

Bruno Luís Ferreira

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS  
PRODUZIDA POR ABELHAS SEM FERRÃO NO ESTADO DE  
SANTA CATARINA.**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
título de Mestre em Ciência dos  
Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Roseane Fett

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Ferreira, Bruno Luís  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA  
POR ABELHAS SEM FERRÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA.  
/ Bruno Luís Ferreira ; orientadora, Roseane Fett ,  
2018.  
126 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Geoprópolis. 3.  
Abelhas sem ferrão. 4. Compostos bioativos. I. ,  
Roseane Fett. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. III. Título.

**Bruno Luís Ferreira**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS  
PRODUZIDA POR ABELHAS SEM FERRÃO NO ESTADO DE  
SANTA CATARINA.**

**Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título  
de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma  
final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos**

**Florianópolis, 22 de fevereiro de 2018.**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina de Oliveira Costa**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roseane Fett**  
**Orientadora (UFSC)**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edna Regina Amante**  
**Membro (UFSC)**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Itaciara Larroza Nunes**  
**Membro (UFSC)**

---

**Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Luciano Vitali**  
**Membro (UFSC)**



Este trabalho é dedicado aos meus **pais**.

E ao querido e jamais esquecido  
Professor **Ewerson Evaldo Henke** (*in  
memorian*)



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais **Selma e Nilton** que nunca mediram esforços para me apoiar em meus estudos. Agradecer também a **família** que por muitas vezes fui ausente no decorrer da minha trajetória acadêmica.

Agradecer a todos os professores que passaram por minha vida e que dedicaram seu conhecimento para me tornar uma pessoa melhor, em especial ao professor **Dr. Eduardo S. Chaves** que acreditou em mim durante a graduação, a professora **Dr<sup>a</sup>. Roseane Fett** que me apoiou na orientação de mestrado e meus sentimentos ao especial professor **Ewerson Evaldo Henke** (*in memorian*) que tornava as tão difíceis aulas de bioquímica inspiradoras pela sua paixão por ensinar, um exemplo de profissional que almejo em seguir.

Aos amigos do **LabQA, Greici, Patrícia, Siluana, Franciele, Mayara, Bibiana, Fabíola, Fabiana, Priscila** e em especial ao **Luciano Gonzaga** que ajudou em toda a elaboração e desenvolvimento do trabalho, ao professor **Dr. Luciano Vitalli** pelo apoio e ajuda nas análises dos fenólicos, a professora **Dr<sup>a</sup>. Deise Baggio** pelos ensinamentos e ajuda em microbiologia, a **UFABC** em parceria com a professora **Dr<sup>a</sup>. Heloisa Maltez** e suas orientadas, e aos meliponicultores do estado de Santa Catarina, sempre solícitos na doação das amostras. Aos amigos que a vida me apresentou aqui em Florianópolis, **Wagner, Matheus, Lucas, Carlos, João, Waldiomar, Neto, Rodrigo, Luciano, Rose, Renata, Marcia, Gaby** e tantos outros que estão ao meu redor e que possa ter me esquecido.

Enfim, obrigado!





“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende. ”  
(Autor desconhecido)



## RESUMO

A meliponicultura é a atividade de criação racional de abelhas sem ferrão (“*stingless bees*” do inglês) para a obtenção de produtos como o mel, cera, própolis e geoprópolis. A geoprópolis utilizada pelas abelhas como matéria prima para a construção de estruturas internas e externas da colônia é composta de extratos vegetais, enzimas digestivas e majoritariamente por solo, o que lhe atribui concentrações elevadas de compostos minerais. Sua composição é influenciada pela espécie de abelha produtora, clima, flora local e características do solo da região. Estudos tem destacado a presença de alguns compostos fenólicos em sua composição, no entanto poucos relacionam sua composição à capacidade antioxidante e redutora. Considerando estudar e elucidar os componentes químicos da geoprópolis, assim como a capacidade antioxidante e redutora de extratos, incluindo compostos não relatados até o momento na literatura, buscando compreender essa complexa matéria prima o estudo avaliou inicialmente as concentrações de umidade e cinzas totais, assim como a solubilidade e estabilidade das amostras em álcool etílico e metílico ao longo do tempo, avaliando compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Em um segundo momento identificar o perfil majoritário de compostos fenólicos, e avaliar o perfil majoritário de minerais e potencial antimicrobiano em geoprópolis das abelhas *Melipona mondury*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona seminigra* e *Tetragonisca angustula*. As extrações foram realizadas durante 10, 20 e 30 dias, sendo observado o melhor rendimento de extração em metanol, com aproximadamente 35 % m/m, a concentração de umidade das amostras variou entre  $2,60 \pm 0,02$  a  $8,80 \pm 0,19$  % m/m, resultados semelhantes aos já descritos em literatura. O conteúdo de cinzas das geoprópolis analisadas apresentou valores superiores a  $51,97 \pm 0,56$  % m/m, com exceção da amostra produzida pela abelha TAI com  $2,23 \pm 0,01$  % m/m. O tempo de extração contribuiu para um aumento das concentrações de fenólicos totais e atividade antioxidante para a maioria das amostras, assim como a efetividade do metanol como solvente extrator. Foram identificados 28 compostos fenólicos distintos nas amostras quando analisadas por LC-ESI-MS/MS, sendo: 13 ácidos fenólicos, 10 flavonoides, quatro aldeídos fenólicos e uma cumarina, dentre esses compostos, 18 deles não constam relatados em literatura até o presente estudo. O perfil mineral analisado por ICP-MS permitiu identificar e quantificar 16 elementos distintos, entre eles alguns minerais essenciais assim como Cu, Fe, K, Mg, Na, e Zn e metais potencialmente tóxicos como As, Cd, Pb e Cr. Os

dados da composição mineral quando avaliados por quimiometria indicam a separação de grupos por características geográficas semelhantes. O potencial antimicrobiano das amostras se revelou distinto onde somente a geoprópolis de *M. quadrifasciata* dentre as amostras avaliadas que apresentou potencial antimicrobiano para *Staphylococcus aureus*. Considerando os resultados, é possível concluir que as abelhas produzem a geoprópolis com características individuais, variando conforme flora, clima e local de coleta.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão. Geoprópolis. Compostos bioativos. Minerais. Potencial antimicrobiano.



## ABSTRACT

Stingless beekeeping is the rational creation of stingless bees to produce honey, wax, propolis and geopropolis. The activity was describe in literature being used in a primitive way by Brazilian indigenous. Among the different products produced by stingless bees, geopropolis is made with a mix of vegetal extracts, digestive enzymes and mostly by soil, which gives high concentration of minerals, being rigid fragments, used as raw material to construct internal and external colony structures. Used in folk medicine as antiseptic, antioxidant and antimicrobial agent. The composition is diversified, depending on bee specie, climate changes, local flora and soil type. It is comproved the presence of phenolic compounds in their composition, however, few studies related chemical composition to antioxidant capacity. Considering study the geopropolis chemical components, antioxidant and reducing activity, produced in Santa Catarina State, this study seeks to understand the complexity of geopropolis and your composition, with humidity and total ash rates and also the stability and solubility of geopropolis extracts along time of storage evaluated through total phenolic composition and antioxidant activity, as much as, identification of polyphenolic compounds and minerals and evaluation of antimicrobial potential. Geopropolis samples of *Melipona mondury*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona seminigra* e *Tetragonisca Angustula* bee specie were extracted in methanol and ethanol during 10, 20 and 30 days, and reached superior yields of extraction in methanol, about 35 % and the moist showed a variation between  $2.60 \pm 0.02$  to  $8.80 \pm 0.19$  %, near to literature results. To the ashes evaluation, only the sample of *Tetragonisca Angustula* presented low concentration of 2.23 %, all other samples remained with more than 51 % of total ashes characteristic fact due to sample matriz. According to the extraction time, phenolic compounds and antioxidant activity for the most samples increase, as well using methanol as extractor solvent when compared to other with different polarity. MSI sample has the highest phenolic compounds. The biggest antioxidant activity was achieve on 20 days of extraction of MQS sample. In this regard, 28 phenolic compounds were identified by LC-ESI-MS/MS in geopropolis samples, being: 13 phenolic acids, 10 flavonols, 4 phenolic aldehyde and 1 coumarin, among these, 18 were not mentioned in literature until this study. The mineral composition analyzed by ICP-MS was able to identified and quantified 16 compounds, among them essential minerals as Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, and Zn also potentially toxic metals as arsenic, cadmium, lead and

chromium, the mineral composition data were evaluated using chemometric approach and it was possible to observe the formation of groups with similar geographical characteristics. The antimicrobial potential evaluation reveal that different bees produces geopropolis with individual characteristics, being *M. Quadrifasciata* geopropolis samples to present antimicrobial potential to *Staphylococcus aureus*. To conclude, stingless bees produces geopropolis with individual characteristics, varying according to flora, climate and geographical localization.

**Keywords:** Stingless bees. Geopropolis. Bioactive compounds. Minerals. Antimicrobial potential.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Geoprópolis de <i>Melipona quadrifasciata</i> (fragmento).....	38
Figura 2 - Estudos publicados com geoprópolis (1998-2017) .....	41
Figura 3 - Cidades de coleta das amostras, SC, Brasil .....	55
Figura 4 - Esquema para obtenção do extrato de geoprópolis.....	57
Figura 5 - Rendimento de extrato para as amostras de geoprópolis em comparação a solventes de polaridades distintas em diferentes tempos de extração.....	59
Figura 6 - Comparação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de geoprópolis de abelha sem ferrão diante dos solventes metanol e etanol nos diferentes tempos de extração. ....	67
Figura 7 - Cromatograma dos compostos identificados por LC-ESI- MS/MS.....	82
Figura 8 - Representação da presença de compostos fenólicos conjugados.....	86
Figura 9 - Número de compostos fenólicos identificados em amostras de geoprópolis em diferentes preparos de amostra .....	88
Figura 10 - Análise de componentes principais aplicada a composição mineral em amostras de geoprópolis. ....	98
Figura 11 - Análise de agrupamento hierárquico aplicado a composição mineral em amostras de geoprópolis. ....	99
Figura 12 - Placas com o extrato de geoprópolis contendo os halos de inibição para <i>S. aureus</i> em amostras de MQS e MQF.....	100



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas espécies de abelhas sem ferrão.....	31
Tabela 2 - Distribuição geográfica por regiões das espécies de abelha sem ferrão.....	33
Tabela 3 - Alguns estudos realizados com própolis por diferentes autores.....	36
Tabela 4 - Alguns estudos realizados com geoprópolis por diferentes autores .....	39
Tabela 5 - Principais solventes extratores já aplicados em amostras de própolis .....	45
Tabela 6 - Relação das amostras de geoprópolis, espécies de abelhas e locais de coleta .....	56
Tabela 7 - Rendimento dos extratos de amostras de geoprópolis ao longo do tempo de armazenamento em metanol ( $\text{mg g}^{-1}$ , média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ).....	60
Tabela 8 - Teores de umidade e cinzas em amostras de geoprópolis de diferentes espécies de abelha sem ferrão (% média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ).....	61
Tabela 9 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos de geoprópolis em diferentes tempos de extração (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ).....	63
Tabela 10 - Relação das amostras de geoprópolis, espécies de abelhas e locais de coleta .....	76
Tabela 11 - Condições experimentais para determinação de compostos minerais em ICP-MS.....	79
Tabela 12 – Compostos fenólicos identificados nas amostras de geoprópolis de abelhas sem ferrão.....	85
Tabela 13 - Conteúdo mineral das amostras de geoprópolis, $\text{mg kg}^{-1}$ (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$ ). .....	92



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
a.C	Antes de Cristo
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (cromatografia a gás)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (espectrômetro de massas)
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (detector de arranjo de diodos)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (ionização por eletrospray)
EAG	Equivalentes a ácido gálico
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Potential</i> (poder de redução do ferro)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Uv-Vis	Ultravioleta/visível
AMESG	Associação dos Meliponicultures das Encostas da Serra Geral
RPM	Rotações por minuto
m/v	Massa/volume
m/m	Massa/massa
M.	Melipona
DMSO	Dimetilsulfóxido
LOD	<i>Limit of Detection</i> (limite de detecção)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (limite de quantificação)
MMS	<i>M. mondury</i> - Santa Rosa de Lima
MMI	<i>M. mondury</i> - Iporã do Oeste
MQS	<i>M. quadrifasciata</i> - Santa Rosa de Lima
MQR	<i>M. quadrifasciata</i> - Rio do Sul
MQF	<i>M. quadrifasciata</i> - Florianópolis
MQI	<i>M. quadrifasciata</i> - Iporã do Oeste
MSS	<i>M. scutellaris</i> - Santa Rosa de Lima
MSI	<i>M. scutellaris</i> - Iporã do Oeste
MSeS	<i>M. semini gra</i> - Santa Rosa de Lima
TAI	<i>Tetragonisca angustula</i> - Iporã do Oeste
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	27
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
<b>1 ABELHAS</b> .....	28
<b>2 MELIPONICULTURA</b> .....	30
<b>3 PRODUTOS DAS ABELHAS SEM FERRÃO</b> .....	33
<b>4 PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS</b> .....	34
4.1 A PRÓPOLIS.....	34
4.2 A GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO.....	37
4.3 ESTUDOS RECENTES EM PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS.....	41
4.3.1 <i>Composição fenólica e atividade antioxidante</i> .....	42
4.3.2 <i>Extração de componentes bioativos</i> .....	44
4.3.3 <i>Minerais</i> .....	45
4.3.4 <i>Atividade antimicrobiana</i> .....	47
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	49
<b>AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE GEOPRÓPOLIS DE: <i>MELIPONA SEMINIGRA, MELIPONA MANDAÇAIA, MELIPONA SCUTELLARIS, MELIPONA MONDURY E TETRAGONISCA ANGUSTULA</i></b> .....	49
<b>RESUMO</b> .....	51
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	53
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
2.1 AMOSTRAGEM.....	54
2.2 METODOLOGIA.....	56
2.2.1 <i>Determinação do teor de umidade e teor de cinzas</i> .....	56
2.2.2 <i>Obtenção do extrato de geoprópolis e determinação de rendimento</i> .....	57
2.2.3 <i>Determinação de compostos fenólicos totais</i> .....	57

2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	58
2.2.5 Análise estatística.....	58
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
3.1 RENDIMENTO DO EXTRATO DE GEOPRÓPOLIS.....	59
3.2 TEOR DE UMIDADE E CINZAS.....	61
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	62
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>69</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E MINERAIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM GEOPRÓPOLIS DE <i>MELIPONA SEMINIGRA</i>, <i>MELIPONA MANDAÇAIA</i>, <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i>, <i>MELIPONA MONDURY</i> E <i>TETRAGONISCA ANGUSTULA</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>71</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
2.1 REAGENTE E EQUIPAMENTOS.....	74
2.2 AMOSTRAGEM.....	75
2.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL MAJORITÁRIO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	76
2.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL MAJORITÁRIO DE ELEMENTOS MINERAIS .....	78
2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	79
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E PARAMETROS DE MÉRITO.....	80
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
3.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	80
3.2 ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS MAJORITÁRIOS.....	91
3.2.1 Análise quimiométrica aplicada a composição mineral em amostras de geoprópolis.....	96
3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	100
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>103</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>

<b>APÊNDICE A – COMPOSTOS POLIFENÓLICOS IDENTIFICADOS EM GEOPRÓPOLIS .....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICE B – MRM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NA MATRIZ GEOPRÓPOLIS EM ANÁLISE POR LC-ESI MS/MS. ....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....</b>	<b>126</b>



## INTRODUÇÃO

Provenientes do continente europeu, as abelhas *Apis mellifera*s tiveram sua introdução no Brasil na região sudeste, passando por cruzamentos com espécies africanas dando origem a abelhas resistentes e com maior produtividade, denominadas abelhas africanizadas, presentes atualmente em grande extensão do território nacional, colocando o Brasil como produtor de destaque no mercado externo (MARTINEZ; SOARES, 2012; OLIVEIRA; CUNHA, 2005).

Abelhas sem ferrão ou do inglês “*Stingless bees*”, são abelhas sociais conhecidas pela ausência do ferrão, compostas principalmente por três tribos: *meliponini*, *trigonnini* e *lastrimelittini* (BILUCA, 2014). Nativas do território brasileiro, e por muito tempo, manejadas de maneira rudimentar por povos indígenas, a criação e manejo das colônias é denominada meliponicultura a qual vem sendo introduzida como atividade econômica em diversas regiões do Brasil (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Mundialmente as abelhas sem ferrão totalizam mais de 500 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, no Brasil já foram catalogadas mais de 200 espécies (CAMPOS et al., 2014; CHUTTONG et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013; RAMÓN-SIERRA; RUIZ-RUIZ; DE LA LUZ ORTIZ-VÁZQUEZ, 2015; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). Popularmente esses insetos são conhecidos por sua capacidade polinizadora, produção de mel, geoprópolis, cera e pólen, caracterizando a meliponicultura (OLIVEIRA et al., 2013).

Os produtos fabricados pelas abelhas são conhecidos principalmente por sua doçura e pelas propriedades medicinais (ação bactericida, atividade antioxidante, propriedade antiviral, entre outros) (RAO et al., 2016), sendo consumidos “*in natura*” e aplicados na indústria de alimentos (GUTIÉRREZ-CORTÉS; SUAREZ MAHECHA, 2014; SPINELLI et al., 2015), de cosméticos (LUSTOSA et al., 2008), bebidas (GOMES et al., 2013), gerando um crescente interesse comercial.

Diferentemente da própolis produzido a partir de saliva, secreções enzimáticas e resinas vegetais de plantas (ARAÚJO, 2013), as abelhas sem ferrão produzem a geoprópolis utilizando solo como matéria prima principal, resultando em um fragmento de coloração marrom escuro denominado geoprópolis, ligeiramente mais rígido que a própolis (CUNHA et al., 2009; FREITAS; VIT; BARTH, 2013), aplicado na

colmeia como matéria prima para construção de estruturas internas e externas (VILLAS-BÔAS, 2012).

Não existem dados estatísticos sobre a produção da geoprópolis, tampouco legislação para a comercialização desse produto, e devido à grande deficiência de informações científicas sobre o assunto o estudo proposto, objetivou avaliar a composição majoritária de compostos fenólicos e elementos minerais de amostras de geoprópolis assim como a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos orgânicos em amostras produzidas por diferentes espécies de abelha sem ferrão, alocados em regiões distintas do Estado de Santa Catarina.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 ABELHAS

Pertencentes a Classe *Insecta*, Ordem *Hymenoptera*, e Superfamília *Apoidea*, cerca de 20 mil espécies de abelhas já foram descritas mundialmente. Aproximadamente 3 % deste total encontram-se no território brasileiro, onde apenas 2 % são produtoras de mel, sendo as do gênero *Apis mellifera* e *Meliponinae* as que recebem destaque (CAMPOS et al., 2014; CHUTTONG et al., 2016; RAMÓN-SIERRA; RUIZ-RUIZ; DE LA LUZ ORTIZ-VÁZQUEZ, 2015; VILLAS-BÔAS, 2012; WITTER; NUNES-SILVA, 2014).

No Brasil ambas as espécies são encontradas. As abelhas *Apis mellifera* foram introduzidas na região sudeste no século XIX, sendo de origem europeia, apresentavam baixa produtividade e resistência. Em 1956, 33 rainhas africanas *Apis mellifera scutellata* que apresentavam alta produção, resistência e familiaridade com o clima tropical como características, foram introduzidas no país, surgindo então o processo de africanização das abelhas *Apis mellifera* nacionalmente. A partir de então, sendo animais resistentes a diversas pragas e com alto rendimento, a produção apícola levou o Brasil a ocupar posição de destaque no mercado externo (MARTINEZ; SOARES, 2012; OLIVEIRA; CUNHA, 2005).

As *Meliponinae* são conhecidas como “*Stingless bees*” do inglês, ou popularmente chamadas de abelhas sem ferrão, são abelhas sociais que apresentam atrofia do ferrão, não funcionando como mecanismo de defesa, perdendo assim sua capacidade de ferocar. Esse grupo é composto por 3 tribos: *Meliponini*, *Trigonini* e *Lastrimelittini* (BILUCA, 2014; DE LIMA, 2015; OLIVEIRA et al., 2013). Essas abelhas podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, distribuindo-se, portanto, na maior parte do território Latino-americano, além da Austrália, Indonésia, Malásia, Índia, África e Tailândia (CHUTTONG et al., 2016; RAMÓN-SIERRA; RUIZ-RUIZ; DE LA LUZ ORTIZ-VÁZQUEZ, 2015; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013) sendo mais de 500 espécies e 32 gêneros já descritos (CHUTTONG et al., 2016) e nacionalmente são mais de 200 espécies conhecidas principalmente nas regiões norte e nordeste (CAMPOS et al., 2014).

