativos e atividade antimicrobiana de amostras de própolis de quatro espécies de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*, *Scaptotrigona xantotricha*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona bipunctata*).

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Materiais

Para a realização dos ensaios foram coletadas cerca de 75g de própolis de 3 pontos de diferentes caixas do mesmo meliponário. Os instrumentos utilizados para retirada da própolis foram facas higienizadas com etanol 70%, após a coleta, as amostras foram identificadas e embaladas em poliestireno e envolvidas por papel alumínio, sendo então acondicionadas em freezer -20°C até a realização dos ensaios. No total foram avaliadas 7 amostras de própolis neste estudo: 3 foram coletadas de um meliponário vinculado à Cooperativa de Apicultores de Sorocaba e Região (COAPIS), sendo elas: 1 amostra de própolis de Mandaguari amarela (*S. xantotricha*) e 2 amostras de própolis de *S. postica*. As outras 4 amostras, foram adquiridas de meliponicultores de Capão Bonito, sendo 2 amostras de própolis de jataí (*T. angustula*) e 2 amostras de própolis de tubuna (*S. bipunctata*) [13].

### 2.2. Metodologia

A caracterização das amostras de própolis ocorreu de determinação de compostos bioativos indicados nas Instrução Normativa nº 03/2001 para a caracterização da própolis bruta [14]. Para os extratos de própolis, foram determinadas a concentração de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides), substâncias solúveis em etanol, índice de oxidação e potencial de atividade antimicrobiana.

#### 2.2.1. Ensaios de composição bioativa e potencial de atividade biológica

##### Elaboração dos extratos etanólicos de própolis (EEP)

Para preparo do EEP diluiu-se 1g de própolis em 12,5 ml de etanol 70%, esses extratos foram aquecidos a 70°C durante 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Foi realizada triplicata dos extratos de cada amostra, ou seja, ao total foram preparados 21 extratos etanólicos de própolis. Por fim, as amostras foram refrigeradas por 24 horas e centrifugados as amostras a 3600 rpm/ 10 minutos [16].

##### Substâncias solúveis em etanol

Em um pesa-filtro previamente seco, adicionou-se 3 g de extrato etanólico que foi submetido a secagem em estufa à temperatura de 105 °C até a estabilização da pesagem [15].

##### Compostos fenólicos totais

Nos tubos de ensaio acrescentou-se 50 µl dos extratos de própolis e adicionou-se 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 4 mL da solução de carbonato de sódio (7,5%) após esse procedimento, as amostras foram homogeneizadas e deixadas no escuro por 2 horas, após esse período realizou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro à 700 nm. Também foi preparado o Branco, onde realizamos o mesmo procedimento substituindo o extrato de própolis por água destilada. A curva padrão foi preparada com ácido gálico (Vetec) nas seguintes concentrações: de 100 a 2500 mg.L-1 [16].

*Anais da VII Mostra de Docentes em RJI*

### Flavonoides totais

Diluiu-se 0,5 mL de extrato de própolis em 4,5 mL de metanol P.A, homogeneizou as amostras e pipetou-se 0,5 mL de cada solução padrão em um tubo de ensaio, adicionou-se 1,5 mL de etanol (99,5%), 0,1 mL de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de acetato de potássio (1 M) e 2,8 mL de água destilada e realizou-se mais uma homogeneização. Após 30 minutos no escuro, efetuou-se leitura da absorbância no espectrofotômetro a 434 nm. Também foi preparado o Branco, onde realizamos o mesmo procedimento substituindo o extrato de própolis por água destilada. A curva padrão foi preparada com quercetina (Sigma Aldrich) nas seguintes concentrações: de 10 a 250 mg.L<sup>-1</sup> [16]).

### Índice de oxidação (indicativo do potencial antioxidante)

Dilui-se 0,5 mL de cada extrato em 4,5 mL de água destilada, eles foram homogeneizados. Posteriormente, acrescentou-se em outro tubo de ensaio que estava no gelo: 0,5 mL do extrato diluído, 0,5 mL de água destilada, 1 mL de ácido sulfúrico (20%). Ao acrescentar 50 µL de KMnO<sub>4</sub> (0,1 M), cronometrou-se o tempo de desaparecimento da cor vermelha [15]

### Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada contra *Bacillus cereus* NCTC 1143 e *Listeria innocua* ATCC 3090 utilizando-se o método de disco-difusão, conforme descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards [18], com o objetivo de se verificar as espécies de bactérias patogênicas sensíveis à cada extrato etanólico de própolis. Os ensaios ocorreram com duplicata dos discos impregnados com os extratos.