Ao contrário das *Apis melliferas*, as abelhas sem ferrão são nativas do território nacional fazendo parte dos costumes socioculturais, alimentares, medicinais, ritualísticos e comerciais de muitos povos, como por exemplo os Kayapó da bacia amazônica brasileira (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

A criação das colônias e o manejo das colmeias de abelhas originaram a apicultura e a meliponicultura, atividades que têm proporcionado ao homem a extração, utilização, comercialização e consumo de diversos produtos como mel, pólen, geleia real, própolis, entre outros. Além disso as abelhas desempenham importante papel na natureza, contribuindo para a polinização e manutenção da biodiversidade; entretanto, esses animais vêm sofrendo redução ao longo dos anos, consequência de fatores climáticos, parasitas, e principalmente pelo uso intensivo de pesticidas (CHAIMANEE et al., 2016; TOMÉ et al., 2015).

Nos últimos anos, o constante interesse pelo consumo de produtos oriundos de abelhas tem alavancado o mercado interno e externo. Comercialmente foram exportados mais de 8 milhões de kg de mel no primeiro quadrimestre de 2016, totalizando mais de US\$ 28 milhões de dólares, em 2015 aproximadamente 22 milhões de kg movimentaram cerca de US\$ 81 milhões de dólares (CUBA, 2016).

## **2 MELIPONICULTURA**

A meliponicultura é definida como o manejo e criação racional de abelhas sem ferrão, praticada desde antes da colonização e atualmente é considerada atividade crescente no Brasil. Caracterizada como criação ecologicamente correta, requer baixo investimento inicial, e apresenta boas perspectivas econômicas, com geração de renda sustentável (WITTER; NUNES-SILVA, 2014).

Há muito tempo a atividade já era realizada de maneira rudimentar por comunidades indígenas no Brasil, onde já criavam e exploravam os produtos das abelhas sem ferrão (ou também conhecida como abelhas indígenas), essa herança indígena se traduz em alguns dos nomes populares das espécies conforme representado na Tabela 1. Atualmente a criação desses animais possui legislação específica para seu trato, preconizado pela Resolução CONAMA nº 346 de agosto de 2004 a qual orienta a proteção e utilização desses animais (BRASIL, 2004).

**Tabela 1** - Algumas espécies de abelhas sem ferrão

<b>Nome Popular</b>	<b>Nome Científico</b>
Jupará, jandaíra, jandaíra-Preta	<i>Melipona compressipes</i>
Tiúba, Uruçu-Cinzenta	<i>Melipona fasciculata</i>
Uruçu, Uruçu-Boca-de-Renda, Jandaíra-Amarela	<i>Melipona seminigra</i>
Canudo	<i>Scaptotrigona sp.</i>
Monduri, Rajada	<i>Melipona Asilvai</i>
Mandaçaia	<i>Melipona mandacaia</i>
	<i>Melipona quadrifasciata</i>
Uruçu, Uruçu-Nordestina, Uruçu- Verdadeira	<i>Melipona scutellaris</i>
Jandaíra, Uruçu	<i>Melipona subnitida</i>
Uruçu, Jandaíra	<i>Melipona compressipes</i>
Uruçu-Amarela	<i>Melipona rufiventris</i>
Jataí	<i>Tetragonisca angustula</i>
Guarupú, Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>
Monduri	<i>Melipona mondury</i>

Fonte: Adaptado de Villas-Boas (2012)

Com organização social estruturada, as abelhas sem ferrão dividem-se em operárias, machos (zangões) e rainhas; organização

para que em seu curto período de vida (aproximadamente 55 dias) possam fabricar diferentes produtos (OLIVEIRA et al., 2013; VILLAS-BÔAS, 2012).

Maiores que as operárias, as rainhas geralmente nascem em células reais (células de cria maiores) ou casulos reais (junção de duas células de cria tradicionais), ou ainda as que apresentarem potencial genético podem ser determinadas pela alimentação (sendo de mesmo tamanho inicialmente e nascendo de células de cria tradicionais) são responsáveis pelo gerenciamento da colmeia através de um sistema de feromônios para comunicação e também a postura de ovos, geralmente nas colônias há as chamadas rainhas virgens, que são poedeiras em potencial, aptas para substituir a rainha se necessário (OLIVEIRA et al., 2013; VILLAS-BÔAS, 2012).

Os machos podem realizar alguns pequenos trabalhos dentro da colmeia (manipulação de cera e néctar), mas são inicialmente exclusivos para o acasalamento no voo nupcial, e na escassez de alimentos, os machos são expulsos ou mortos pelas operárias após a fecundação. As operárias por sua vez se apresentam em maior abundância dentro da colmeia, chegando aos 80 % da população total representam toda a força de trabalho. São caracterizadas por apresentarem a corbícula em sua estrutura corporal que é específica para o transporte e manejo de pólen e outros materiais; realizam as seguintes funções: cuidado com as crias, cuidado com a higiene, cuidado e manejo dos alimentos, construção da estrutura física da colmeia, limpeza da colmeia, defesa da rainha e do ninho, entre outras (BILUCA, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; VILLAS-BÔAS, 2012).

Para a construção dos ninhos as operárias utilizam diferentes materiais como barro, própolis, cera, geoprópolis e cerume. Seus ninhos naturais, são basicamente aéreos expostos ou não expostos sendo confeccionados no interior de árvores vivas ou mortas, em cavidades no solo, em cavidades artificiais que ocorrem nas cidades (prédios, muros, calçadas), e tem como principal característica as entradas dos ninhos que variam conforme a espécie da abelha, diferenciando uma das outras. Feito um ninho, o processo de multiplicação natural das colônias é denominado nidificação. O local para a construção do novo ninho é procurado com antecedência à mudança, quando encontrado, o material primário para a formação das colônias (cera e resina) é carregado pelas operárias ao novo local. Assim um enxame pode ser formado quando há presença de pelo menos uma rainha virgem acompanhando o resto da colônia para o



novo local que varia entre 200 a 400 m de distância da colônia mãe, tornando o processo de dispersão desses insetos lento (OLIVEIRA et al., 2013; VILLAS-BÔAS, 2012).

Devido às proporções continentais, diferentes espécies geralmente atuam em determinadas regiões do Brasil (Tabela 2), porém, com o advento da globalização comercial, é possível encontrar em meliponários espécies de todas as regiões do país.

**Tabela 2** - Distribuição geográfica por regiões das espécies de abelha sem ferrão

<b>Região</b>	<b>Norte</b>	<b>Sul</b>	<b>Centro-Oeste</b>
<b>Nome Científico</b>	<i>Melipona compressipes</i> ; <i>Melipona fasciculata</i> ; <i>Melipona seminigra</i> ; <i>Scaptotrigona sp.</i>	<i>Melipona bicolor</i> ; <i>Melipona quadrifasciata</i> ; <i>Tetragonisca angustula</i> ; <i>Melipona mondury</i>	<i>Melipona compressipes</i> ; <i>Melipona rufiventris</i> ; <i>Melipona seminigra</i> ; <i>Scaptotrigona sp.</i> ;
	<b>Nordeste</b>	<b>Sudeste</b>	<i>Tetragonisca angustula</i>
	<i>Melipona Asilvai</i> ; <i>Melipona fasciculata</i> ; <i>Melipona mandacaia</i> ; <i>Melipona quadrifasciata</i> ; <i>Melipona scutellaris</i> ; <i>Melipona subnitida</i>	<i>Melipona quadrifasciata</i> ; <i>Melipona seminigra</i> ; <i>Scaptotrigona sp.</i> ; <i>Tetragonisca angustula</i>	

Fonte: Adaptado de Villas-Boas (2012)

### 3 PRODUTOS DAS ABELHAS SEM FERRÃO

O mel é o produto mais conhecido e consumido de maneira geral, é produzido a partir de néctar, exsudatos e outras substâncias das plantas que são coletadas e processadas pelas abelhas utilizando enzimas digestivas. Apresentando algumas diferenças em relação ao mel de *Apis*, as abelhas sem ferrão produzem mel em menor quantidade e com maior concentração de água (25 % a 35 %), conseqüentemente menores teores de açúcares, elevando assim a possibilidade de ataque de micro-organismos e fermentação do produto. Mesmo sendo muito consumidos e procurados, os méis de abelhas sem ferrão, até o momento não

possuem regulamentação e padrão de identidade e qualidade definidos por nenhum órgão regulador no Brasil (BILUCA, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; VILLAS-BÓAS, 2012).

É sugerido que o mel de abelhas sem ferrão atue como fonte natural de compostos que apresentam ação antioxidante, considerando que em sua composição química são encontrados compostos tais como ácido salicílico, ácido p-cumárico, naringina, taxifolina, entre outros minoritários, assim como a presença de macro minerais, tais como cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na) (BILUCA et al., 2017).

Outras propriedades do mel de abelha sem ferrão incluem sua atividade antimicrobiana, evidenciada em estudos frente a cepas de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecali* e *Escherichia coli* (DEMERA; ANGERT, 2004; MIORIN et al., 2003; SGARIGLIA et al., 2010).

O pólen é o produto derivado de uma combinação de pólen floral com néctar ou mel, enzimas digestivas, cera e secreção das abelhas, a mistura é transportada em blocos presos as patas dos insetos e recolhido para dentro da colônia onde serve como principal alimento empregado pelas abelhas para o desenvolvimento das crias, abelhas recém-nascidas e rainha, contendo em sua composição proteínas, aminoácidos essenciais, lipídeos, vitaminas (B, C, D, E e H), sais minerais e também compostos bioativos como os polifenóis, diante disso, esse produto tem ganhado atenção como alimento funcional por consequência da composição rica em compostos benéficos a saúde (ARES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2007; SOUZA et al., 2004).

Outro produto fabricado pelas abelhas sem ferrão é a geoprópolis, que apresenta diferenças em relação a popularmente conhecida própolis de *Apis mellifera*. Este produto e suas diferenças em relação a própolis serão abordados no item 4.

## 4 PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

### 4.1 A PRÓPOLIS

A própolis é o produto fabricado por abelhas operárias, a partir de secreções enzimáticas e de resinas vegetais provenientes de diferentes partes das plantas, assim como a etimologia da palavra pro= defesa e polis = cidade, é utilizada para o reparo e proteção das colmeias (ARAÚJO, 2013), sendo aplicado na medicina tradicional e em rituais por egípcios, gregos e romanos desde 300 anos a.C (GHISALBERTI,

1979; LUSTOSA et al., 2008). Conhecido por suas propriedades medicinais e biológicas foi rapidamente incorporado a medicina popular para o tratamento de gripe, tosse, dor muscular e micoses (AGÜERO et al., 2014), possui ainda ação anti-inflamatória (NAITO et al., 2007), antiviral (SCHNITZLER et al., 2010), antibacteriano (ODA et al., 2016), anticarcinogênica (CHAN; CHEUNG; SZE, 2013), entre outras.

O primeiro estudo científico foi indexado em 1908 na *Chemical Abstracts* tratando a respeito das propriedades químicas e composição da própolis, em 1968 o resumo da primeira patente utilizando a própolis para a produção de loções de banho também foi relatada na mesma revista (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002) a partir de então por suas características benéficas a saúde vem sendo agregada na alimentação (GUTIÉRREZ-CORTÉS; SUAREZ MAHECHA, 2014; SPINELLI et al., 2015), em bebidas (GOMES et al., 2013), suplementos, cosméticos (LUSTOSA et al., 2008), e ainda como aditivo de conservação (LUIS-VILLAROYA et al., 2015).

Sua composição química depende de fatores como: origem das abelhas, clima, disposição geográfica, condições ambientais e ecologia da flora escolhida para a coleta do material. Sabe-se que mais de 300 compostos podem ser encontrados na própolis, como aminoácidos, compostos inorgânicos (como cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio, silício, níquel, zinco e cromo) (MARCUCCI, 1996), ácidos graxos, vitaminas (A, B1, B2, B6, C, E) (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002) e compostos como os compostos fenólicos (em maior quantidade em relação ao mel) constituindo mais de 50 % do peso total (KASOTE et al., 2014) destacando-se os ácidos gálico, cafeico e siríngico (FRANCHIN et al., 2012; KUSTIAWAN et al., 2014; OELLIG, 2016; SILVA et al., 2013).

As informações dispostas na Tabela 3 ilustram alguns autores e seus estudos com própolis provenientes de diferentes regiões geográficas.

**Tabela 3** - Alguns estudos realizados com própolis por diferentes autores.

<b>Autor(es)</b>	<b>Origem da própolis</b>	<b>Periódico</b>	<b>Análises realizadas/Analitos</b>
Buratti, Benedetti e Cosio (2007)	Itália, Alemanha, Hungria e China	<i>Talanta</i>	Atividade antioxidante; compostos fenólicos totais
Gong et al. (2012)	China e Estados Unidos	<i>Food Chemistry</i>	Cálcio, alumínio, manganês, magnésio, potássio, ferro, sódio, zinco, chumbo, estrôncio, cádmio, arsênio, cobre, cromo e níquel
Korn et al. (2012)	Bahia (Brasil)	<i>Food Analytical Methods</i>	Bário, cobre, cálcio, cádmio, cromo, chumbo, cobalto, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, níquel e zinco
Mendonça et al. (2015)	Sergipe (Brasil)	<i>Food Science and Technology</i>	Colorimetria (L*, a*, b*); composição fenólica total; teor de flavonoides total; composição química (flavonóides e ácidos fenólicos; atividade antimicrobiana
Mello, Petrus e Hubinger (2010)	São Paulo (Brasil)	<i>Journal of Food Engineering</i>	Teor de flavonoides; composição fenólica total; composição química (flavonóides e ácidos fenólicos)
Mouhoubi-Tafinine, Ouchemoukh e Tamendjari (2016)	Adekar, Bejaia, Oued ghir, Elkseur (Argélia)	<i>Industrial Crops and Products</i>	Composição fenólica total; teor de flavonoides; teor de carotenoides; teor de ácido ascórbico; determinação de poder redutor

Fonte: próprio autor

Diferentes tipos de própolis têm sido relatados, considerando origem geográfica, fonte botânica e composição química, sendo mais comuns amostras de regiões de clima temperado, tropical, mediterrâneo e pacífico. A própolis brasileira é característica de regiões tropicais, classificada em 12 grupos de acordo com sua composição físico-química, sendo os de coloração verde derivado da *Baccharis dracunculifolia* e marrom derivado de espécies de *Copaifera*, sendo as amostras mais comuns e por esse motivo as mais estudadas e utilizadas em alimentos e bebidas. Outra própolis muito conhecida é a vermelha proveniente de plantas de *Dalbergia ecastophyllum* (DA SILVA FROZZA et al., 2013; KASOTE et al., 2014).

Estima-se que o consumo mundial de própolis seja de 700 a 800 toneladas anuais, segundo Lustosa et al. (2008), não existem dados concretos sobre o volume de produção no país, mas acredita-se que seja algo em torno de 150 toneladas anuais, tornando o Brasil o segundo maior produtor de própolis mundial, logo atrás da China (LUSTOSA et al., 2008). O recente interesse mundial por alimentos funcionais propiciou a adição de doses de própolis a diferentes produtos alimentícios, contudo o forte sabor, amargor e adstringência característicos do alto teor de compostos fenólicos fazem com que a utilização da própolis como suplemento nutricional seja realizada com cautela, de maneira a amenizar esses efeitos sensoriais indesejáveis (OSÉS et al., 2016).

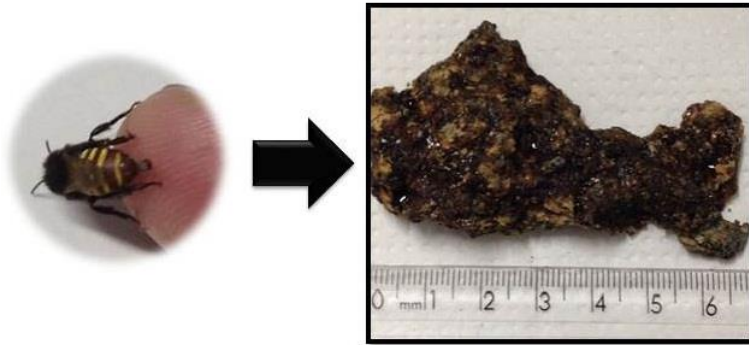
#### 4.2 A GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO

A geoprópolis é resultado da mescla de resinas vegetais, secreções de glândulas das abelhas e majoritariamente de solo, produzida por abelhas sem ferrão (*meliponíneos*), gerando um produto fragmentado, com propriedades adesivas, de cor marrom escura e sabor amargo. Devido à presença de compostos minerais em sua composição, mostra-se ligeiramente mais rígido que a própolis (CUNHA et al., 2009; FREITAS; VIT; BARTH, 2013; SILVA et al., 2013).

É utilizada pelas abelhas como matéria prima para a construção de diferentes estruturas na colônia, como caminhos internos, tubos de entrada e batumes (estruturas de separação das colônias), para vedação e proteção de seus ninhos (OLIVEIRA et al., 2013; VILLAS-BÔAS, 2012).

A Figura 1 traz a imagem de uma amostra de geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata*.

**Figura 1** - Geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* (fragmento).



Fonte: próprio autor

No Brasil a geoprópolis vem sendo utilizada por tribos indígenas como matéria prima para a fabricação de ferramentas e como dádiva em sepultamentos (DE LIMA, 2015). Atualmente é popularmente utilizada por seus benefícios medicinais, atuando como antisséptico, antioxidante (SAWAYA, 2009), agente antimicrobiano (DA CUNHA et al., 2013), no tratamento de doenças respiratórias, dermatológicas e auxiliando no sistema imunológico (SILVA et al., 2013). É também utilizada por meliponicultores para a produção de extrato alcoólico, com objetivo de servir como isca para a atração de novas colônias de abelhas (VILLAS-BÔAS, 2012).

A vasta composição química da geoprópolis, resultado da disposição geográfica das colônias, flora local e espécie de abelha, conferem ao produto a presença de variados compostos polifenólicos, assim como ácido gálico, di e tri terpenos, identificados por Velikova et al. (2000) em 21 amostras de geoprópolis de 12 espécies de abelhas por GC-MS, conferindo ao produto alta atividade antioxidante, o que explica seu uso na medicina popular. Também identificados por Batista et al. (2016): ácidos graxos, ácidos orgânicos, açúcares, álcoois e esteroides (BARTOLOMEU et al., 2016; FRANCHIN et al., 2012; SILVA et al., 2013).

Diante da composição química complexa, a geoprópolis de abelhas nativas vêm sendo estudada, e apresenta potencialidades de uso na área farmacêutica e clínica. Já foram realizados estudos avaliando a

toxicidade de cumarinas isoladas de geoprópolis da espécie *M. scutellaris* (DA CUNHA et al., 2016), verificado o efeito de geoprópolis de abelha *M. fasciculata* frente ao micro-organismo *Pythium insidiosum* resultando em um efeito fungistático (ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016), realizado estudo *in vivo* utilizando geoprópolis de abelha *M. compressipes fasciculata* no trato de micro-organismos alojados na cavidade oral de pacientes, indicando ser uma alternativa na prevenção de cáries (DUAILIBE; GONÇALVES; AHID, 2007). Também como, Bartolomeu et al. (2016) reportam que a utilização da geoprópolis de *M. fasciculata* Smith em associação com agentes quimioterápicos induz uma potencialidade do tratamento de câncer na laringe. Esses exemplos traduzem a grande importância do estudo dessa matriz.

A Tabela 4 relata alguns autores e seus estudos com geoprópolis proveniente de diferentes regiões geográficas.

**Tabela 4** - Alguns estudos realizados com geoprópolis por diferentes autores

<b>Autor</b>	<b>Origem da geoprópolis</b>	<b>Periódico</b>	<b>Análises realizadas em geoprópolis</b>
Araújo et al. (2016)	Novo Acordo e Santa Maria (TO)	<i>Acta Amazonica</i>	Umidade; minerais totais; teor de cera; pH; atividade antioxidante; composição fenólica total; perfil polifenólico (HPLC)*
Araujo et al. (2015)	Palmeirândia (MA)	<i>Journal of Molecular Pathophysiology</i>	Atividade antimodulatória; atidade antibacteriana; atividade anti-tumoral; perfil polifenólico (GC-MS)*
Batista et al. (2016)	Palmeirândia e Fernando Falcão (MA)	<i>Acta Amazonica</i>	Atividade antioxidante; composição fenólica total; perfil polifenólico (GC-MS)*
Cardozo et al. (2015)	Prudentópolis (PR)	Revista Virtual de Química	Composição fenólica total; flavonóides; atividade antioxidante; perfil polifenólico (UPLC-MS)*
Dutra et al. (2014)	Fernando Falcao, Alto Mearim e Grajau (MA)	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>	Composição fenólica total; atividade antioxidante; perfil polifenólico (HPLC-DAD-ESI-MS/MS)*
Silva et al. (2014)	Paraíba	<i>Sociobiology</i>	Composição fenólica total; atividade antioxidante; Perfil polifenólico (HPLC)*

\*: Composição polifenólico das amostras disponível em: APÊNDICE A – Compostos identificados em Geoprópolis.