Em discos de papel filtro (Whatman nº 3) estéreis, foram impregnados com 20 µL de extrato de própolis, sendo 1 disco pipetado com a mesma quantidade de etanol 70% para ser utilizado como controle negativo da análise. Os discos foram colocados em placas de petri estéreis e levados ao dessecador por cerca de 24h para a evaporação completa do solvente.

As bactérias patogênicas foram recuperadas em ágar de contagem padrão (PCA-Kasvi), incubadas a 35°C por 18 a 24h, após, foi realizado ajuste da densidade óptica na Escala 0,5 de Mc Farland e placas contendo ágar PCA foram inoculadas com os micro-organismos utilizando suabe. Após a inoculação, foram acrescentados na placa os discos impregnados com cada EEP, utilizando-se o etanol como controle negativo. As placas foram incubadas à 35°C por 20h a 24 h. Após esse período, avaliou-se a formação de halos de inibição [17].

### Análise estatística dos resultados

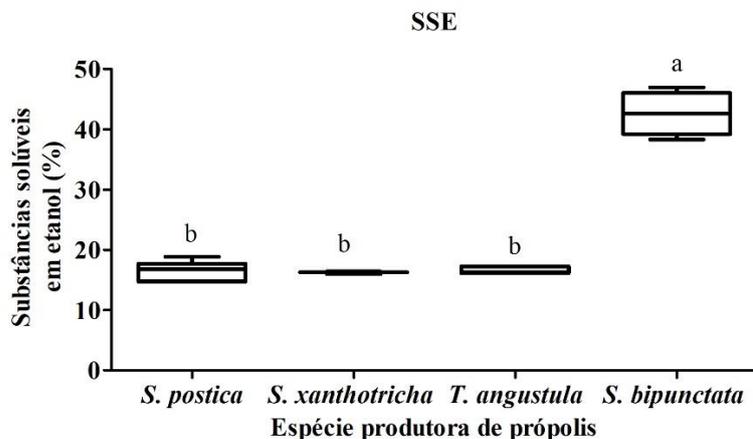
Os resultados das análises utilizando EEP foram analisados no software Graphpad Prism V. 5.0, utilizando-se a Análise de Variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey a um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados e Discussão**

A Fig. 1 indica a variação das substâncias solúveis em etanol (SSE) das amostras das própolis das espécies de abelhas sem ferrão avaliadas neste estudo, indicando os maiores teores para as amostras produzidas pela espécie *S. bipunctata* (38 a 46%). As própolis das demais espécies avaliadas não apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) com SSE < 20%.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

**Fig. 1.** Variação na concentração de substâncias solúveis em etanol de extratos de própolis de ASF.<sup>1</sup>

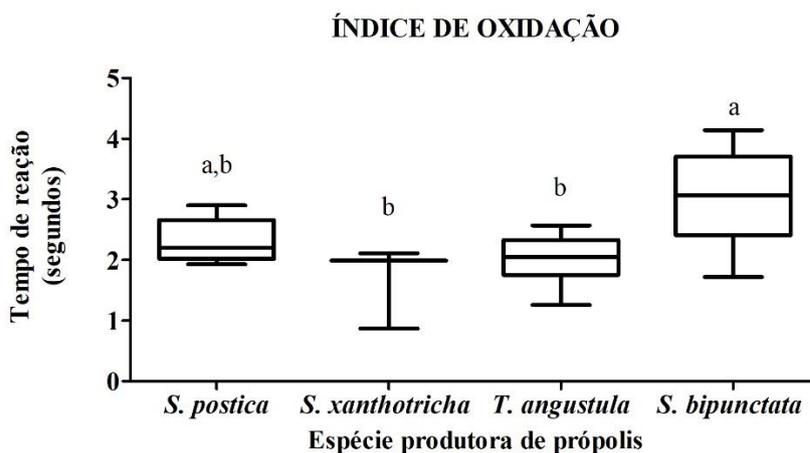


<sup>1</sup>Análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey: letras diferentes indicam que as amostras desta espécie apresentaram diferença significativa a  $p < 0,05$

**Fonte:** Elaboração própria

O índice de oxidação (Fig. 2.) avalia a presença de compostos antioxidantes das amostras, sendo tempos de reação inferiores a 22 segundos, indicativos da presença destes compostos. Todas as amostras de própolis avaliadas neste estudo apresentaram tempo de reação inferior a 4 segundos.