Fonte: próprio autor

A deficiência de informações sobre a geoprópolis pode ser observada em relação a estudos com a matriz, representados na Figura 2, considerando o número de publicações entre os anos de 1998 a 2016 que contemplam a geoprópolis. Ao longo de mais de uma década, a partir dos anos de 1998 até 2012, é possível destacar que o número máximo de trabalhos relacionando a matriz geoprópolis foram de 2, somente no ano de 2016 houve um aumento do número de trabalhos que pesquisaram a geoprópolis alcançando um máximo de 11 trabalhos no ano. Sendo que a maioria dos trabalhos relatados são de origem brasileira.

Além disso, o produto não conta com uma legislação específica, é comercializado com base na Instrução Normativa 3/2001 do Ministério da Agricultura, destinado a produtos provenientes de abelhas africanizadas, dificultando o mercado e comercialização (ARAÚJO, 2013).

Em razão desses fatores, não existem dados estatísticos de produção, comercialização e geração de renda sobre o produto, assim como não foram encontrados dados que indiquem a aplicação da geoprópolis em alimentos.



**Figura 2** - Estudos publicados com geoprópolis (1998-2017).



Termo de pesquisa utilizado: “geoprópolis”. Fonte: SCOPUS (2017)

Estudos considerando a composição química desse produto apresentam extrema relevância, uma vez que seu uso é cada vez mais difundido em muitas regiões do Brasil além de sua exploração ser considerada fonte de renda sustentável, e contribuindo para a preservação da biodiversidade.

#### 4.3 ESTUDOS RECENTES EM PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

Nos últimos anos tem crescido o interesse pela própolis e geoprópolis de regiões tropicais e especialmente do Brasil, pela identificação de diversos novos compostos dos quais muitos apresentam atividade biológica. Além das análises físico químicas (umidade, cinzas, pH, lipídeos, cera) relatadas por alguns autores (ACEVES; ORTEGA; BARRAGÁN, 2015; ARAÚJO et al., 2016), análises de compostos bioativos (composição fenólica e atividade antioxidante) utilizando diferentes solventes extratores como água, etanol, metanol são comumente empregadas para a determinação do perfil químico dessas matrizes (BURATTI; BENEDETTI; COSIO, 2007; MOUHOUBITAFININE; OUCHEMOUKH; TAMENDJARI, 2016; PARK et al., 1998; SILVA et al., 2012, 2013).

### 4.3.1 Composição fenólica e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são as substâncias naturais mais estudadas atualmente, sendo produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa contra ataques em seu tecido vegetal ou em situações de estresse (condições climáticas, luz, alterações de pH). Esses compostos são considerados metabólitos secundários, uma vez que não são produzidos diretamente com a finalidade de crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo assim, não são encontrados em toda a extensão e nem em todos os estádios de desenvolvimento da planta (DIAS et al., 2016; WANG et al., 2016).

Possuindo vasta diversidade química e estrutural, são caracterizados pela presença de um grupo hidroxílico (-OH) ligado a um anel benzênico ou mesmo a anéis aromáticos (BELWAL et al., 2016; ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016). Agindo como redutores, são conhecidos pela atividade preventiva contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres que causam danos oxidativos em moléculas de DNA, proteínas e membranas lipídicas, apresentando também ação anti-inflamatória e ação anticarcinogênica (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016; WANG; HE; CHEN, 2014).

Atualmente tem se evidenciado a atuação dos radicais livres espalhados pelo organismo entre doenças degenerativas relativas ao envelhecimento, assim como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, deficiência no sistema imunológico e disfunções neurológicas (ATOUI, 2005).

Não sendo sintetizado pelo organismo humano, os compostos fenólicos são adquiridos pela alimentação, estando largamente distribuídos em alimentos de origem vegetal, como frutas, vegetais e seus derivados (vinhos, cervejas, chás, sucos) e partindo do princípio que as abelhas utilizam o néctar das plantas para a fabricação de seus produtos, sabe-se que ocorre a transferência dessas substâncias (BILUCA, 2014; MUNEKATA et al., 2016).

Os compostos fenólicos nas últimas décadas tem despertado a atenção no meio científico, tanto nas áreas da nutrição como na ciência dos alimentos (ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016).

De acordo com a literatura, técnicas *in vitro* e *in vivo* vem sendo utilizadas para a avaliação da composição fenólica e atividade antioxidante em própolis e geoprópolis. Para a quantificação de compostos fenólicos totais a técnica de Folin-Ciocalteu é comumente empregada, na presença de compostos fenólicos em meio alcalino ocorre a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste na mistura dos

ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico, gerando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio formando um complexo de coloração azul passível de quantificação por espectrometria molecular na região do visível (760 nm) (BILUCA, 2014).

A avaliação da capacidade antioxidante é realizada comumente com o método de sequestro de radicais livres, onde o reagente de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é composto por agentes oxidantes originalmente de coloração púrpura, que em contato com compostos antioxidantes (que apresentam tendência a doar elétrons desemparelhados) sofrem redução tornando a solução proporcionalmente amarela, passível de quantificação por espectrometria visível (515 nm) (BILUCA, 2014).

Silva et. al (2013) realizaram a determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em amostras de geoprópolis provenientes de duas espécies de abelhas do gênero *Melipona*. A determinação de fenólicos totais foi realizada a partir do método de Folin-Ciocalteu, através de curva padrão de ácido gálico variando de  $411,4 \pm 4,7$  a  $5199,4 \pm 0,5$   $\mu\text{g EAG g}^{-1}$  no extrato metanólico de geoprópolis, a atividade antioxidante (capacidade redutora) foi determinada por dois métodos, o FRAP e DPPH, com valores máximos de  $106,6 \pm 0,5$   $\text{mmol Fe (II) mg}^{-1}$  e  $493,3 \pm 1,9$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  no extrato metanólico de geoprópolis respectivamente.

Por ser um produto de composição complexa, técnicas de separação como a cromatografia líquida e gasosa são empregadas para a identificação e quantificação dos diferentes compostos presentes em própolis e geoprópolis.

As determinações do perfil de compostos fenólicos presentes em matrizes complexas são atualmente realizadas por técnicas analíticas sensíveis, assim como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês). A amostra é condicionada através de uma fase móvel líquida em alta pressão a atravessar uma fase estacionária empacotada em uma coluna cromatográfica (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Os compostos que compõem a amostra interagem em diferentes graus com a fase estacionária, sendo separados e detectados em diferentes tempos de retenção. A quantificação dos analitos de interesse ocorre mediante a comparação com uma curva de padrões (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A cromatografia líquida pode fazer uso de detectores sofisticados e sensíveis para a identificação e quantificação de espécies químicas, assim como os espectrômetros de massas. O detector de massas é responsável por separar individualmente e com maior precisão os íons

de interesse baseados na relação entre sua massa molecular e sua carga. Através do analisador quadripolar, uma fonte de corrente contínua é aplicada logo após formação dos íons pela atomização da amostra, os íons que não são de interesse serão redirecionados e neutralizados, já os íons de interesse serão preservados, direcionados, amplificados e detectados pelo transdutor de íons (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A velocidade de análise, sensibilidade do equipamento, simplicidade de operação, custo relativamente baixo e ampla aplicação, fazem com que a utilização da técnica de cromatografia líquida aliada a detector de massas seja uma ferramenta essencial no desenvolvimento de muitas pesquisas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Em estudo proposto por Park et al. (1998) o qual utiliza a extração aquosa e etanólica da própolis, os flavonoides foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, identificando oito flavonóides: quercitina, kanferol, isosakuranetina, pinocembrina, sakuranetina, acacetina e kanferide. A mesma metodologia de análise foi aplicada por Mello, Petrus e Hubinger (2010) para a determinação de diferentes ácidos fenólicos no extrato concentrado de própolis, identificando ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferúlico.

### **4.3.2 Extração de componentes bioativos**

Os procedimentos de extração e solventes empregados para a extração e análise de componentes bioativos são de extrema importância, uma vez que influenciam diretamente na eficiência do processo, definem características e precisão na quantificação dos constituintes da matriz.

Muitos autores aplicam sistemas de extração utilizando diferentes solventes em diferentes proporções, considerando a afinidade dos mesmos com os componentes que se deseja extrair. A Tabela 5 indica alguns dos solventes extratores aplicados em própolis de *Apis mellifera*. A grande maioria dos trabalhos utilizando extrato de própolis produzem seus extratos com álcool, possivelmente para reproduzir os produtos comerciais que não apresentam toxicidade.

**Tabela 5** - Principais solventes extratores já aplicados em amostras de própolis

<b>Solventes extratores</b>	<b>Autor</b>
Etanol 100 %	Buratti, Benedetti e Cosio (2007)
Etanol 80 %	Mello, Petrus e Hubinger (2010)
Etanol 70 %	Mendonça et al. (2015)
Água	
Etanol 50 %, 85 %	Mouhoubi-Tafinine, Ouchemoukh e Tamendjari (2016)
Metanol 50 %	

Fonte: próprio autor

Silva et al. (2012) utilizam três procedimentos de extração: extração aquosa, extração metanoica e extração hidroalcoólica, comparando esses procedimentos a partir da análise de fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu) e flavonoides totais (método cloreto de alumínio) em amostras de própolis, a extração aquosa não foi eficiente, em contrapartida a hidroalcoólica obteve os melhores resultados; a extração alcoólica foi utilizada como condição para as análises de absorvidade molecular, atividade anti-inflamatória e atividade antimicrobiana.

Em geoprópolis, Araújo et al. (2016) utilizaram etanol 80 % v/v para obter os extratos, Dutra et al. (2014) utilizaram o mesmo solvente, porém em concentração de 70 % v/v, mesmas proporções utilizadas por Batista et al. (2016).

### 4.3.3 Minerais

Os compostos minerais são caracterizados como micronutrientes, adquiridos através da alimentação e com papel fundamental no corpo humano, participando de reações biológicas diversas, porém alguns minerais podem atuar como agentes tóxicos (GONG et al., 2012).

A contaminação por metais tóxicos em amostras de geoprópolis pode indicar o impacto da ação humana na região de coleta do solo pelas

abelhas, uma vez esse tipo de contaminação deriva de fontes antropogênicas. A contaminação por metais com potencial tóxico mesmo que em concentrações baixas pode ser prejudicial à saúde, causando problemas neurológicos, fisiológicos e comportamentais, e em concentrações elevadas podem causar a morte. Além de serem causadores de danos ao meio ambiente, devido ao seu poder poluente e toxicidade podem se bioacumular em cadeias alimentares, ameaçando a saúde humana e todo o ecossistema natural (EL NEMR et al., 2016; SALES et al., 2006; ZHANG et al., 2016).

No entanto, a carência de minerais no organismo humano também é responsável pelo desencadeamento de doenças, como exemplo a anemia ferropriva, ocasionada pela deficiência de ferro no organismo, sendo considerada o maior problema de saúde por deficiência de um micronutriente no Brasil e representando cerca de 50 % dos casos de anemia mundialmente (COZZOLINO, 2007; HEMPEL; BOLLARD, 2016).

O excesso de alguns microelementos tal como o sódio é associado diretamente a doenças cardiovasculares, como a hipertensão, e tem recomendação de limite de consumo pelo Ministério da Saúde de 2000 mg de sódio para uma dieta de 2000 kcal/dia, em contrapartida o potássio, atua como antagonista aos efeitos nocivos causados pelo sódio, apesar de seu excesso poder ocasionar estágios de diabete Mellitus, afetar fígado e sistema renal (MIZÉHOUN-ADISSODA et al., 2017; BRASIL, 2006; TANASE et al., 2011; VELAGAPUDI et al., 2017).

A identificação e quantificação dos elementos minerais pode ser realizada por diferentes técnicas analíticas as quais são empregadas para a avaliação da composição mineral como a espectrofotometria Uv-Vis, espectrometria de absorção atômica (AAS) espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado a espectrômetro de massas (ICP-MS) são técnicas analíticas utilizadas para determinação multielementar (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A avaliação por ICP-MS consiste na atomização e ionização da amostra através de uma tocha de plasma de argônio capaz de gerar temperaturas superiores a 10.000 K, seguida pela passagem para o espectrômetro de massas com analisador quadripolar que é responsável pela separação dos íons de interesse com base na sua relação massa/carga, sendo então detectados em um transdutor. Apresenta como principais características a alta estabilidade, baixo ruído e baixa interferência externa, além de contar com precisão, exatidão e alta seletividade conferindo respostas com baixos limites de detecção, aliada

a detecção rápida e alta seletividade (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Entre a complexa composição da própolis, os minerais apresentam-se em quantidades consideráveis (KORN et al., 2013). Diferentes autores relatam a determinação de compostos minerais em própolis (GONG et al., 2012; KORN et al., 2013; PIERINI et al., 2013; SALES et al., 2006), fazendo uso de diferentes técnicas analíticas, contudo não foram encontrados estudos sobre esses elementos em amostras de geoprópolis de abelhas sem ferrão.

#### 4.3.4 Atividade antimicrobiana

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, doenças infecciosas causadas por micro-organismos são a terceira causa de mortalidade no mundo. Bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* são as que acarretam patologias mais severas, as quais o uso de medicamentos para o combate dos sintomas deve ser urgentemente empregado (BILAL et al., 2017).

O aumento da resistência de células microbianas aos atuais medicamentos disponíveis tem impulsionado a busca por diferentes compostos naturais que apresentem ação antimicrobiana, e atraído interesse de pesquisadores. O descobrimento de novas alternativas para o trato de infecções é também estimulada devido aos efeitos colaterais causados pelos atuais tratamentos utilizados contra células patogênicas (ARAÚJO, 2013; BILAL et al., 2017).

Constituintes naturais conhecidos como fitoquímicos e fitobióticos compreendem diversos compostos químicos, tais como alcaloides, taninos, compostos fenólicos, entre outros encontrados em plantas que se mostram eficientes no trato de patologias, e ainda são a base da medicina popular, sendo utilizada por 80 % da população mundial para o trato de doenças (BILAL et al., 2017).

Diferentes métodos têm sido empregados para a análise do potencial antimicrobiano em produtos naturais, sendo os mais conhecidos: método de difusão em ágar por poço, método por difusão em disco em ágar e métodos de micro e macro diluição em caldo. A metodologia de difusão em ágar por disco baseia-se na retenção do extrato natural em discos de papel estéril os quais são dispostos e incubados em ágar contendo células viáveis dos micro-organismos de interesse a serem estudados. Quando positiva a ação antimicrobiana

haverá a formação de halos de inibição em torno o disco (BONA et al., 2014).

A técnica de difusão em ágar por poços baseia-se na retenção do extrato natural em poços feitos no ágar contendo células viáveis do micro-organismo de interesse. Quando positiva a atividade antimicrobiana do extrato, também será observada a formação de halos ao redor dos poços (BONA et al., 2014).

A metodologia de micro diluição em caldo é realizada distribuindo alíquotas de extratos vegetais em diferentes concentrações em microplacas com poços contendo células viáveis dos micro-organismos. As respostas são obtidas por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda adequado (BONA et al., 2014; OSTROSKY et al., 2008).

A própolis já tem sua atividade antimicrobiana avaliada em muitos estudos, contudo os estudos conduzidos com geoprópolis apresentam-se em menor quantidade. Luis-Villaroya et al. (2015) avaliaram o efeito da adição de própolis em suco de maçã para diminuição do tratamento térmico, sendo efetivo para *Listeria monocytogenes*, reduzindo o tempo de tratamento térmico em 75 % e em 3 °C a temperatura necessária para inativar 5 log<sup>10</sup> ciclos de *Escherichia coli*.

Utilizada há muito tempo na medicina popular no combate à infecções, a própolis tem atraído muitos estudos relacionados à sua capacidade antimicrobiana. Agüero et al. (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano das frações da própolis argentina utilizando cepas de *Candida* e fungos dermatófitos (*Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*), obtendo resultados antifúngicos e fungicidas positivos.

Park et al. (1998) estudaram o efeito antimicrobiano do extrato aquoso e etanólico de própolis em culturas ativas de *Staphylococcus aureus*, avaliando o halo formado durante a incubação de placas celulósicas contendo os extratos previamente preparados.

Cunha et al. (2013) reportaram o efeito antimicrobiano do extrato etanólico de geoprópolis de abelha sem ferrão contra seis cepas de bactérias, destacando o significativo efeito em baixas concentrações contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *S. mutans*.



## **CAPÍTULO 2**

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DETERMINAÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DE GEOPRÓPOLIS DE: *Melipona seminigra*,  
*Melipona mandaçaia*, *Melipona scutellaris*, *Melipona mondury* e  
*Tetragonisca angustula*.**



## RESUMO

A geoprópolis é o produto composto por resinas vegetais e secreções enzimáticas, e principalmente e majoritariamente por solo. De composição química complexa, incluindo compostos fenólicos, ácidos graxos, açúcares, os quais tem suas concentrações diretamente influenciadas de acordo com a espécie da abelha produtora, origem floral, localização geográfica. Diante dessa diversidade química o objetivo do estudo foi a extração e avaliação do rendimento das frações orgânicas solúveis, quantificação dos teores de umidade e cinzas totais, assim como a avaliação da estabilidade e solubilidade química avaliada considerando compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em diferentes tempos de extração. Sendo assim foram avaliados os teores de umidade e cinzas totais e realizados extratos em ciclos (10, 20 e 30 dias) em 10 amostras de geoprópolis provenientes do estado de Santa Catarina. O rendimento dos extratos variou de 0,97 % a 35,56 % m/m, sendo o solvente metanol o mais efetivo, observado que tempos longos de extração não promoveram maior solubilidade dos compostos. Os conteúdos de umidade variaram entre  $2,60 \pm 0,02$  % m/m a  $8,80 \pm 0,19$  % m/m, apresentando uma média de aproximadamente 4 % de umidade. Apenas a geoprópolis de abelha *Tetragonisca angustula* apresentou valor considerado baixo do teor de cinzas totais ( $2,23 \pm 0,01$  % m/m), todas as demais amostras apresentaram teores superiores a 51 % m/m, como característico da matriz esperado por sua composição rica em solo. A concentração de compostos fenólicos totais foi maior conforme o aumento do tempo de extração, com valores variando de  $32,15 \pm 7,68$  EAG mg  $100g^{-1}$  a  $2968,54 \pm 52,98$  EAG mg  $100g^{-1}$ , sendo a geoprópolis da espécie *M. scutellaris* coletada em Iporã do Oeste a maior concentração média de fenólicos totais, e a amostra de *M. quadrifasciata* proveniente de Santa Rosa de Lima apresentado aos 20 dias de armazenamento a maior capacidade antioxidante entre as amostras, mantendo-se estável até o trigésimo dia de armazenamento. Os resultados revelaram que o metanol também foi o solventes mais efetivo e que as variações encontradas entre as amostras estudadas estão relacionadas a espécie das abelhas, localização geográfica e flora local.

**Palavras-chave:** Geoprópolis. Abelha sem ferrão. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante.



## 1 INTRODUÇÃO

A meliponicultura é a atividade que visa o manejo e criação racional de abelhas sem ferrão, as quais produzem diferentes produtos de interesse comercial assim como o mel, cera, geleia real, pólen e geoprópolis (ARAÚJO et al., 2016; VILLAS-BÔAS, 2012; WITTER; NUNES-SILVA, 2014).

A geoprópolis de abelhas sem ferrão, diferentemente da própolis de *Apis mellifera*, é composta em sua grande parte por solo, além de resinas vegetais e secreções enzimáticas, produzida para servir como matéria prima na construção de diferentes estruturas internas e externas da colônia (FREITAS; VIT; BARTH, 2013; VILLAS-BÔAS, 2012).

Esse produto apresenta uma composição química complexa, contando com a presença de diferentes compostos polifenólicos, ácidos graxos, açúcares, álcoois e esteroides, que serão dependentes das características geográficas de onde a colônia está localizada, variando flora, clima, e ainda a espécie da abelha (BARTOLOMEU et al., 2016; BATISTA et al., 2016; FRANCHIN et al., 2012; SILVA et al., 2013; VELIKOVA et al., 2000).

Popularmente a geoprópolis é utilizada como antisséptico, antioxidante (SAWAYA, 2009), agente antimicrobiano (DA CUNHA et al., 2013), no trato de doenças respiratórias, dermatológicas e auxiliando no sistema imunológico (SILVA et al., 2013), conferindo ao produto propriedades medicinais.

Diante da vasta composição química, o entendimento da matriz torna-se imprescindível, uma vez que os estudos científicos sobre a geoprópolis são escassos. Os teores de umidade e cinzas são importantes para traçar um panorama geral da amostra, em produtos que apresentam legislação específica esses parâmetros podem ser indicativos de fraudes ou inconformidades.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários excretados pelas plantas em situações desfavoráveis de luz, condições climáticas, alterações de pH, entre outros fatores. Por apresentarem características redutoras, os compostos fenólicos são conhecidos por sua atividade antioxidante, apresentando também ação anti-inflamatória e anticarcinogênica, prevenindo doenças degenerativas, como o câncer, catarata, doenças cardiovasculares, disfunções neurológicas e deficiências no sistema imunológico (ATOUI, 2005; DIAS et al., 2016; MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016; WANG et al., 2016; WANG; HE; CHEN, 2014).

Esses compostos fazem parte das substâncias naturais mais estudadas atualmente, os quais tem despertado atenção científica nas áreas da nutrição e ciência de alimentos, uma vez que não são sintetizados pelo organismo e somente são adquiridos através da alimentação (MUNEKATA et al., 2016; ZUORRO; MAFFEI; LAVECCHIA, 2016).

Dessa maneira o seguinte estudo teve como objetivo a extração por solventes orgânicos, e avaliação do rendimento dos extratos, avaliação dos teores de umidade e cinzas totais, avaliação da estabilidade e solubilidade química avaliada pela determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante durante ciclos de extração para verificação da preservação dos compostos ao longo do tempo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados durante as análises foram de grau analítico. Os reagentes Folin-Ciocalteu, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Santa Ana, EUA), carbonato de sódio, ácido gálico, ácido ascórbico, metanol e etanol foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura gerada por purificador Simplicity UV (Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA)

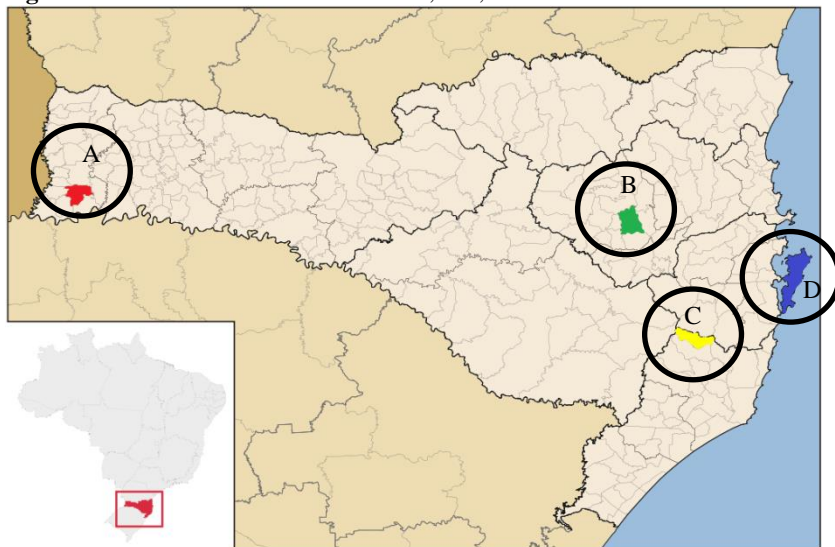
Os principais instrumentos utilizados para as análises foram: balança analítica AB204-S (Mettler Toledo), estufa SP-400 (SPlabor), forno mufla (Quimis), espectrofotômetro de absorção molecular (Spectro Vision), centrífuga MiniSpin plus (Eppendorff).

### 2.1 AMOSTRAGEM

Foram coletadas 10 amostras de geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona mondury*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona seminigra* e *Tetragonisca Angustula* obtidas em meliponários associados a FAASC (Federação das Associações de Apicultores e Meliponicultores de SC) durante o ano de 2016 e 2017, nas cidades de Santa Rosa de Lima (latitude 28°02'21" sul, longitude 49°7'40" oeste e 240 m de altitude), Rio do Sul (latitude 27°12'51" sul, longitude 49°38'35" oeste e 339,88 m de altitude), Iporã do Oeste (latitude 26°98'8" sul, longitude 53°53'5" oeste e 557 m de altitude) e Florianópolis (latitude 27° 35' 48" sul,

longitude 48° 32' 57" oeste e 3 m de altitude), localizadas no Estado de Santa Catarina, Brasil (Figura 3), região caracterizada pelo clima subtropical.

**Figura 3** - Cidades de coleta das amostras, SC, Brasil.



A: Iporã do Oeste, B: Rio do Sul, C: Santa Rosa de Lima, D: Florianópolis  
Fonte: próprio autor

As amostras foram coletadas pelos meliponicultores no momento da abertura das caixas para a coleta do mel, em porções suficientes para o estudo, não danificando as colônias. Após coletadas as amostras foram etiquetadas e transportadas para o Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram secas em estufa com circulação de ar a  $30 \pm 2$  °C por 12 h, e logo após manualmente trituradas, codificadas (Tabela 6) e acondicionadas em tubos de polipropileno armazenados à -18 °C até o momento das análises.

**Tabela 6** - Relação das amostras de geoprópolis, espécies de abelhas e locais de coleta.

<b>Espécie da abelha</b>	<b>Local</b>	<b>Código</b>
<i>M. mondury</i>	Santa Rosa de Lima	MMS
<i>M. mondury</i>	Iporã do Oeste	MMI
<i>M. quadrifasciata</i>	Santa Rosa de Lima	MQS
<i>M. quadrifasciata</i>	Rio do Sul	MQR
<i>M. quadrifasciata</i>	Florianópolis	MQF
<i>M. quadrifasciata</i>	Iporã do Oeste	MQI
<i>M. scutellaris</i>	Santa Rosa de Lima	MSS
<i>M. scutellaris</i>	Iporã do Oeste	MSI
<i>M. seminigra</i>	Santa Rosa de Lima	MSeS
<i>Tetragonisca angustula</i>	Iporã do Oeste	TAI

Fonte: próprio autor

## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Determinação do teor de umidade e teor de cinzas

As amostras submetidas inicialmente a secagem e trituradas foram avaliadas quanto as concentrações de umidade e o conteúdo mineral total.

Para a avaliação do conteúdo de umidade, massas de aproximadamente 3g de amostra foram distribuídas em cápsulas de porcelana previamente secas e taradas, submetidas então a secagem em estufa a temperatura de 105°C até peso constante (LUTZ, 2005).

O resíduo gerado da determinação da umidade foi reaproveitado para a determinação do teor de cinzas totais. As cápsulas de porcelana contendo o resíduo foram submetidas a aquecimento em mufla a temperatura de 550°C até peso constante (LUTZ, 2005).

Ambos os resultados foram expressos em % (m/m) de umidade e cinzas na amostra, calculados a partir da relação entre: (peso inicial - peso final)x100/peso inicial (LUTZ, 2005).

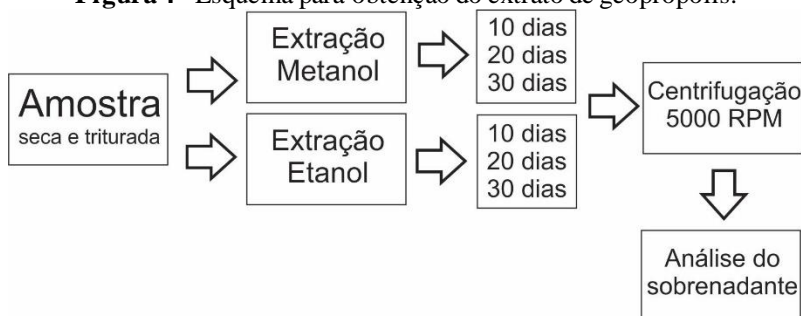


## 2.2.2 Obtenção do extrato de geoprópolis e determinação de rendimento

As amostras de geoprópolis foram submetidas a extração com solventes de diferentes polaridades (etanol e metanol). Massas homogêneas de 3 g das amostras foram transferidas para tubos de polipropileno e extraídas por infusão (10 mL de solvente) durante 10 dias, para simular o tempo mínimo de extração conforme descrito por comunidades nativas que produzem o extrato (SILVA et al., 2013), também 20 e 30 dias para garantir máxima extração, sob refrigeração ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Ao final dos 10, 20 e 30 dias, as amostras foram submetidas a centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi analisado (Figura 4).

**Figura 4** - Esquema para obtenção do extrato de geoprópolis.



Fonte: próprio autor

Os extratos foram avaliados primeiramente quanto ao seu rendimento em relação a massa de substâncias solúveis para o solvente. Volumes de 400  $\mu\text{L}$  do extrato centrifugado foram secos em banho a  $50^\circ\text{C}$  em formas de alumínio previamente taradas e livres de umidade. Logo após submetidos a estufa a  $60^\circ\text{C}$  até massa constante.

## 2.2.3 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico proposto por Singleton e Rossi (1965), baseada na redução dos componentes do reagente de Folin-Ciocalteu onde em presença de agentes redutores (compostos fenólicos) produz uma coloração azul, passível de quantificação (SOUSA et al., 2007).

Para tanto, 100  $\mu\text{L}$  dos extratos de geoprópolis foram adicionados a balões volumétricos de 10 mL contendo 2 mL de água ultrapura, homogeneizado e adicionado de 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu, submetido a agitação por 30 segundos, seguidos da adição de 1,5 mL de carbonato de sódio 20 % (m/v), sob agitação constante. O volume final foi completado e a solução permaneceu em ambiente escuro por 120 minutos. A absorbância foi determinada a 765 nm e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por cento de geoprópolis (mg EAG 100  $\text{g}^{-1}$ ) avaliados através de curva padrão de ácido gálico como referência.

#### **2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante foi quantificada através do método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Técnica colorimétrica de redução de concentração pré-definida do radical DPPH, pelo agente antioxidante (amostra) (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995).

O radical DPPH foi preparado na concentração de 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ , diluído (1:100) em metanol 80 % v/v até absorbância inicial de 0,800 a 515 nm em espectrofotômetro UV/VIS. Em séries de células de vidro com caminho ótico de 10 mm foram adicionados 2,9 mL da solução previamente padronizada do radical DPPH, verificada a absorbância inicial ( $A_0$ ) e em seguida adicionados 100 $\mu\text{L}$  dos extratos de geoprópolis. A mistura foi mantida a temperatura de 25 °C na ausência de luz. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 515 nm após 30 minutos e calculadas em miligramas equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA 100 $^{-1}$  g de amostra) e miligramas equivalente de Trolox (mg ETrolox 100 $^{-1}$  g de amostra) de acordo com a curva padrão produzida paralelamente ao ensaio.

#### **2.2.5 Análise estatística**

Todas as análises foram conduzidas em triplicata, e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. O teste Tukey a um nível de significância de 5%, utilizando software SASM-Agri, foi empregado para avaliar diferença estatística entre as médias de cada amostra de geoprópolis de abelha sem ferrão.

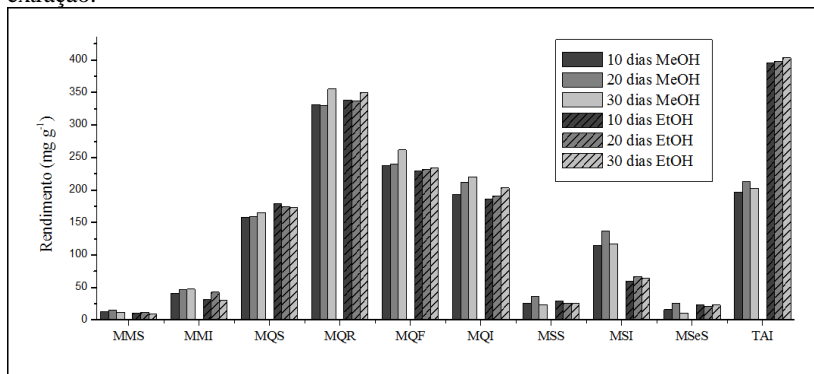
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 RENDIMENTO DO EXTRATO DE GEOPRÓPOLIS

Os rendimentos dos extratos de geoprópolis foram avaliados para identificar o poder de extração dos solventes utilizados nos experimentos, assim como, a taxa de migração das substâncias solúveis ao longo do tempo de armazenamento do extrato.

Os extratos obtidos utilizando solvente metanol, na maioria das amostras, foram superiores em rendimento de massa aos obtidos com o solvente etanol (Figura 5). As amostras de geoprópolis MMS, MMI, MQF, MQI, MSS e MSI, apresentaram médias superiores de rendimento utilizando o solvente metanol (Tabela 7).

**Figura 5** - Rendimento de extrato para as amostras de geoprópolis em comparação a solventes de polaridades distintas em diferentes tempos de extração.



Fonte: próprio autor

Em solução metanoica, a geoprópolis de MQR apresentou maior rendimento (35,56 %) aos 30 dias de extração, e menor rendimento (33,11 %) aos 10 dias. Na mesma amostra, no entanto, utilizando o solvente etanol, o rendimento foi superior em relação ao solvente metanol, alcançando maior rendimento aos 30 dias de extração, porém não diferindo estatisticamente dos demais tempos de extração.

Os resultados indicam que a amostra de geoprópolis de TAI em solvente etanol apresentou rendimento superior geral em relação as outras espécies de abelha e também em relação ao solvente de

polaridade maior metanol, fato que pode estar associado a característica resinosa superior em relação as outras amostras de geoprópolis.

Os menores rendimentos de extrato ficaram por conta da geoprópolis de MSeS aos 30 dias de extração em metanol (1,08 %) e MMS aos 30 dias de extração em etanol (0,97 %).

As amostras de geoprópolis da espécie de abelha *M. quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* apresentaram as maiores taxas de rendimento em relação as outras espécies de abelhas (Tabela 7).

**Tabela 7** - Rendimento dos extratos de amostras de geoprópolis ao longo do tempo de armazenamento em metanol ( $\text{mg g}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Amostra	Metanol		
	10 dias	20 dias	30 dias
<b>MMS</b>	12,47 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	14,96 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>	12,05 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>
<b>MMI</b>	40,84 $\pm$ 2,31 <sup>a</sup>	46,56 $\pm$ 5,78 <sup>a</sup>	47,38 $\pm$ 4,62 <sup>a</sup>
<b>MQS</b>	157,96 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	158,79 $\pm$ 3,53 <sup>a</sup>	165,44 $\pm$ 8,23 <sup>a</sup>
<b>MQR</b>	331,17 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	329,54 $\pm$ 5,20 <sup>a</sup>	355,67 $\pm$ 13,28 <sup>a</sup>
<b>MQF</b>	237,92 $\pm$ 4,10 <sup>b</sup>	239,57 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>	261,50 $\pm$ 2,34 <sup>a</sup>
<b>MQI</b>	192,74 $\pm$ 2,32 <sup>c</sup>	212,01 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	220,22 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>
<b>MSS</b>	25,59 $\pm$ 1,17 <sup>b</sup>	36,32 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	23,11 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
<b>MSI</b>	114,97 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	136,97 $\pm$ 9,39 <sup>a</sup>	117,46 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>
<b>MSeS</b>	15,78 $\pm$ 1,17 <sup>b</sup>	25,09 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	10,80 $\pm$ 1,17 <sup>c</sup>
<b>TAI</b>	196,37 $\pm$ 2,92 <sup>a</sup>	213,32 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	202,16 $\pm$ 6,43 <sup>a</sup>

Letras diferentes em uma mesma linha representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5% de significância. Fonte: próprio autor.

Alguns estudos avaliaram o rendimento de extratos de geoprópolis de abelha sem ferrão. Bankova et al. (1998) reportaram que ao produzir extrato hidroalcoólico de geoprópolis para *M. compressipes*, *Tetragona clavipes* e *M. quadrifasciata anthidioides* obtiveram um rendimento de 5 % (50  $\text{mg g}^{-1}$ ), 14 % (140  $\text{mg g}^{-1}$ ) e 17 % (170  $\text{mg g}^{-1}$ ) respectivamente.

Souza et al. (2014) descrevem um rendimento variando de 1,35 % (13,5  $\text{mg g}^{-1}$ ) a 9,2 % (92  $\text{mg g}^{-1}$ ) em extrato alcoólico de geoprópolis de

*M. subnitida* coletadas no estado da Paraíba. Enquanto Sousa et al. (2015) relatam um rendimento de 7,43 % (74,3 mg g<sup>-1</sup>) no extrato hidroalcoólico para geoprópolis de *M. subnitida* coletadas em Rio Grande do Norte. Santos et al. (2017) relatam o rendimento de 3,49 % (34,9 mg g<sup>-1</sup>) no extrato hidroalcoólico de *M. orbigny*.

Os rendimentos encontrados nessa pesquisa variaram de 0,97 % a 35,56 %, indicando que o poder de solvatação do metanol e etanol atuam diferentemente nos compostos extraídos da matriz de geoprópolis. Observou-se que, estatisticamente no geral, tempos longos de extração não promovem ação extrativa superior em relação a tempos mais curtos. Além de que a extração com solvente metanol na maioria das amostras foi mais eficiente em relação ao etanol.

### 3.2 TEOR DE UMIDADE E CINZAS

Os resultados das análises do teor de umidade e teor de cinzas nas amostras estão apresentados na Tabela 8. O teor de umidade para as amostras de geoprópolis variaram de 2,60 % a 8,80 %, resultados próximos aos encontrados por Araújo et al. (2016) para espécies *M. scutellaris* e *M. fasciculata*, variando nesse estudo de 1,40 % a 1,76 % demonstrando um padrão de baixa umidade em comum entre diferentes geoprópolis de abelha sem ferrão.

**Tabela 8** - Teores de umidade e cinzas em amostras de geoprópolis de diferentes espécies de abelha sem ferrão (% média ± desvio padrão, n=3).

Amostras	Umidade (%) (g 100 g <sup>-1</sup> )	Cinzas (%) (g 100 g <sup>-1</sup> )
MMS	3,51±0,10	80,18±2,50
MMI	2,60±0,02	77,51±0,73
MQS	3,79±0,28	66,01±0,58
MQR	4,77±0,06	51,97±0,56
MQF	3,65±0,17	65,96±0,68
MQI	3,32±0,10	58,32±0,38
MSS	3,23±0,26	78,29±0,30
MSI	3,21±0,02	70,17±1,23
MSeS	8,80±0,19	71,48±0,84
TAI	4,12±0,11	2,23±0,01

Fonte: próprio autor

O resultado de umidade na amostra de geoprópolis de MSeS foi 84% superior em relação as outras espécies de abelhas analisadas. Se comparada com a própolis das abelhas *Apis mellifera*, por exemplo, a umidade da maioria das amostras de geoprópolis apresentou-se inferior ao máximo de 8 % preconizados pela legislação brasileira para própolis bruta (BRASIL, 2001). A amostra de MMI apresentou o menor teor de umidade entre as espécies de abelha analisadas

As cinzas representam o teor de minerais totais distribuídos nas amostras. Com exceção da amostra TAI, em todas as outras espécies, os teores de cinzas nas geoprópolis analisadas foram maiores que 51 %, fato que é característico a composição da matriz, produzida basicamente por solo coletado pelas abelhas.

Por possuir caráter mais resinoso, a amostra TAI apresentou baixa concentração de resíduo mineral fixo (2,23 %), em contrapartida as maiores concentrações encontradas foram nas amostras de *Melipona mondury*, proveniente de Santa Rosa de Lima e Iporã do Oeste, apresentando 80,18 % m/m e 77,51 % m/m respectivamente, também na amostra de *Melipona scutellaris* proveniente de Santa Rosa de Lima foi encontrada alta concentração de cinzas, com cerca de 78,29 % m/m de minerais totais em sua composição.

Oliveira et al. (2015) analisando o teor de cinzas em amostras de geoprópolis de diferentes espécies de abelha sem ferrão, encontraram valores variando entre  $75,40 \pm 0,23$  a  $85,43 \pm 0,53$  % m/m, resultados próximos aos encontrados no estudo em questão.