**Fig. 2.** Variação no índice de oxidação das amostras de própolis de ASF.<sup>1</sup>



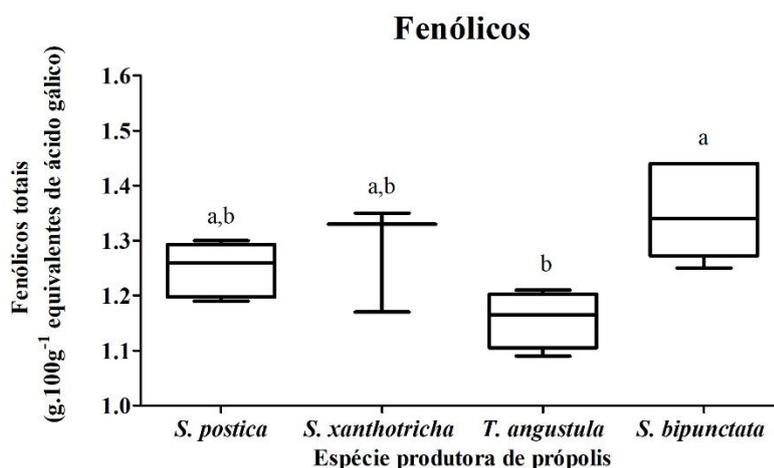
<sup>1</sup>Análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey: letras diferentes indicam que as amostras desta espécie apresentaram diferença significativa a  $p < 0,05$

**Fonte:** Elaboração própria

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

Os compostos fenólicos e flavonoides constituem os principais compostos bioativos da própolis em geral, os resultados apresentados na Fig. 3 indicam teores de fenólicos significativamente menores para a própolis de *T. angustula*, quando comparada a *S. bipunctata*.

**Fig. 3.** Variação nas concentrações de fenólicos totais nas própolis das diferentes espécies de ASF.<sup>1</sup>

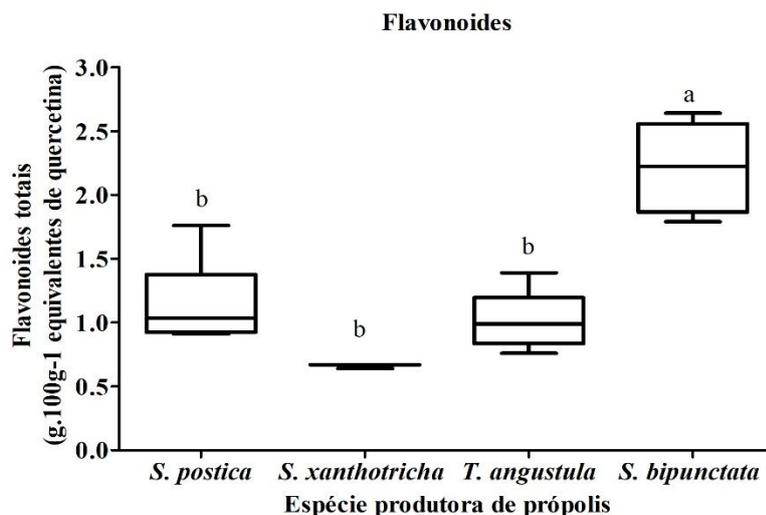


<sup>1</sup>Análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey: letras diferentes indicam que as amostras desta espécie apresentaram diferença significativa a  $p < 0,05$

**Fonte:** Elaboração própria

Os teores de flavonoides apresentados para as amostras de *S. bipunctata* foram significativamente superiores às própolis das demais espécies de abelhas sem ferrão, classificados entre médio e alto teor de flavonoides.

**Fig. 4.** Variação nos teores de flavonoides totais das amostras de própolis de ASF.<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste de Tukey: letras diferentes indicam que as amostras desta espécie apresentaram diferença significativa a  $p < 0,05$

**Fonte:** Elaboração própria

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

A tab. 1 indica atividade inibitória das amostras de própolis de *S. bipunctata* contra *Listeria innocua*, e uma amostra também apresentou halos de inibição contra *Bacillus cereus*.