### 3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação do conteúdo fenólico total e atividade antioxidante foram realizadas nos diferentes tempos de extração, 10, 20 e 30 dias em dois solventes distintos, EtOH e MeOH, a fim de se obter a melhor condição de extração, assim como avaliar, a estabilidade e solubilidade dos compostos fenólicos e antioxidantes. O conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos extratos em solução metanoica estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos de geoprópolis em diferentes tempos de extração (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Solvente Metanol				
	Dias de extração	Fenólicos totais EAG mg 100g <sup>-1</sup>	Atividade antioxidante	
			EAA mg 100g <sup>-1</sup>	ETrolox mg 100g <sup>-1</sup>
MMS	10	112,82 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>	176,07 $\pm$ 1,56 <sup>c</sup>	258,24 $\pm$ 2,29 <sup>c</sup>
	20	32,15 $\pm$ 7,68 <sup>b</sup>	216,44 $\pm$ 4,53 <sup>b</sup>	317,58 $\pm$ 6,66 <sup>b</sup>
	30	64,85 $\pm$ 9,80 <sup>c</sup>	231,74 $\pm$ 1,71 <sup>a</sup>	340,05 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>
MMI	10	794,83 $\pm$ 23,18 <sup>a</sup>	698,63 $\pm$ 43,20 <sup>b</sup>	1025,51 $\pm$ 63,46 <sup>b</sup>
	20	805,42 $\pm$ 6,02 <sup>a</sup>	757,50 $\pm$ 8,34 <sup>b</sup>	1111,99 $\pm$ 12,25 <sup>b</sup>
	30	823,73 $\pm$ 21,88 <sup>a</sup>	1116,73 $\pm$ 7,53 <sup>a</sup>	1638,90 $\pm$ 11,07 <sup>a</sup>
MQS	10	1404,47 $\pm$ 16,76 <sup>b</sup>	1580,89 $\pm$ 15,15 <sup>b</sup>	2320,34 $\pm$ 22,25 <sup>b</sup>
	20	2576,52 $\pm$ 49,13 <sup>a</sup>	5847,61 $\pm$ 45,14 <sup>a</sup>	8582,47 $\pm$ 66,32 <sup>a</sup>
	30	2540,90 $\pm$ 58,71 <sup>a</sup>	5828,36 $\pm$ 41,45 <sup>a</sup>	8554,19 $\pm$ 60,89 <sup>a</sup>
MQR	10	1144,34 $\pm$ 32,86 <sup>b</sup>	326,77 $\pm$ 4,25 <sup>c</sup>	479,64 $\pm$ 6,25 <sup>c</sup>
	20	1370,71 $\pm$ 14,45 <sup>a</sup>	357,73 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>	525,11 $\pm$ 1,46 <sup>b</sup>
	30	1106,78 $\pm$ 22,96 <sup>b</sup>	465,63 $\pm$ 4,25 <sup>a</sup>	683,42 $\pm$ 6,24 <sup>a</sup>
MQF	10	1581,21 $\pm$ 161,27 <sup>b</sup>	3303,19 $\pm$ 42,93 <sup>c</sup>	4848,42 $\pm$ 63,08 <sup>c</sup>
	20	1678,81 $\pm$ 87,84 <sup>b</sup>	3605,26 $\pm$ 14,20 <sup>b</sup>	5292,18 $\pm$ 20,86 <sup>b</sup>
	30	2010,66 $\pm$ 44,73 <sup>a</sup>	3900,27 $\pm$ 8,39 <sup>a</sup>	5725,59 $\pm$ 12,32 <sup>a</sup>
MQI	10	1719,94 $\pm$ 40,21 <sup>b</sup>	1772,86 $\pm$ 26,00 <sup>b</sup>	2600,25 $\pm$ 38,20 <sup>b</sup>
	20	1841,82 $\pm$ 101,20 <sup>ab</sup>	1813,23 $\pm$ 22,71 <sup>b</sup>	2659,56 $\pm$ 33,36 <sup>b</sup>
	30	1961,77 $\pm$ 49,36 <sup>a</sup>	2005,30 $\pm$ 28,76 <sup>a</sup>	2941,73 $\pm$ 27,56 <sup>a</sup>
MSS	10	1226,85 $\pm$ 16,93 <sup>b</sup>	1984,61 $\pm$ 13,73 <sup>c</sup>	2913 $\pm$ 20,16 <sup>b</sup>
	20	1211,98 $\pm$ 5,64 <sup>b</sup>	4918,07 $\pm$ 152,45 <sup>b</sup>	7216,85 $\pm$ 223,96 <sup>a</sup>
	30	1306,00 $\pm$ 26,66 <sup>a</sup>	5058,65 $\pm$ 20,52 <sup>a</sup>	7423,38 $\pm$ 30,15 <sup>a</sup>
MSI	10	2968,54 $\pm$ 52,98 <sup>a</sup>	2836,94 $\pm$ 22,80 <sup>a</sup>	4163,43 $\pm$ 33,49 <sup>a</sup>
	20	2894,13 $\pm$ 20,35 <sup>a</sup>	2862,59 $\pm$ 9,60 <sup>a</sup>	4201,12 $\pm$ 14,11 <sup>a</sup>
	30	2737,48 $\pm$ 48,91 <sup>b</sup>	2847,60 $\pm$ 195,73 <sup>a</sup>	4179,10 $\pm$ 287,55 <sup>a</sup>
MSeS	10	270,94 $\pm$ 5,99 <sup>a</sup>	311,46 $\pm$ 3,45 <sup>c</sup>	449,41 $\pm$ 14,66 <sup>b</sup>
	20	168,28 $\pm$ 3,03 <sup>c</sup>	321,8 $\pm$ 2,67 <sup>b</sup>	472,38 $\pm$ 3,93 <sup>b</sup>
	30	245,21 $\pm$ 10,92 <sup>b</sup>	509,85 $\pm$ 5,92 <sup>a</sup>	747,10 $\pm$ 8,69 <sup>a</sup>
TAI	10	417,38 $\pm$ 17,55 <sup>b</sup>	288,54 $\pm$ 22,80 <sup>b</sup>	423,46 $\pm$ 7,04 <sup>b</sup>
	20	436,89 $\pm$ 17,88 <sup>b</sup>	296,05 $\pm$ 7,73 <sup>b</sup>	434,50 $\pm$ 11,36 <sup>b</sup>
	30	548,06 $\pm$ 3,38 <sup>a</sup>	316,52 $\pm$ 8,83 <sup>a</sup>	464,57 $\pm$ 12,97 <sup>a</sup>

Extração sólido-líquido em metanol a 5  $\pm$  2 °C ao abrigo de luz. Letras diferentes em uma mesma coluna entre uma mesma amostra representam resultados estatisticamente diferentes de acordo com o teste Tukey a 5% de significância. Fonte: próprio autor

Na maioria das amostras analisadas a determinação dos compostos fenólicos totais e a determinação da atividade antioxidante nos extratos aumentaram com o tempo de extração, sendo os resultados em 30 dias de armazenamento superiores aos outros intervalos de extração em ambos os solventes. Esses dados indicam estabilidade dos compostos fenólicos frente ao tempo de armazenamento controlado e que, a solubilidade dos compostos aumenta em relação ao tempo de extração e interação com o solvente, liberando substâncias ao longo do tempo de extração.

Entretanto nas amostras de MMS, MSI e MSeS não foi observado o mesmo comportamento progressivo, ao longo do tempo os compostos fenólicos totais diminuíram, indicando possível degradação desses compostos. O período de 10 dias foi suficiente para total solubilização dos compostos fenólicos pelo solvente.

A amostra de geoprópolis MSI foi a que obteve maior concentração de compostos fenólicos dentre as espécies analisadas e os períodos de extração em metanol. A quantificação da sua composição fenólica aos 10 dias foi de 2,96 %. Contudo a mesma amostra não apresenta maior quantificação da atividade antioxidante, indicando que alguns componentes da matriz de geoprópolis podem interagir na reação de Folin-Ciocalteu ocasionando redução dos componentes do reagente e desencadeando uma reação passível de quantificação

A maior atividade antioxidante foi observada na amostra MQS aos 20 dias de armazenamento em metanol, mantendo-se estável estatisticamente até os 30 dias de extração, sua capacidade antioxidante foi de 5,84 % considerando em equivalentes do antioxidante ácido ascórbico e 8,58 % em equivalentes ao antioxidante sintético Trolox. Em contrapartida a amostra com menor ação antioxidante, aproximadamente 0,17 % em EAA e 0,25 em ETrolox, foi a de MMS aos 10 dias de armazenamento aumentando para 0,23 % em EAA e 0,34% para ETrolox ao final dos 30 dias extração.

Sousa et al. (2015) relatam a quantificação de  $11,29 \pm 0,26$  % ( $112,29$  mg EAG  $g^{-1}$ ) de compostos fenólicos totais em uma amostra de geoprópolis de *Melipona subnitida*, assim como Santos et al. (2017) determina uma concentração de  $121 \pm 0,6$  mg EAG  $g^{-1}$  (12,1 %) de polifenóis totais em geoprópolis de abelha *Melipona orbigny*, ambos os estudos apresentam resultados superiores aos relatados nesse trabalho devido aos procedimentos de concentração adotados pelos autores citados, em que a amostra com maior quantificação no presente estudo apresentou 2,96 % de compostos fenólicos totais e a menor com 0,03 %, MSI e MMS respectivamente.



Araújo et al. (2016), Batista et al. (2016), Dutra et al. (2014) e Souza et al. (2014) encontraram resultados superiores para compostos fenólicos totais das abelhas *M. fasciculata* e *M. scutellaris*, *M. fasciculata* Smith, *M. subnitida*, *M. fasciculata* respectivamente, contudo em todos os trabalhos citados anteriormente, os autores utilizaram extrato concentrado de geoprópolis, tornando o processo de obtenção do extrato uma etapa laboriosa com grande consumo de reagentes e energia.

Buratti, Benedetti e Cosio (2007) analisaram amostras de própolis de *Apis mellifera* e encontraram valores para composição fenólica variando de 2 a 181 mg 100 g<sup>-1</sup>, valores inferiores comparados ao presente estudo com geoprópolis de abelha sem ferrão.

As variações apresentadas entre as geoprópolis podem estar associadas a região geográfica da coleta do material pelas abelhas, fatores como origem botânica e clima podem influenciar tanto positivamente quanto negativamente.

Os compostos fenólicos totais das amostras de geoprópolis pode ser evidenciada quando comparado em literatura a diferentes produtos vegetais, assim como os cereais, legumes e frutas. A composição fenólica média das amostras MQS, MQF, MQI e MSI foi superior em relação aos cereais cevada ( $1640 \pm 4$  mg 100 g<sup>-1</sup>), trigo ( $1620 \pm 7$  mg 100 g<sup>-1</sup>) e centeio ( $1320 \pm 6$  mg 100 g<sup>-1</sup>) em equivalentes de ácido gálico avaliados por Đorđević, Šiler-Marinković e Dimitrijević-Branković (2010).

Serpen et al. (2008) ao analisarem a atividade antioxidante dos mesmos cereais citados anteriormente encontraram valores de  $803,43 \pm 35,04$  mg 100 g<sup>-1</sup>,  $445,51 \pm 52,56$  mg 100 g<sup>-1</sup> e  $580,67 \pm 92,60$  mg 100 g<sup>-1</sup> em equivalentes Trolox para cevada, trigo e centeio respectivamente, sendo os valores médios de atividade antioxidante encontrados para as amostras de geoprópolis MMI, MQS, MQF, MQI, MSS e MSI superiores.

Em leguminosas, utilizando metanol 70 % como solvente extrator, Xu e Chang (2007) determinaram os compostos fenólicos totais para ervilha verde, ervilha amarela, grão-de-bico, lentilha, soja amarela, soja preta e feijão preto onde obtiveram concentrações de  $131 \pm 2$  mg 100 g<sup>-1</sup>,  $141 \pm 4$  mg 100 g<sup>-1</sup>,  $168 \pm 4$  mg 100 g<sup>-1</sup>,  $251 \pm 6$  mg 100 g<sup>-1</sup>,  $231 \pm 3$  mg 100 g<sup>-1</sup>,  $373 \pm 7$  mg 100 g<sup>-1</sup> e  $331 \pm 10$  mg 100 g<sup>-1</sup> em equivalentes de ácido gálico respectivamente. Somente as amostras MSeS e MMS apresentaram sua concentração fenólica total média inferior as leguminosas relatadas, sendo assim, 8 amostras de

geoprópolis de abelha sem ferrão apresentaram concentração de compostos fenólicos totais superior em relação as leguminosas.

A atividade antioxidante em equivalentes de ácido ascórbico de algumas frutas tropicais como a pitaia ( $13,5 \pm 2,1$  mg 100 g<sup>-1</sup>), cajá ( $37,6 \pm 7,6$  mg 100 g<sup>-1</sup>), mangostão ( $32,3 \pm 10,3$  mg 100 g<sup>-1</sup>), mamão papaia ( $106 \pm 28$  mg 100 g<sup>-1</sup>), carambola ( $98 \pm 55$  mg 100 g<sup>-1</sup>), banana ( $27,8 \pm 5,5$  mg 100 g<sup>-1</sup>) e laranja ( $69 \pm 17$  mg 100 g<sup>-1</sup>) apresentam concentrações inferiores aos apresentados (Tabela 2.4) para geoprópolis de abelha sem ferrão. Somente a goiaba ( $218 \pm 79$  mg 100 g<sup>-1</sup>) apresentou atividade antioxidante superior em relação apenas a média da amostra MMS (LIM; LIM; TEE, 2007).

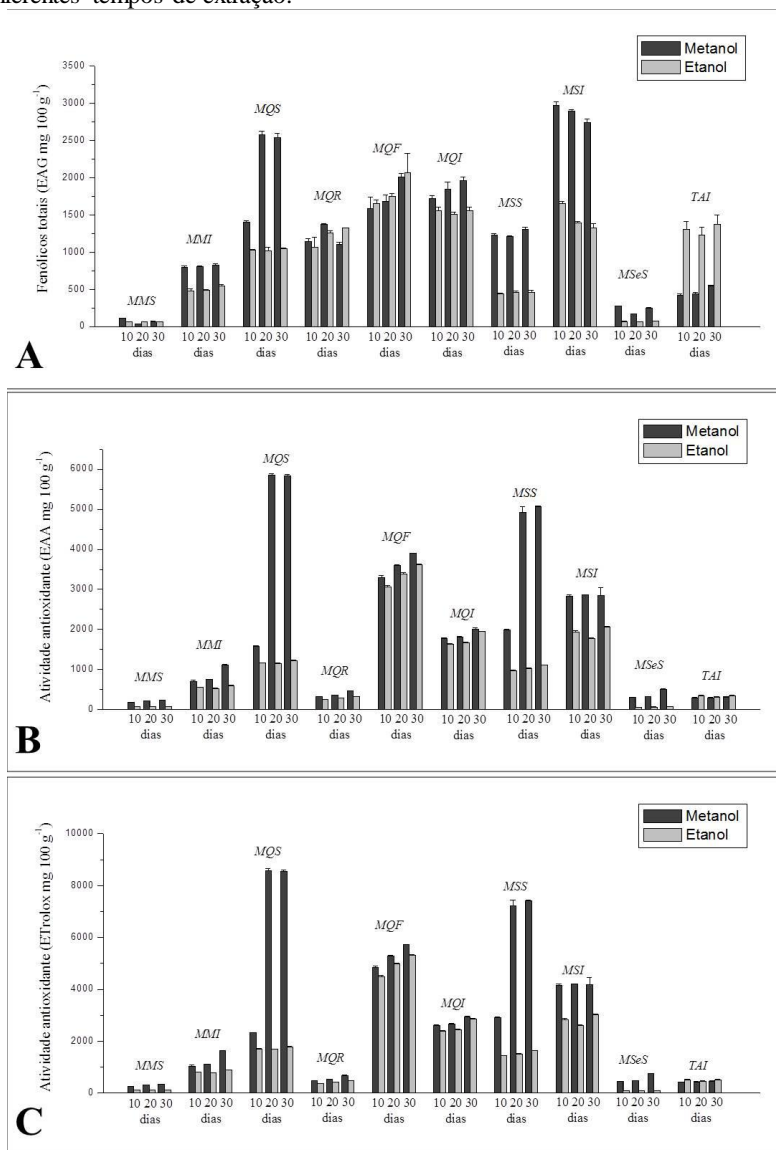
Tanto os compostos fenólicos totais como a atividade antioxidante das amostras de geoprópolis, mostram potencial frente a diversos produtos vegetais já descritos em literatura.

As amostras de geoprópolis foram submetidas também a extração com etanol, nas mesmas condições que a extração em metanol. Os resultados podem ser comparados a partir da Figura 6. As extrações com o solvente etanol não se mostraram eficientes, uma vez que as avaliações tanto dos compostos fenólicos totais quanto da atividade antioxidante principalmente mostraram-se muito inferiores na maioria das amostras de geoprópolis de abelha sem ferrão.

A extração com solvente metanol para a amostra de *MQS* foi no mínimo 58 % superior aos 30 dias de extração para compostos fenólicos totais e 79 % superior para atividade antioxidante (EAA), enquanto para *MSS* aos 30 dias de extração com metanol foi no mínimo 64% superior para composição fenólica e 78 % para atividade antioxidante (EAA) em relação a extração alcoólica e ainda para a amostra de *MSI* aos 30 dias de armazenamento a composição fenólica em solvente metanol apresentou-se 51 % superior ao solvente etanol assim como 27 % superior para a função antioxidante (EAA) em relação ao solvente de menor polaridade.

Somente as amostras *MQF* e *TAI* obtiveram resultados superiores em relação a composição fenólica empregando o etanol como agente extrator. Porém se considerar o valor do desvio padrão da amostra *MQF* é possível observar que as médias se sobrepõem entre si em ambos os solventes, não justificando diferença significativa.

**Figura 6** - Comparação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de geoprópolis de abelha sem ferrão diante dos solventes metanol e etanol nos diferentes tempos de extração.



(A) Avaliação da composição fenólica, (B) avaliação da atividade antioxidante (EAA), (C) Avaliação da atividade antioxidante (ETrolox). Fonte: próprio autor.

Mouhoubi-tafinine, Ouchemoukh e Tamendjari (2016), avaliaram a extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante em amostras de própolis utilizando diferentes solventes, água, etanol 50 % e 85 %, e metanol 50 %, onde concluíram que o melhor solvente extrator foi etanol.

É então possível sugerir que a solubilidade de compostos fenólicos está associada a polaridade do solvente utilizado nas extrações, assim como ao grau de polimerização dos fenólicos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

#### **4 CONCLUSÃO**

O rendimento dos extratos de geoprópolis difere entre as espécies de abelhas, contudo tempos longos de extração não promovem maior extração em relação a transferência de massa dos compostos solúveis para o solvente extrator. Os resultados obtidos para os teores de umidade nas amostras de geoprópolis submetidas a secagem, mostram similaridade entre as espécies de abelhas analisadas. Os resultados elevados para cinzas traduzem a própria característica de composição da matriz, a presença de solo, sendo um indicativo para a comprovação do produto. Em relação a extração dos compostos fenólicos e a avaliação da atividade antioxidante, os resultados mostraram-se satisfatórios quanto ao sistema de extração e a resposta encontrada. O solvente mais efetivo frente aos testados para a extração da composição fenólica foi o metanol mostrando ser superior; também em relação ao tempo de extração, aos 30 dias os resultados obtidos foram os melhores entre os avaliados. A amostra de geoprópolis da espécie MSI mostrou-se a mais rica em relação a composição fenólica e a amostra MQS apresentou a maior atividade antioxidante, evidenciando variações entre as espécies de abelhas avaliadas.

Diante do exposto, o estudo preliminar das geoprópolis foi fundamental no desenvolvimento do trabalho e entendimento sobre a matriz. Mais estudos com a matriz serão desenvolvidos nos próximos capítulos.

## **CAPÍTULO 3**

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E MINERAIS  
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM  
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona seminigra*, *Melipona mandaçaia*,  
*Melipona scutellaris*, *Melipona mondury* e *Tetragonisca angustula*.**



## RESUMO

Rico em minerais a geoprópolis de abelhas sem ferrão é utilizado pelas abelhas como matéria prima e apresenta evidencias em literatura de uma complexa composição química, contando com diferentes substâncias dentre elas os compostos fenólicos, associados ao potencial antioxidante e antibacteriano. Em contribuição para a literatura científica foram coletadas para estudo amostras de geoprópolis das espécies de abelha sem ferrão: *Melipona seminigra*, *Melipona mandaçaia*, *Melipona scutellaris*, *Melipona mondury* e *Tetragonisca angustula* provenientes de 4 regiões distintas do estado de Santa Catarina. Foram avaliados o perfil majoritário de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS, obtendo como resultados a identificação de 28 compostos fenólicos, entre livres e conjugados pós hidrólise ácida e alcalina das amostras, dentre eles ácidos fenólicos, cumarina, flavonoides e aldeídos fenólicos, sendo os mais frequentemente identificados estão entre as amostras: vanilina, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico. O perfil mineral majoritário de minerais foi avaliado por ICP-MS e quantificados 16 elementos, entre minerais essenciais e alguns metais potencialmente tóxicos, após análise quimiométrica por componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA), os resultados revelaram formação de grupos de características semelhantes de regionalização. A avaliação do potencial antibacteriano foi realizada frente as cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, o que revelou potencial das amostras MQS e MQF contra *S. aureus*. Por conseqüente, o estudo evidenciou características individuais nas amostras influenciados por flora local, clima e espécie de abelha .

**Palavras-chave:** Geoprópolis. Solo. Ácido gálico. Minerais essenciais. Potencial antimicrobiano.





## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão são responsáveis pela produção de diferentes produtos de interesse, assim como o mel, própolis, geoprópolis, cera entre outros. Geoprópolis é o nome atribuído ao produto fabricado pelas abelhas sem ferrão que diferentemente da própolis de *Apis Mellifera*, é constituído majoritariamente por solo, além de resinas vegetais e enzimas digestivas (CUNHA et al., 2009; FREITAS; VIT; BARTH, 2013; SILVA et al., 2013).

A espécie da abelha, a localização geográfica das colônias e a flora local são responsáveis pela composição química da geoprópolis, a qual é complexa, composta por ácidos graxos, açúcares, álcoois, esteroides e principalmente diversos compostos fenólicos, conferindo ao produto potencial antioxidante, utilizado a muito tempo na medicina popular (BARTOLOMEU et al., 2016; BATISTA et al., 2016; FRANCHIN et al., 2012; SILVA et al., 2013; VELIKOVA et al., 2000).

Os compostos fenólicos são substâncias encontradas em plantas, são produzidas em situação de estresse, como mecanismo de defesa. Esses compostos são classificados como metabólitos secundários, uma vez que não são produzidos diretamente para o desenvolvimento vegetal, não sendo encontrado em todos os estádios de desenvolvimento e nem em toda extensão da planta (DIAS et al., 2016; WANG et al., 2016).

Atualmente os compostos fenólicos tem despertado grande interesse por promover benefícios à saúde. Essa classe de substâncias pode ser utilizada como agente antimicrobiano, antialergênico, anti-inflamatório e principalmente agente antioxidante, empregados na produção de alimentos como agente antioxidante e antimicrobiano e como suplemento para formulação de produtos funcionais, e na indústria farmacêutica por apresentar benefícios à saúde tais como a proteção contra doenças degenerativas, neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes, entre outras (BALLESTEROS et al., 2017; RAFIEE et al., 2017).

Conhecidos como fitobióticos os compostos fenólicos são eficientes no trato de diversas doenças, sabe-se que o uso de substâncias naturais no tratamento de patologias é ainda empregado na medicina popular. Micro-organismos são responsáveis por causar graves infecções, sendo responsáveis pela terceira causa de mortalidade mundialmente (BILAL et al., 2017). O aumento da resistência microbiana tem impulsionado a pesquisa por novas fontes naturais com

potencial antimicrobiano, o que tem atraído a atenção de pesquisadores ao redor do mundo (BILAL et al., 2017).

É pela alimentação que o organismo humano adquire esses compostos fenólicos, estando presente largamente em alimentos de origem vegetal, como frutas, vegetais e seus derivados assim como sucos, geleias, mel, própolis e entre eles a geoprópolis (BILUCA, 2014; MUNEKATA et al., 2016).

A presença de compostos minerais é característica da geoprópolis, uma vez que a principal matéria prima para a fabricação do produto é o solo. Esses compostos inorgânicos são micronutrientes adquiridos essencialmente através da alimentação, atuando em diferentes processos bioquímicos no organismo humano. Dependendo da espécie mineral e sua concentração podem apresentar toxicidade, desencadeando doenças neurológicas, fisiológicas e em casos extremos, ocasionar a morte (FREITAS; VIT; BARTH, 2013; GONG et al., 2012; SALES et al., 2006).

Poucos estudos relatam a determinação de compostos com características bioativos e mineral na matriz de geoprópolis. Diante desse aspecto, os objetivos do estudo foram a identificação de compostos da classe dos fenólicos, assim como a avaliação da composição mineral e do potencial antimicrobiano de extratos de geoprópolis frente a micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 REAGENTE E EQUIPAMENTOS**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura por purificador Simplicity UV (Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Etanol e ácido ascórbico foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), ácido nítrico 65 % foi adquirido da Merck, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi adquirido da Biotec e sulfato de sódio adquirido da Êxodo Científica.

Metanol e padrões fenólicos (ácido 4-aminobenzóico, ácido salicílico, ácido cinâmico, ácido p-anísico, ácido mandélico, vanilina, ácido 4-hidroximetilbenzoico, protocatecuico, ácido p-cumárico, ácido metoxifenilacético, ácido vanílico, ácido gálico, umbeliferona, coniferaldeído, ácido cafeico, siringaldeído, escopoletina, ácido ferúlico, ácido siríngico, sinapaldeído, ácido sinápico, resveratrol, crisina, pinocembrina, apigenina, galangina, naringenina, campferol, eriodictiol,

aromadendrina, fustina, catequina, epicatequina, hispidulina, ácido elágico, quercetina, taxifolina, miricetina, carnosol, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, isoquercitrina, naringina, epigallocatequina, epicatequina galato e rutina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça).

Solução padrão multielementar (PerkinElmer, Inc.) contendo Ag, Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Ni, Pb, Se, V e Zn foi utilizada para as determinações minerais. Como material de referência foi utilizado Sandy Clay 1 CRM049 Sigma-Aldrich Co. (Laramie, WY, EUA)

Para a avaliação antimicrobiana, o solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), ágar Mueller Hinton e caldo Brain Heart Infusion (BHI) (TM MEDIA), para cultivo foram usadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC: 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923) e *Salmonella typhimurium* (ATCC: 14028). O antibiótico ciprofloxacina (EMS S/A) foi utilizado como controle positivo.

Os principais instrumentos utilizados para as análises foram: balança analítica AB204-S (Mettler Toledo), estufa SP-400 (SPlabor), estufa EL 202/3 (Eletrolab), centrífuga Fanem 280R e MiniSpin plus (Eppendorff), agitador magnético (Fisatom 752A São Paulo, Brasil), rotaevaporador (Fisatom 802, São Paulo, Brasil), banho de ultrassom (Unique 1400A), bloco digestor EasyDigest® (Analab, Wantzenau, França), tubos de digestão em teflon (Savillex, EUA), purificador de ácido (DST 1000, Savillex, Minnesota, EUA), cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha) com detector de espectrômetro de massas Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada) e espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) modelo 7900 (Agilent Technologies).

## 2.2 AMOSTRAGEM

Dez amostras de geoprópolis provenientes de meliponários do estado de Santa Catarina e produzido por diferentes espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona mondury*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona seminigra* e *Tetragonisca Angustula* foram coletadas no momento da abertura das colônias para retirada dos méis, não danificando as colônias. As amostras foram provenientes das cidades de Santa Rosa de Lima (latitude 28°02'21" sul, longitude 49° 7'

40" oeste e 240 m de altitude), Rio do Sul (latitude 27°12'51" sul, longitude 49° 38' 35" oeste e 339,88 m de altitude), Iporã do Oeste (latitude 26° 98' 8" sul, longitude 53° 53' 5" oeste e 557 m de altitude) e Florianópolis (latitude 27° 35' 48" sul, longitude 48° 32' 57" oeste e 3 m de altitude) durante os anos de 2016 e 2017 (Tabela 10).

**Tabela 10** - Relação das amostras de geoprópolis, espécies de abelhas e locais de coleta.

<b>Código</b>	<b>Espécie da abelha sem ferrão</b>	<b>Local de coleta</b>
MMS	<i>M. mondury</i>	Santa Rosa de Lima
MMI	<i>M. mondury</i>	Iporã do Oeste
MQS	<i>M. quadrifasciata</i>	Santa Rosa de Lima
MQR	<i>M. quadrifasciata</i>	Rio do Sul
MQF	<i>M. quadrifasciata</i>	Florianópolis
MQI	<i>M. quadrifasciata</i>	Iporã do Oeste
MSS	<i>M. scutellaris</i>	Santa Rosa de Lima
MSI	<i>M. scutellaris</i>	Iporã do Oeste
MSeS	<i>M. seminigra</i>	Santa Rosa de Lima
TAI	<i>Tetragonisca angustula</i>	Iporã do Oeste

Fonte: próprio autor

Após a coleta, as amostras foram identificadas e transportadas ao Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram previamente secas em estufa  $30 \pm 2$  °C por 12 h, trituradas e armazenadas em baixa temperatura (-18 °C).

### 2.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL MAJORITÁRIO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Para a determinação dos compostos fenólicos das amostras de geoprópolis, três métodos de extração foram empregados para identificar o conteúdo de compostos fenólicos livres e conjugados a outros constituintes químicos na matriz.

Primeiramente, os compostos fenólicos livres foram extraídos utilizando infusão sólido-líquido, onde massas de 10 g de geoprópolis foram medidas e adicionados de 50 mL de solvente metanol. A solução foi mantida em banho ultrassom durante 30 minutos, seguido de agitação mecânica por mais 30 minutos. A solução resultante foi filtrada para remoção das partículas inorgânicas (solo) e concentrada sob pressão reduzida em rotaevaporador, em seguida reconstituída em 10 mL de metanol 30 % v/v.

Para a avaliação dos compostos fenólicos conjugados, procedimentos de hidrólise ácida e alcalina foram empregados. Para a hidrólise ácida, massas de 2 g de geoprópolis foram transferidas para tubos de polipropileno, em seguida adicionadas de 5 mL de ácido clorídrico ( $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 5 mL de metanol. Os tubos foram hermeticamente fechados e mantidos a  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos em estufa. O pH da solução foi ajustado para 2, adicionando 4 mL de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Em seguida, para a partição, 10 mL de éter etílico foram adicionados e após extração o sobrenadante foi retirado e filtrado sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e repetido o processo por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida até total evaporação do solvente e então reconstituídos em 1 mL de metanol 30 % v/v (SCHULZ et al., 2015).

Para a hidrólise alcalina, massas de 2 g de geoprópolis foram adicionadas a tubos de polipropileno, em seguida, 10 mL de  $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA e 1 % de ácido ascórbico foram adicionados. A extração foi conduzida a uma temperatura de  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, sendo o pH ajustado para 3 com  $\text{HCl } 4 \text{ mol L}^{-1}$  e particionada três vezes com 10 mL de éter etílico. Os sobrenadantes foram retirados, combinados, filtrados sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida à  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  até total evaporação do solvente. O extrato foi reconstituído em 1 mL de metanol 30 % v/v (NARDINI et al., 2002).

Os extratos de geoprópolis em metanol foram analisados em sistema de cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadrupolo e *ion trap* linear, utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIonSpray™ (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada) em modo negativo. Para a aquisição e tratamento dos dados foi utilizado o *software Analyst* versão 1.5.1.

Para a separação cromatográfica, utilizou-se coluna Synergi™ (4.0  $\mu\text{m}$ , 2.0 x 150 mm d.i.; Phenomenex, USA) a  $30^\circ\text{C}$  e coluna de guarda SecurityGuard Cartridges Polar-RP (4 x 2.0 mm, Phenomenex,

USA). A fase móvel constitui-se de gradiente de metanol 95% (A) e água com ácido fórmico 5% (B), iniciando em 0-5 min, 10% A; 5-7 min, 90% A, 7-10 min, 90% A e 10-17 min, 10% A. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$  a um fluxo de 250  $\mu\text{l min}^{-1}$ . Para o monitoramento dos compostos foi utilizado o monitoramento de reações múltiplas (MRM), e a identificação foi baseada no tempo de retenção dos padrões em relação a amostra (SCHULZ et al., 2015).

## 2.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL MAJORITÁRIO DE ELEMENTOS MINERAIS

As amostras de geoprópolis foram submetidas a digestão úmida por via ácida baseada no método US EPA 3051A (USEPA, 2007). 150 mg geoprópolis foram transferidas para tubos em teflon e adicionados 5 mL de ácido nítrico sub-distilado, logo após os tubos foram fechados. A mistura foi digerida em bloco digestor por 15 minutos a 175 °C e em seguida resfriada até atingir temperatura ambiente. As amostras digeridas foram avolumadas para um volume de 50 mL (SEGURA et al., 2016).

Para a avaliação da metodologia de digestão, uma amostra de material de referência Sandy Clay 1 e uma amostra de branco (sem adição de geoprópolis) foram preparadas juntamente com as amostras de geoprópolis, sendo realizado a determinação mineral paralelamente.

Para a quantificação dos minerais das amostras de geoprópolis, concomitantemente uma curva de calibração externa com os minerais de interesse nas concentrações de 1, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi utilizada.

Todos os tubos e vidrarias utilizados no experimento foram limpos em banho ácido (15% v/v  $\text{HNO}_3$ ) por 24 horas.

As determinações dos minerais foram realizadas por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) seguindo as condições operacionais descritas na Tabela 11.

**Tabela 11** - Condições experimentais para determinação de compostos minerais em ICP-MS.

<b>Condições do plasma</b>	Potência de radiofrequência (W)	1550
	Amostragem da tocha (mm)	10
	Vazão do gás de nebulização (L/min)	1,01
	Velocidade da bomba peristáltica (rps)	0,1
	Temperatura da câmara de nebulização (°C)	2
Modo "Helium"		
<b>Condições da célula de colisão</b>	Fluxo de Hélio (mL/min)	5
	Energia de discriminação (V)	5
	Elementos: Na, Mg, Al, Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag e Pb	
	Modo "High Energy Helium"	
	Fluxo de Hélio (mL/min)	10
Energia de discriminação (V)	7	
	Elementos: Cd, Se, Fe, Cr, V, Ca, K	

Fonte: Próprio autor

Para eliminar possíveis interferências poliatômicas, dois modos de condição da célula de colisão foram utilizados “*Helium*” e “*High Energy Helium*” (NEVES, 2010). Os dados obtidos foram otimizados estatisticamente e os resultados permaneceram de acordo com parâmetros estatísticos de coeficiente de variação e ainda de acordo com o material de referência utilizado nos ensaios a uma faixa de recuperação entre 84 % a 113 %.

## 2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As amostras de geoprópolis foram submetidas à extração com solvente metanol. Para tanto, 1 g de amostra foi extraída em 5 mL de solvente por infusão, consistindo em banho de ultrassom durante 30 minutos e refrigeração ( $5 \pm 2$  °C) durante 24h, logo após, novamente sonicadas por mais 30 minutos, centrifugadas e o sobrenadante concentrado em evaporador rotativo até completa volatilização do solvente. O concentrado foi reconstituído com 5 mL de dimetilsulfóxido

(DMSO), filtrado em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  e avaliado o potencial antimicrobiano conforme descrito abaixo.

Placas de ágar Mueller Hinton contendo células viáveis dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* na concentração de  $10^5$  UFC/mL cultivadas em caldo BHI foram utilizadas para a determinação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar utilizando a técnica de poços (DIMKIĆ et al., 2016).

As placas contendo o ágar Mueller Hinton foram perfuradas formando poços de 6 a 8 mm de diâmetro, 30  $\mu\text{L}$  do extrato de geoprópolis foi dispensado em diferentes concentrações (200 e 150  $\text{mg mL}^{-1}$ ) acompanhado de controle negativo (DMSO) e positivo (ciprofloxacina 0,05  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e então incubadas a 37°C por 24h. Foram consideradas amostras com atividade antimicrobiana positiva quando observada a formação de halo ao redor dos poços contendo o extrato de geoprópolis. O experimento foi realizado em duplicata (DIMKIĆ et al., 2016).

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E PARAMETROS DE MÉRITO

Todas as análises foram conduzidas em triplicata, e os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Análises de branco foram conduzidas paralelamente como controle dos métodos. Os softwares Paleontological Statistics e SASM-Agri foram utilizados para o tratamento de dados.

Os limites de detecção adotados para a identificação de compostos fenólicos foram baseados nas áreas maiores ou iguais a três vezes o sinal ruído para as análises em LC-ESI-MS/MS. Os limites de detecção e quantificação para as análises em ICP-MS foram automaticamente calculados pelo equipamento.

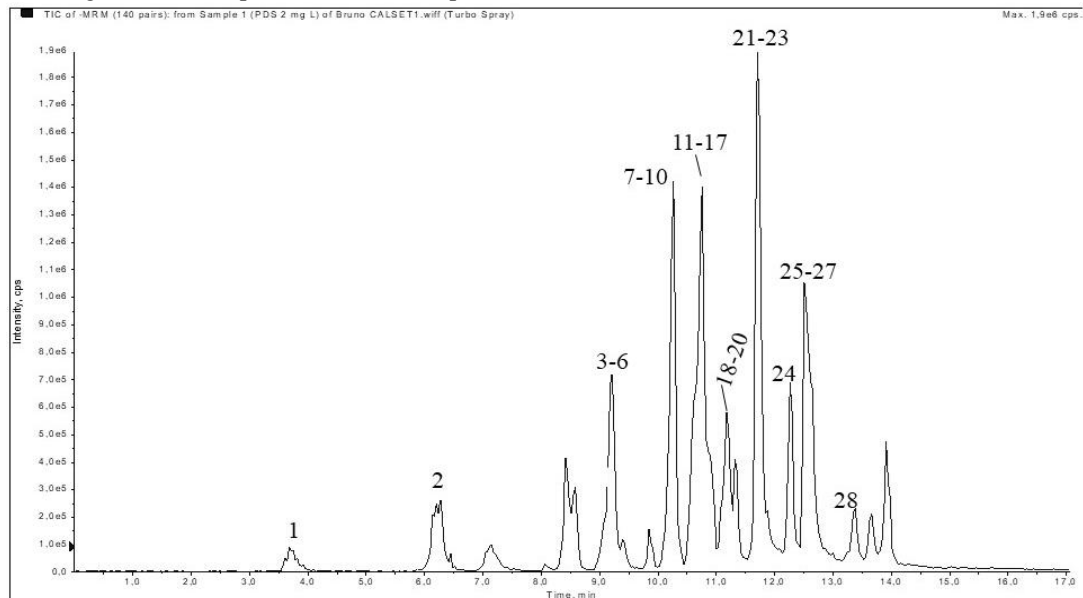
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A partir do tratamento das amostras, 28 compostos fenólicos foram identificados conforme seu tempo de retenção, sendo 13 da classe de ácidos fenólicos: 4-aminobenzóico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido rosmarínico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido vanílico e protocatecuico; 10 flavonoides: apigenina, aromadendrina,



eriodictiol, galangina, hispidulina, naringerina, pinocembrina, quercetina, rutina e taxifolina; 4 aldeído fenólico: coniferaldeído, sinapaldeído, siringaldeído e vanilina; e 1 cumarina: escopoletina (Figura 7).

**Figura 7 - Cromatograma dos compostos identificados por LC-ESI-MS/MS.**

Ácido Gálico (1), ácido protocatecuico (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), ácido vanílico (5), ácido siríngico (6), 4-aminobenzóico (7), vanilina (8), ácido *p*-cumárico (9), taxifolina (10), ácido ferúlico (11), rutina (12), siringaldeído (13), ácido rosmarínico (14), ácido salicílico (15), ácido sinápico (16), escopoletina (17), aromadendrina (18), coniferaldeído (19), sinapaldeído (20), ácido cinâmico (21), eriodictiol (22), quercetina (23), naringerina (24), apigenina (25), galangina (26), hispidulina (27) e pinocembrina (28). \*MRM dos compostos disponível em: APÊNCICE B. Fonte: próprio autor

Dos compostos identificados por LC-ESI-MS/MS, 10 deles já foram relatados para a matriz em literatura utilizando diferentes técnicas analíticas. Batista et al. (2016) relatam a identificação de ácido protocatecuico e ácido gálico em amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata*, assim como Cardozo et al. (2015) identificaram vanilina, ácido *p*-cumárico e ácido cafeíco em geoprópolis provenientes do município de Prudentópolis, PR. Dutra et al. (2014) relataram ácido gálico em seus estudos com amostras de geoprópolis *Melipona fasciculata* Smith, provenientes do nordeste brasileiro.

Considerando os compostos identificados e não relatados em literatura para a matriz geoprópolis até o momento desta publicação, temos 8 ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido siríngico, 4-aminobenzóico, ácido ferúlico, ácido rosmarínico, ácido sinápico e ácido cinâmico), 3 aldeídos fenólicos (siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído), 6 flavonoides (taxifolina, eriodictiol, apigenina, galangina, hispidulina e pinocembrina) e 1 cumarina (escopoletina).

Os compostos identificados nas amostras de geoprópolis de abelha sem ferrão neste estudo podem ser observados na Tabela 12. Ao analisar os compostos fenólicos livres, a amostra MMI foi a que apresentou maior quantidade de compostos identificados (17 ao total), em contrapartida as amostras MSS e MSeS ambas apresentaram apenas 9 compostos (Figura 10). O composto escopoletina não foi encontrado dentre as amostras quando analisados os fenólicos livres, os compostos taxifolina e galangina somente foram encontrados nas amostras MSI, o mesmo caso aconteceu com os compostos rutina, eriodictiol e ácido clorogênico que só foram encontrados na amostra produzida por *Tetragonisca angustula* proveniente da mesma região que a amostra citada anteriormente, indicando que as abelhas produtoras de geoprópolis apresentam características individuais distintas para o recolhimento da matéria prima para a fabricação da geoprópolis, mesmo colônias de uma mesma região de coleta.

A maioria dos compostos fenólicos naturais estão distribuídos nas formas livre e conjugados, frequentemente cerca de 24 % do total de polifenóis em uma amostra estão sob a forma conjugada. Os compostos fenólicos conjugados em sua forma insolúvel são unidos por ligações covalentes com a parede celular de compostos como celulose, hemicelulose, ligninas, pectinas, entre outros, essas ligações são importantes para a proteção física e química dos compostos fenólicos. Alguns ácidos fenólicos apresentam-se ligados a ligninas através de ligação éter de seu grupo hidroxila do anel aromático e também

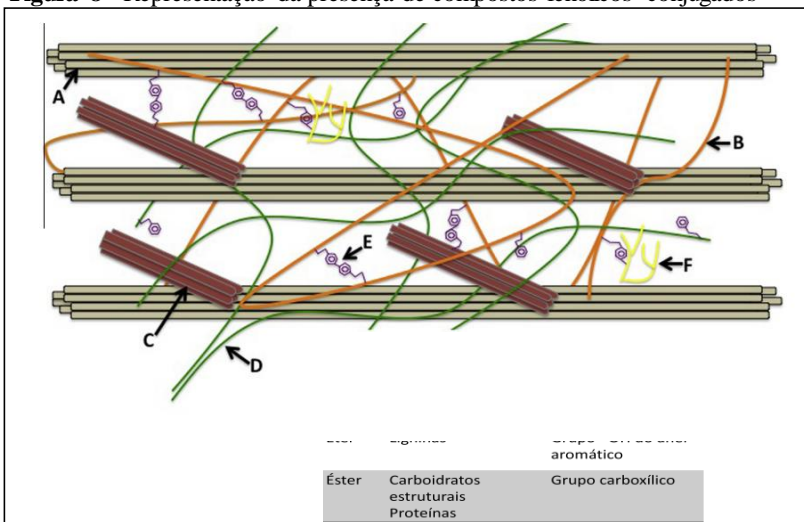
conjugados em ligações éster com carboidratos e proteínas através do grupo carboxílico (Figura 8) (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014; NARDINI et al., 2002).