**Tab. 1.** Halos de inibição bacteriana promovidos pelos EEP das ASF.

Extrato etanólico de própolis	Halo de inibição contra <i>Listeria innocua</i> (mm)	Halo de inibição contra <i>Bacillus cereus</i> (mm) Média e desvio padrão
<i>S. postica</i> (P44)	0	0
<i>S. postica</i> (P45)	0	0
<i>S. xanthotricha</i> (P46)	0	0
<i>T. angustula</i> (P54)	0	0
<i>T. angustula</i> (P55)	0	0
<i>S. bipunctata</i> (P56)*	4,67±1,15	2±0
<i>S. bipunctata</i> (P57)*	6,67±1,15	0

\* Médias e desvio padrão dos halos de inibição. Halos de inibição igual a “0”, indicam que o micro-organismo não foi inibido pelos extratos avaliados.

**Fonte:** Elaboração própria

#### 4. Considerações finais

Os resultados apresentados neste estudo indicam que a própolis de *S. bipunctata* demonstrou potencial de atividade biológica superior às demais amostras de própolis de ASF avaliadas neste estudo, com maiores teores de Substâncias solúveis em etanol e dos compostos bioativos flavonoides, e atividade antimicrobiana contra *Listeria innocua* e *Bacillus cereus*.

#### Agradecimentos

À Cooperativa de Apicultores de Sorocaba e Região (COAPIS) pela doação de reagentes e pagamento da bolsa de estágio da aluna Letícia Ribeiro Leite.

#### Referências

- [1] SALATINO, A., PEREIRA, L. R., SALATINO, M.L.F., 2019. The emerging market of propolis of stingless bees in tropical countries. **MOJ Food Process Technol.** 7(2):27–29.
- [2] BRASIL, 2017. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. DOU: Diário Oficial da União de 29/03/2017.
- [3] CARDINAULT, N., CAYEUX, M.O., PERCIE DU SERT, P., 2012. La propolis : origine, composition et propolis. **Phytotherapie** 10, 298–304. doi:10.1007/s10298-012-0733-y POPOVA et al, 2021

*Anais da VII Mostra de Docentes em RJI*

- [4] CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L. ; RASTRELLI; L. Tropical Propolis: Recent Advances in Chemical Components and Botanical Origin. In: RASTRELLI; L. "Propolis tropical". **Science Publishers: Taylor & Francis Group**, LLC. p. 209 – 240, 2012
- [5] TRIDGE: Global Sourcing Hub of Food & Agriculture 2022. Overview of Global Propolis Market. Access in: 03/28/2022. < <https://www.tridge.com/intelligences/propolis>>
- [6] DATA BRIDGE: Market Research, 2022. Global Propolis Market – Industry Trends and Forecast to 2029 < <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-propolis-market>>
- [7] ABELHA: Associação Brasileira de estudos das abelhas, 2022. Meliponiculture in Brazil. Access in: 03/28/2022. < <https://abelha.org.br/en/meliponiculture-in-brazil/>>
- [8] BRASIL, 2021. **Portaria nº 665, de 3 de novembro de 2021**. Institui o Catálogo Nacional de Abelhas-Nativas-Sem-Ferrão. DOU: Diário Oficial da União de 09/11/2021.
- [9] COTTICA, S. M. et al. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, no 5, p.929-935, 2011.
- [10] HILLIARD, J. J. et al. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavones gyrase inhibitors to DNA gyrase. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 39, p.59-69, 1995.
- [11] MIRZOEVA, O. K. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, n.152, p.239-246,1997.
- [12] TSUCHIYA, H; IINUMA, M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavone G isolated from *Sophora exigua*. **Phytomedicine**, nº7, p.161-165, 2000.
- [13] DAUGSH, A. et al, 2008. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v.5, n. 4, p.435-441,
- [14] BRASIL. **Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de PrópolisDiário Oficial da União. Brasília-DF, 23 de janeiro de 2001.
- [15] MELLO, B. C. B.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, n.47, p.2510-2518, 2012.
- [16] WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, n.2, p. 99-105, 1998.
- [17] NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards), in: **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**; Approved Standard, M07-A7, 7 ed., Wayne, PA, p. 49, 2006.