**Tabela 12** – Compostos fenólicos identificados nas amostras de geoprópolis de abelhas sem ferrão.

Compostos:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
<b>Fenólicos Livres</b>	MMS	x	x			x	x	x					x		x	x					x	x	x	x			x		x	
	MMI	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x						x	x			x	x		x	
	MQS	x	x			x	x	x	x						x	x							x						x	
	MQR		x			x	x	x	x						x	x						x	x						x	
	MQF		x			x	x	x							x	x						x	x	x					x	
	MQI	x		x		x				x	x	x				x				x							x	x	x	
	MSS		x			x	x	x								x								x			x	x		x
	MSI					x	x	x						x	x	x			x			x	x					x	x	
	MSeS		x			x	x	x							x	x						x	x							x
	TAI		x	x	x		x							x				x			x			x	x	x				
<b>Hidrólise Ácida</b>	MMS	x		x		x		x					x	x									x				x		x	
	MMI	x		x		x		x				x	x		x	x		x									x		x	
	MQS	x	x	x		x	x	x					x	x	x								x					x	x	
	MQR	x				x		x		x			x	x	x							x	x						x	
	MQF	x	x	x		x	x	x		x			x	x	x							x	x	x					x	
	MQI	x		x		x		x				x	x			x											x		x	
	MSS		x			x	x	x						x				x						x					x	
	MSI	x		x		x		x					x	x	x	x			x										x	
	MSeS	x		x		x		x					x	x	x								x							x
	TAI		x	x	x	x	x	x		x					x			x	x	x	x	x	x	x						x
<b>Hidrólise Alcalina</b>	MMS	x	x	x		x	x	x					x		x	x			x		x	x	x	x					x	
	MMI	x	x	x		x	x	x		x	x	x	x		x	x							x	x			x	x	x	x
	MQS	x	x	x		x		x		x					x	x						x	x						x	
	MQR	x	x			x	x	x		x			x		x	x						x	x	x				x	x	
	MQF		x	x		x	x	x		x					x								x	x					x	
	MQI	x		x		x		x		x		x				x				x							x	x		x
	MSS					x		x		x					x	x							x						x	
	MSI			x		x		x		x					x						x						x			x
	MSeS	x	x	x		x	x	x				x	x		x	x						x	x	x					x	x
	TAI					x				x				x	x			x	x	x	x	x	x							x

4-aminobenzóico (1), ácido cafeico (2), ácido cinâmico (3), ácido clorogênico (4), ácido ferúlico (5), ácido gálico (6), ácido p-cumárico (7), ácido rosmarínico (8), ácido salicílico (9), ácido sinápico (10), ácido síringico (11), ácido vanílico (12), apigenina (13), aromadendrina (14), coniferaldeído (15), eriodictiol (16), escopoletina (17), galangina (18), hispidulina (19), naringerina (20), pinocembrina (21), protocatecuico (22), quercetina (23), rutina (24), sinapaldeído (25), siringaldeído (26), taxifolina (27), vanilina (28). Fonte: próprio autor

**Figura 8** - Representação da presença de compostos fenólicos conjugados



(A): celulose, (B): hemicelulose, (C) proteínas estruturais, (D) pectinas, (E) ácidos fenólicos (F) ligninas. Fonte: Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe e Serna-Saldívar, (2014)

Já foi descrito em literatura que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos conjugados é significativamente maior em relação aos compostos livres ou em sua forma solúvel (LIU et al., 2017). Buscando avaliar a disposição destes compostos na matriz, diferentes técnicas de hidrólise de compostos fenólicos tem sido empregadas atualmente, assim como o uso de enzimas, digestão por micro-ondas ou ultrassom e de agentes ácidos e alcalinos (WANG et al., 2015; XU et al., 2017).

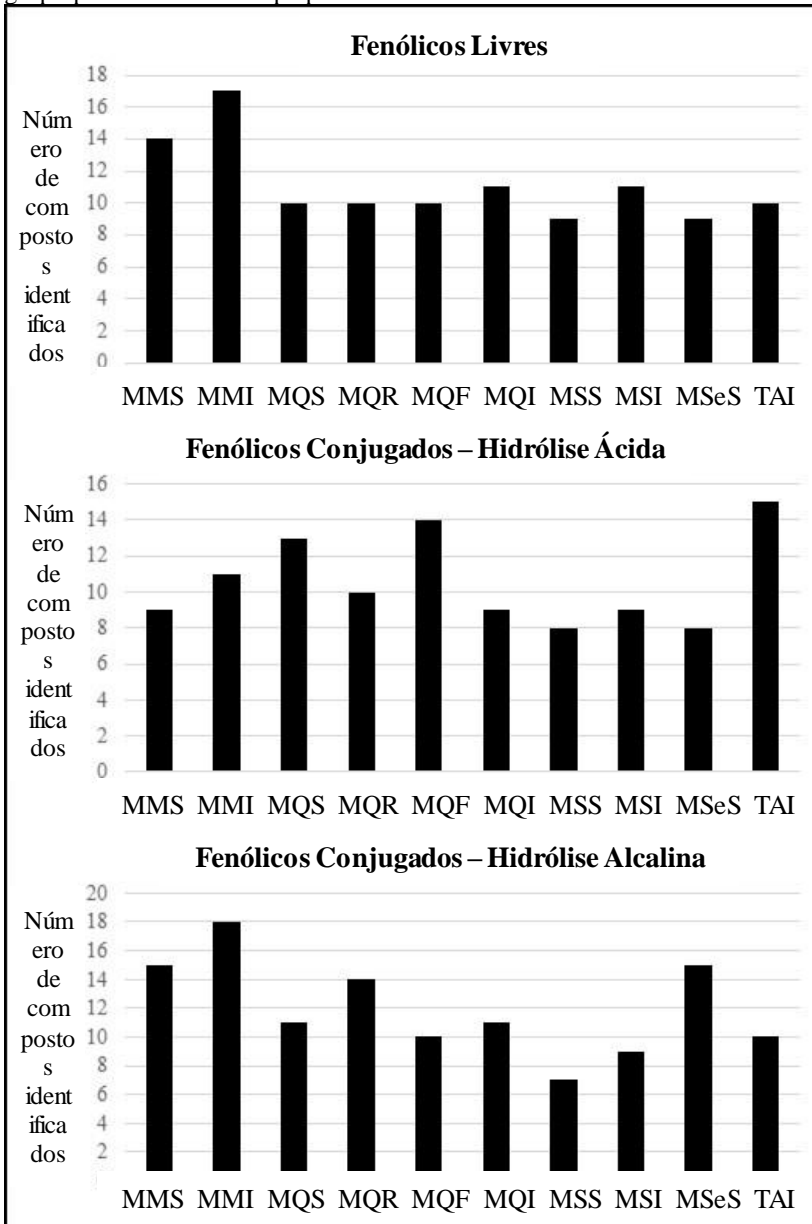
Nesse aspecto foram conduzidas hidrólise ácida e hidrólise alcalina nas amostras de geoprópolis e os resultados nos mostram que ao analisar os compostos fenólicos conjugados após hidrólise ácida, foi possível observar que sinaldeído (presente anteriormente em: MMI, MQI e MSS), rutina (presente anteriormente em: TAI), quercetina (presente anteriormente em: TAI e MMS), ácido sinápico (presente anteriormente em: MMI e MQI) e ácido rosmarínico (presente anteriormente em: MMI, MQS e MQR) antes presentes, não permaneceram nas amostras de geoprópolis. A quantidade de ácido adicionada para o preparo das amostras ocasionou a hidrólise de compostos fenólicos mais sensíveis (XU et al., 2017). A amostra MMI que apresentou 17 compostos fenólicos livres identificados, após a

hidrólise ácida apresentou 11, diminuindo cerca de 35% dos compostos identificados anteriormente (Figura 10).

Durante os procedimentos de hidrólise ácida e alcalina, os compostos fenólicos livres identificados primeiramente nas amostras podem ter sido degradados, ou convertidos a compostos secundários, assim como os procedimentos de hidrólise podem ter liberado compostos anteriormente conjugados. O composto 4-aminobenzóico após hidrólise ácida foi liberado para as amostras MQR, MQF, MSI e MSeS, assim como após a hidrólise alcalina, este composto foi liberado para as amostras MQR e MSeS. O ácido cafeico após hidrólise ácida foi degradado e não esteve presente nas amostras MMS, MQR e MSeS, e após hidrólise alcalina não foi detectado nas amostras MSS e TAI, porém foi liberado na amostra MMI. O cinamaldeído quando sofre oxidação se reduz a ácido cinâmico (SUN et al., 2018), razão possível pela qual este composto foi identificado após hidrólise ácida nas amostras MMS, MQS, MQF, MSI e MSeS, e após hidrólise alcalina nas amostras MMS, MQS, MQF, MSI e MSeS. O ácido gálico é um composto que após hidrólise ácida foi inativado possivelmente pela temperatura utilizada no procedimento de hidrólise, as amostras MMS, MMI, MQR, MSI e MSeS não apresentaram o composto após a hidrólise, assim como após o procedimento utilizando um álcali o composto foi degradado nas amostras MQS, MSS, MSI, e TAI, o ácido gálico é instável a altas temperaturas, em presença de oxigênio e luz (DA ROSA et al., 2013), condições que podem ter afetado sua estabilidade durante os procedimento de investigação de compostos fenólicos conjugados.

O ácido rosmarínico que foi inicialmente identificado nas amostras MMI, MQS e MQR se degradou após ambos os procedimentos de hidrólise. Após a hidrólise alcalina o ácido siríngico foi liberado na amostra MSeS, e ao contrário ocorreu com o composto apigenina que foi degradado após hidrólise alcalina na amostra MSI. Para o fenólico naringerina após a hidrólise alcalina, foi liberado e fez parte da composição das amostras MQS, MSS e TAI, assim como aconteceu com o composto taxifolina, que após hidrólise alcalina foi liberado para as amostras MMI, MQR e MSeS.

**Figura 9** - Número de compostos fenólicos identificados em amostras de geoprópolis em diferentes preparos de amostra



Fonte: próprio autor



A hidrólise alcalina foi conduzida de maneira em que a adição do EDTA e ácido ascórbico no preparo das amostras tivesse como objetivo a preservação dos compostos fenólicos que naturalmente tendem a se oxidar. Diante disso, ao analisar os resultados dos compostos fenólicos identificados após hidrólise alcalina, em pelo menos metade das amostras, o número de compostos identificados aumentou em relação aos compostos fenólicos livres identificados primeiramente. É importante destacar que a hidrólise alcalina quebra as ligações éster que ligam os compostos fenólicos a parede celular dos polissacarídeos, liberando-os, ao contrário da hidrólise ácida que geralmente deixa essas ligações intactas. Kim et al. (2006) destacaram que a hidrólise alcalina é superior à hidrólise ácida para a liberação de ácidos fenólicos (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Após hidrólise alcalina, vanilina e o ácido ferúlico estiveram presentes em todas as amostras analisadas, assim como a amostra MMI a apresentar a maior quantidade de compostos identificados totalizando 18, entretanto somente 7 compostos fenólicos foram identificados na amostra MSS (Figura 10). Os polifenóis rutina, escopoletina, ácido rosmarínico e ácido clorogênico não foram identificados nas amostras após hidrólise alcalina.

Os compostos com maiores frequências entre as análises foram vanilina e ácido ferúlico identificados após hidrólise alcalina, além dos citados também foi identificado ácido gálico após análise dos fenólicos livre e para a hidrólise ácida, além dos compostos citados anteriormente o ácido p-cumárico também foi frequentemente identificado entre as amostras.

A vanilina é um produto utilizado principalmente em indústrias de alimentos e bebidas por seu aroma e sabor de baunilha e por sua propriedade de preservação, é um composto fenólico reconhecido como seguro para o uso em diversos produtos e apresenta propriedades biológicas como o potencial antioxidante, anticarcinogênico, antimutagênico e antimicrobiano (HUNDRE; KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015; MONTES et al., 2017; PRIEFERT; RABENHORST; STEINBÜCHEL, 2001). Além disso, pesquisa realizada em ratos por Srinivasan, Platel e Rao (2008) indicam que um consumo diário de vanilina produz um efeito redutor de gorduras, principalmente da fração LDL, reduzindo o peso e diminuindo o acúmulo de gordura no tecido adiposo.

O ácido gálico é um composto polifenólico frequentemente empregado na indústria farmacêutica por apresentar efeito antialérgico,

anti-inflamatório e anticarcinogênico. Como composto bioativo, o ácido gálico atua como antioxidante inibindo os efeitos adversos dos radicais livres no organismo. Na indústria de alimentos o ácido gálico é utilizado na produção de sucos por ser um composto atóxico sendo então seguro e não existindo um limite estabelecido de uso, além disso, a absorção desse composto no organismo humano ocorre de maneira mais efetiva em relação a outros compostos fenólicos, e ainda seu gosto ligeiramente adocicado agrada ao paladar (ARABI; GHAEDI; OSTOVAN, 2017; ROIDOUNG; DOLAN; SIDDIQ, 2016).

O ácido ferúlico é um ácido fenólico encontrado abundantemente em frutas e vegetais, apresenta propriedade antioxidante benéfica ao organismo humano. É um composto utilizado na tradicional medicina chinesa, tem sido associado no tratamento de doenças como o Alzheimer, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças dermatológicas. O uso como aditivo em alimentos promove a manutenção da coloração natural de vegetais como ervilhas e em alimentos de origem animal como em peixes prevenindo a foto-oxidação da luteína e astaxantina (KARUNARATNE; ZHU, 2016; PALANI SWAMY; GOVINDASWAMY, 2015; SONG et al., 2014).

Caracterizado por ser um composto fenólico natural o ácido p-cumárico é amplamente distribuído em produtos vegetais e está presente na alimentação diária. O composto polifenólico é associado com a redução do risco de câncer de estômago, reduz os níveis de colesterol, previne doenças cardiovasculares, e ainda apresenta potencial antimicrobiano (ROY; STANELY MAINZEN PRINCE, 2013). Em pesquisa recente Xu e An (2016) estudaram o efeito inibidor da acrilamida utilizando o ácido p-cumárico e encontraram resultados satisfatórios sendo capaz de inibir 66,2 % do composto tóxico em batatas fritas.

Os estudos realizados por Araújo et al. (2016), Batista et al. (2016), Cardozo et al. (2015) e Dutra et al. (2014) em geoprópolis de abelha sem ferrão, também buscaram a identificação desses compostos bioativos, com o objetivo de estabelecer um perfil de compostos fenólicos nas amostras. Araújo et al. (2016) ao analisarem geoprópolis de duas espécies de abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris* e *Melipona fasciculata* provenientes do estado de Tocantins, encontraram 9 compostos fenólicos, dentre eles kaempferol, morina e rutina. Batista et al. (2016) ao analisarem geoprópolis de *Melipona fasciculata* identificaram a presença de 5 ácidos graxos, 3 ácidos orgânicos, 9 açúcares, 6 álcoois, 5 triterpenos, 2 esteroides e apenas 3 compostos fenólicos (ácido protocatecuico, ácido gálico e ácido elágico). Cardozo

et al. (2015) estudaram os compostos presentes em geoprópolis das abelhas *T. angustula* (Jataí), *M. quadrifasciata* (Mandaçaia) e *M. marginata* (Mandurí) encontrando 12 compostos fenólicos, e sugerindo que abelhas de uma mesma região compartilhem resinas de uma mesma fonte vegetal para a fabricação da geoprópolis. Dutra et al. (2014) ao analisarem geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, provenientes do estado de Maranhão, encontraram 11 compostos fenólicos destacando o produto como uma fonte rica de compostos bioativos com potencial benéfico a saúde.

Portanto, o estudo de compostos bioativos em fontes naturais é extremamente importante principalmente na busca por novos compostos que atuem em benefício a saúde humana. Compostos bioativos identificados na matriz de geoprópolis são consequência da origem botânica que as abelhas sem ferrão visitam e transferem para sua secreção enzimática, material o qual faz parte da formulação da geoprópolis.

### 3.2 ANÁLISE DE ELEMENTOS MINERAIS MAJORITÁRIOS

Os minerais são compostos inorgânicos que desempenham funções biológicas fundamentais no organismo humano, e dependendo de suas características e concentração podem apresentar caráter tóxico (GONG et al., 2012).

A composição mineral elevada é característica da geoprópolis, uma vez que o solo é a principal matéria prima utilizada pelas abelhas para a fabricação do produto. O conteúdo mineral das amostras de geoprópolis analisadas está disposto na Tabela 13.

**Tabela 13 -** Conteúdo mineral das amostras de geoprópolis, mg kg<sup>-1</sup> (média ± desvio padrão, n=3).

	Recuperação (%)	MMS	MMI	MQS	MQR	MQF	MQI	MSS	MSI	MSeS	TAI
<sup>107</sup> Ag	84	0,31±0,10	0,23 ± 0,05	0,33 ± 0,16	0,14 ± 0,04	0,32 ± 0,08	0,23 ± 0,04	2,32 ± 3,24	0,44 ± 0,19	0,53 ± 0,22	0,13 ± 0,09
<sup>27</sup> Al	95	13113,02 ± 2126,32	21653,59 ± 900,62	16609,61 ± 1788,63	9705,63 ± 2276,47	7571,02 ± 1968,96	25018,75 ± 86,16	12701,53 ± 2162,54	24011,67 ± 984,14	16535,30 ± 6829,70	655,67 ± 102,93
<sup>75</sup> As	98	2,82 ± 0,93	2,71 ± 0,08	2,27 ± 0,14	2,81 ± 0,10	1,29 ± 0,29	3,01 ± 0,21	2,50 ± 1,33	2,40 ± 0,11	2,08 ± 0,44	0,09 ± 0,01
<sup>111</sup> Cd	98	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,37 ± 0,30	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,00
<sup>59</sup> Co	95	4,27 ± 2,61	37,03 ± 3,06	6,09 ± 2,20	5,89 ± 1,16	1,26 ± 0,11	39,75 ± 1,39	2,29 ± 1,57	45,86 ± 1,21	18,36 ± 24,90	0,69 ± 0,19
<sup>52</sup> Cr	88	23,89 ± 4,55	53,47 ± 5,51	26,31 ± 4,92	11,12 ± 1,18	3,43 ± 0,52	52,55 ± 3,17	24,60 ± 6,10	48,89 ± 1,35	36,04 ± 9,98	0,85 ± 0,25
<sup>63</sup> Cu	95	8,03 ± 1,82	174,98 ± 10,02	9 ± 0,21	16,56 ± 2,11	7,03 ± 0,29	157,72 ± 4,27	6,49 ± 0,82	167,24 ± 1,27	60,74 ± 91,45	6,44 ± 1,61
<sup>56</sup> Fe	98	15095,67 ± 3505,80	82524,41 ± 3318,06	18565,24 ± 1752,70	22065,20 ± 3199,41	6500,24 ± 529,23	78715,56 ± 2940,35	13108,03 ± 2712,16	73849,09 ± 447,77	35725,95 ± 2625,44	1315,75 ± 402,96
<sup>39</sup> K	97	1972,94 ± 442,44	1597,26 ± 68,39	1620,03 ± 554,92	957,09 ± 171,93	555,02 ± 102,07	1276,45 ± 65,60	1451,45 ± 314,22	1199,12 ± 35,75	1179,99 ± 51,45	2268,51 ± 236,42
<sup>24</sup> Mg	104	829,49 ± 278,93	2061,49 ± 47,23	811,54 ± 167,95	483,78 ± 105,34	401,27 ± 38,03	1278,64 ± 19,53	599,33 ± 94,42	2371,75 ± 104,94	1247,58 ± 899,58	1103,40 ± 63,14
<sup>23</sup> Na	96	3364,25 ± 3,52	48,23 ± 4,46	3395,43 ± 52,33	3305,28 ± 52,87	34,83 ± 15,09	3331,71 ± 107,79	3316,80 ± 58,80	87,02 ± 8	2244,80 ± 1865,44	3322,56 ± 98,43
<sup>60</sup> Ni	100	4,31 ± 2,40	19,25 ± 0,71	4,46 ± 0,09	3,72 ± 0,69	1,35 ± 0,22	18,75 ± 0,24	2,59 ± 0,79	23,72 ± 1,07	10,21 ± 11,51	0,62 ± 0,08
<sup>206</sup> Pb	113	16,20 ± 3,94	8,26 ± 0,35	18,10 ± 0,98	13,24 ± 5,84	12,92 ± 0,76	9,80 ± 0,21	14,80 ± 3,51	11,11 ± 0,85	17,08 ± 4,52	1,01 ± 0,69
<sup>78</sup> Se	95	1,74 ± 0,32	2,43 ± 0,11	1,55 ± 0,28	1,28 ± 0,23	0,99 ± 0,19	2,14 ± 0,12	1,38 ± 0,01	1,91 ± 0,09	1,54 ± 0,31	0,06 ± 0,03
<sup>51</sup> V	99	30,82 ± 7,82	323,46 ± 14,74	38,76 ± 4,21	46,10 ± 6,03	12,87 ± 2,46	318,32 ± 11,71	26,44 ± 5,10	314,76 ± 5,18	125,85 ± 160,44	5,06 ± 1,92
<sup>66</sup> Zn	98	20,40 ± 9,52	76,74 ± 4,22	22,67 ± 2,92	22,24 ± 6,24	18,92 ± 1,07	74,53 ± 0,69	12,90 ± 4,90	102,23 ± 3,60	47,22 ± 47	46,91 ± 3,85

Fonte: próprio autor

Os minerais essenciais presentes em geoprópolis assim como Cu, Fe, K, Mg, Na, e Zn são responsáveis por funções bioquímicas no corpo humano. O cobre é caracterizado por ser um mineral importante nos mecanismos enzimáticos como cofator e na síntese de hemoglobina para a oxigenação sanguínea, porém em grandes quantidades apresenta-se extremamente tóxico, acarretando em desordens metabólicas e danos ao fígado devido a sua acumulação (TEODORO et al., 2017). Golubkina et al. (2016) determinaram diferentes minerais para própolis, entre eles o cobre, variando de  $0,64 \pm 0,07 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $2,70 \pm 0,27 \text{ mg kg}^{-1}$ , resultados semelhantes foram encontrados por Korn et al. (2013) variando de  $0,64 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $1,12 \pm 0,72 \text{ mg kg}^{-1}$ , valores inferiores ao mínimo de  $6,44 \pm 1,61 \text{ mg kg}^{-1}$  determinados para geoprópolis de TAI.

O ferro no organismo humano é responsável pela transferência de oxigênio e elétrons enzimas, estando presente em hemoglobinas, mioglobinas e citocromos. A deficiência de ferro é responsável principalmente por ocasionar anemia ferropriva afetando cerca de 20 % da população mundial. Contudo, o excesso desse mineral pode ocasionar problemas de saúde, aumentando o risco de câncer, doenças cardíacas, artrites, diabetes e problemas renais (HABEYCH et al., 2016; VERMA; TAPADIA; SONI, 2017). A determinação desse elemento nas amostras de geoprópolis apresentou-se distinta entre as espécies de abelhas. A maior concentração encontrada foi para a amostra MMI ( $82524,41 \pm 3318,06 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sendo aproximadamente 62 vezes maior que o mínimo encontrado para a amostra TAI ( $1315,75 \pm 402,96 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Valores inferiores foram relatados para própolis de *Apis mellifera* provenientes da região central da Argentina (máximo de  $852,4 \pm 217,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), do Chile (máximo de  $536,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e provenientes do estado de Bahia, Brasil (máximo de  $206 \pm 71 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (CANTARELLI et al., 2011; GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2015; KORN et al., 2013). Por se o quarto mineral mais abundante na crosta terrestre em peso (VERMA; TAPADIA; SONI, 2017) já era esperado uma composição elevada desse mineral levando em consideração a natureza das amostras.

Potássio é um eletrólito essencial para a manutenção da saúde pois atua no sistema nervoso, regula os batimentos cardíacos, também como está presente no metabolismo celular e principalmente reduz a pressão sanguínea. A organização mundial da saúde sugere um consumo de K de no mínimo 3510 mg por dia para adultos (MUÑOZ et al., 2017). As amostras de geoprópolis variaram de  $2268,51 \pm 236,42 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $555,02 \pm 102,07 \text{ mg kg}^{-1}$  em TAI e MQF respectivamente, valores superiores ao máximo ( $990 \pm 99 \text{ mg kg}^{-1}$ ) encontrado por Golubkina et al. (2016) em própolis proveniente da Moldávia também como ao

máximo (1569,4 mg kg<sup>-1</sup>) reportado por González-Martín et al. (2015) em própolis proveniente da Espanha.

Caracterizado por ser o quinto mineral mais abundante no organismo humano, o magnésio está associado em muitas reações bioquímicas. Está presente no metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, na transmissão neuromuscular, no crescimento de ossos, no metabolismo energético, regulação da pressão sanguínea, como cofator de diversas enzimas e na contração do tecido muscular cardíaco. Durante o período de 2003-2006 estimou-se que a 63 % de homens e 69% de mulheres norte-americanos apresentavam consumo insuficiente desse mineral (OH; DEETH, 2017). Os valores encontrados para esse mineral nas amostras de geoprópolis variaram de 401,27 ± 38,03 mg kg<sup>-1</sup> em MQF a 2371,75 ± 104,94 mg kg<sup>-1</sup> em MSI, valores superiores ao determinado por Golubkina et al. (2016) em própolis de *Apis mellifera* onde quantificou o máximo de 234 ± 23 mg kg<sup>-1</sup> em suas amostras.

Uma dieta rica em sódio pode ser prejudicial ao organismo principalmente por favorecer o risco de hipertensão. O consumo diário de sódio recomendado é menor que 2 g, aproximadamente 5 g de sal de cozinha convencional por dia (MUÑOZ et al., 2017). A amostra MQF apresentou a menor concentração de sódio, 34,83 ± 15,09 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que a amostra MQS apresentou a maior quantificação do mineral, 3395,43 ± 52,33 mg kg<sup>-1</sup>. Bonvehí e Bermejo (2013), relatam a quantificação de Na em própolis variando de 93 a 211 mg kg<sup>-1</sup>, Gong et al. (2012) relatam Na em própolis variando entre 42,2 a 1708,4 mg kg<sup>-1</sup>.

O zinco é um mineral essencial ao organismo humano, 30 % do seu total está presente nos ossos, outros 60 % estão presentes nos tecidos musculares, ainda, apresenta-se ligado a mais de 900 proteínas no corpo humano. Seu consumo sugerido é de 14 e 10 mg por dia para homens e mulheres respectivamente, sendo que a deficiência desse mineral pode acarretar em diarreia severa e atordoamentos (GREGORY et al., 2016). As amostras de geoprópolis de abelha sem ferrão apresentaram concentração baixa desse mineral, sendo a amostra MSI a apresentar o maior conteúdo de 102,23 ± 3,60 mg kg<sup>-1</sup> com uma média entre todas as amostras de 44,48 mg kg<sup>-1</sup>. Bonvehí e Bermejo (2013) quantificaram zinco em amostras de própolis, as quais variaram de 163 a 1364 mg kg<sup>-1</sup>, Gong et al. (2012) analisaram 32 amostras de própolis da China e relataram a média desse mineral de 160,8 mg kg<sup>-1</sup>, ambos os estudos apresentam valores superiores de zinco.

A concentração de metais potencialmente tóxicos principalmente em alimentos é um fator que tem aumentado a preocupação da população mundialmente. Alguns minerais como arsênio, cádmio,

chumbo e cromo mesmo em concentrações mínimas podem trazer graves consequências ao organismo humano. A contaminação por metais potencialmente tóxicos em alimentos ocorre através de processos industriais, uso de agroquímicos e através da poluição do meio ambiente por dispersão através do solo, água e ar, e o consequente acúmulo em plantas e animais (CHEN et al., 2018a; CHENG et al., 2017).

O arsênio em sua forma inorgânica é classificado como carcinogênico, sua intoxicação pode causar câncer de bexiga, rim, pulmão e pele, além de causar graves problemas no sistema cardiovascular, endócrino, gastrointestinal, geniturinário, hematológico, neurológico e no sistema respiratório. A dose letal para seres humanos é de 70 a 200 mg ou 1 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por dia (ÇIFTÇI; HENDEN, 2016).

O arsênio é amplamente distribuído através da crosta terrestre, e uma das potenciais fontes desse elemento é o solo, dessa maneira, o monitoramento em geoprópolis torna-se imprescindível. A amostras de geoprópolis apresentaram concentração média de As de 2,20 mg kg<sup>-1</sup>, sendo a amostra MQI a apresentar a maior concentração desse metal pesado (3,01 ± 0,21 mg kg<sup>-1</sup>) e a amostra TAI a apresentar a menor concentração (0,09 ± 0,01 mg kg<sup>-1</sup>).

Bonvehí e Bermejo (2013) relatam a baixa quantificação em amostras de própolis, variando de 0,075 a 0,115 mg kg<sup>-1</sup>, Gong et al. (2012) ao analisar 32 amostras de própolis quantificaram arsênio em apenas 2, com valores de 0,63 ± 5,4 e 0,92 ± 2,7 mg kg<sup>-1</sup>. Em amostras de própolis provenientes da Argentina, as concentrações determinadas para As variaram de 0,15 ± 0,07 a 0,27 ± 0,10 mg kg<sup>-1</sup>. Os estudos com a própolis de abelha *Apis mellifera* mostram a baixa concentração desse mineral, fato característico da matriz não apresentar solo em sua composição.

O acúmulo de cádmio no organismo humano acontece principalmente no rim, e assim como o arsênio, é caracterizado por ser um mineral carcinogênico, causando ainda problemas renais, osteoporose e problemas cardiovasculares. O consumo tolerável desse elemento é de 2,5 µg kg<sup>-1</sup> por peso corporal. Quando presente no solo em grandes concentrações causa mudanças estruturais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em plantas, inibindo o crescimento e a germinação, resultando em perdas (BOLAM et al., 2016; JEAN et al., 2015).

A concentração de Cd determinado nas amostras de geoprópolis variou de 0,02 a 0,37 mg kg<sup>-1</sup> nas amostras MSS e MQS respectivamente. Valores variando de 0,038 a 0,102 mg kg<sup>-1</sup> foram

encontrados em própolis de diversas regiões da Espanha (BONVEHÍ; BERMEJO, 2013). Gong et al. (2012) encontraram valores variando de 0,24 a 1,19 mg kg<sup>-1</sup> em própolis de *Apis mellifera*, sendo estes superiores aos determinados encontrados para geoprópolis.

O acúmulo de chumbo no organismo humano pode causar problemas renais, danos ao cérebro e de comportamento. O chumbo até mesmo em concentrações baixas em torno de 5 ppb é um elemento tóxico para todos os seres humanos, porém, é na infância que os problemas relacionados a intoxicação por chumbo são de extremo risco, causando danos irreversíveis ao desenvolvimento cerebral e do sistema imunológico (KAPLAN INCE et al., 2017). A concentração média desse metal pesado nas amostras de geoprópolis de abelha sem ferrão foi de 12,25 mg kg<sup>-1</sup>, sendo a amostra a TAI a apresentar 1,01 ± 0,69 mg kg<sup>-1</sup> em contrapartida, a amostra MQS foi a que apresentou a maior concentração de 18,10 mg kg<sup>-1</sup>. Bonvehí e Bermejo (2013) e Golubkina et al. (2016) encontraram uma concentração máxima de Pb para própolis de 3,40 mg kg<sup>-1</sup> e 3,18 mg kg<sup>-1</sup>, adicionalmente em trabalho realizado por Gong et al. (2012) e por González-Martín et al. (2015) determinaram uma concentração muito superior aos relatados para geoprópolis, com o máximo de 55,37 mg kg<sup>-1</sup> e 74 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente.

O cromo pode interagir com DNA ou proteínas intoxicando o organismo humano e está associado a câncer e com doenças degenerativas por induzir o estresse oxidativo (CHEN et al., 2018b). A amostra MMI apresentou a maior concentração de Cr dentre as analisadas, com concentração de 53,47 ± 5,51 mg kg<sup>-1</sup>, a amostra de TAI apresentou concentração de Cr 62 vezes inferior a amostra anterior.

Uma vez que a matriz geoprópolis é produzida a partir principalmente de matéria inorgânica (solo) é possível associar a composição mineral de cada amostra com a região de coleta do solo pelas abelhas e assim dispor de geoprópolis com características regionais distintas passíveis de serem avaliadas e separadas estatisticamente de acordo com suas semelhanças químicas.

### **3.2.1 Análise quimiométrica aplicada a composição mineral em amostras de geoprópolis**

A quimiometria é uma ferramenta estatística interdisciplinar definida pela aplicação de métodos estatísticos multivariados e matemáticos para a análise de um grande conjunto de informações (CALVO; MAGGIO; KAUFMAN, 2018; SOUZA et al., 2011). O uso



da quimiometria para identificação geográfica de origem já foi reportado em diversos trabalhos em literatura (FAN; BETA, 2017; KALAYCIOĞLU et al., 2017; KALLITHRAKA; MAMALOS; MAKRIS, 2007; LONGOBARDI et al., 2015; MELUCCI et al., 2016).

A análise de componentes principais (*principal component analysis – PCA*) é uma técnica frequentemente utilizada para o reconhecimento de padrões a partir das respostas dominantes seguida do agrupamento das amostras de características semelhantes. A PCA converte dados em gráficos para a representação visual das amostras analisadas permitindo o reconhecimento da correlação entre as variáveis estudadas também como a identificação de valores discrepantes entre elas (BOGDANOVSKA et al., 2017; GÓMEZ-CANELA et al., 2017).

A análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical cluster analysis – HCA*) é uma técnica que visa construir grupos hierárquicos baseados nas similaridades das respostas obtidas em diferentes níveis de detalhamento distribuídos em um dendograma (CALVO; MAGGIO; KAUFMAN, 2018). Cada amostras representa um grupo em separado, as quais se unem a medida em que a distância de ligação aumenta, resultando ao final na formação de um grupo (NOVÁK et al., 2017).

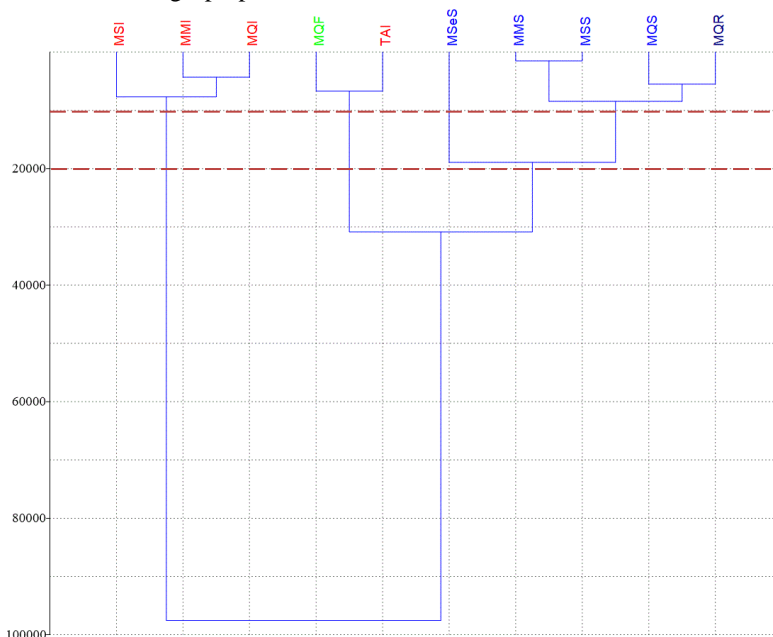
Os resultados da composição mineral para as amostras de geoprópolis foram submetidos a análise de componentes principais e demonstrados conforme Figura 11.



16 elementos analisados. Dentre todas as amostras analisadas a TAI obteve a maior concentração de K, caracterizado por ser um mineral importante para o desenvolvimento de plantas sendo acumulado em células vegetais (BENLLOCH-GONZÁLEZ et al., 2016), justificando então a maior concentração de resinas vegetais na amostra de georópolis TAI.

A análise de componentes principais pode ser confirmada a partir da análise de agrupamento hierárquico (Figura 12). A HCA foi realizada a fim de verificar o grau de semelhança entre as amostras através do método de Ward.

**Figura 11** - Análise de agrupamento hierárquico aplicado a composição mineral em amostras de georópolis.



Fonte: próprio autor

A HCA confirmou o demonstrado na PCA. No primeiro corte da HCA, é possível observar a formação de pelo menos 2 grupos com as mesmas características geográficas, com as amostras MSI, MMI e MQI e outro com as amostras MMS, MSS, MQS, onde no segundo corte a amostra MSeS é então incluída nesse grupo. As amostras MQF e TAI

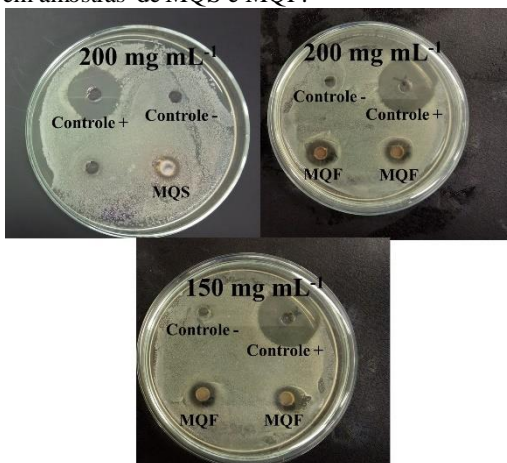
formaram um grupo distante dos demais, por apresentarem grande dissimilaridade com o restante das amostras.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Tem sido descrito na literatura a ação dos compostos fenólicos contra bactérias (ALBANO et al., 2016; CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015; MARTINS et al., 2015), diante disso, a avaliação do potencial antibacteriano foi avaliada qualitativamente pelo método de difusão em ágar utilizando a técnica de poços.

A amostra de MQS na concentração de 200 mg mL<sup>-1</sup> apresentou halo ao redor do poço para a *S. aureus*, assim como, a amostra MQF apresentou halo de inibição também para *S. aureus* nas concentrações de 200 e 150 mg mL<sup>-1</sup>, conforme Figura 13.

**Figura 12** - Placas com o extrato de geoprópolis contendo os halos de inibição para *S. aureus* em amostras de MQS e MQF.



Fonte: próprio autor

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva, patogênica, que induz células a apoptose, e sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos é preocupante. A infecção por *S. aureus* pode causar desde doenças de pele, gastroenterites, e nos casos mais graves a pneumonia e a falha de órgãos (CHAMBERS; DELEO, 2009; ZHANG; HU; RAO, 2017).

Ambas as amostras são referentes a geoprópolis de abelha sem ferrão da espécie *M. Quadrifasciata*, porém provenientes de regiões

distintas. Características locais, assim como a preferência das abelhas na coleta das resinas vegetais podem ser atribuídas a atividade antimicrobiana descrita. As amostras de geoprópolis com potencial antimicrobiano apresentam um perfil fenólico semelhante, 80 % dos compostos fenólicos identificados em ambas as amostras são os mesmos, sendo eles: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-cumárico, aromadendrina, coniferaldeído, pinocembrina e vanilina. A ação sinérgica entre os diferentes compostos fenólicos e outros compostos químicos em uma amostra em relação ao potencial antimicrobiano é relatada em literatura, assim sendo, a combinação desses polifenóis presentes nas amostras de geoprópolis MQF e MQS pode ser atribuída ao potencial antibacteriano (DIMKIĆ et al., 2016).

Entretanto, é visto que não existe uma semelhança entre amostras, provenientes de um mesmo local de coleta. A amostra MQS que apresentou formação de halo é proveniente da mesma região que as amostras de MMS, MSS e MSeS, sendo que estas não apresentaram o mesmo comportamento na avaliação da atividade antimicrobiana.

Sousa et al. (2015) relatam uma atividade inibitória para bactérias da espécie *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* em concentração a partir de 25 mg mL<sup>-1</sup> e para cepas de *Salmonella typhimurium* a inibição ocorreu a partir da concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup> em amostras de geoprópolis de *Melipona subnitida* provenientes do Rio Grande do Norte.

Foi atribuída ação fungistática em amostras de geoprópolis provenientes do estado de Maranhão, nordeste brasileiro, em abelha da espécie *M. fasciculata*, uma vez que só preveniram o desenvolvimento fúngico por um determinado tempo (ARAÚJO; BOSCO; SFORCIN, 2016).

Libério et al. (2011) ao avaliar a atividade antimicrobiana em amostras de geoprópolis de *M. fasciculata*, relatam a ação bactericida dos extratos de geoprópolis contra cepa de *S. mutans* e *C. albicans*, sendo que o extrato que apresentou maior concentração de flavonóides também exerceu maior atividade antibacteriana.

Entre as dez amostras analisadas, as que obtiveram halo de inibição do crescimento microbiano (MQS e MQF) foram aquelas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos totais destacados no primeiro capítulo desse trabalho.

Estudos publicados em literatura relacionando geoprópolis e atividade antimicrobiana limitam-se a avaliação de apenas uma espécie de abelha sem ferrão (DA CUNHA et al., 2013; LIBERIO et al., 2011; SANTOS et al., 2017; SOUSA et al., 2015), não sendo representativo

para as demais espécies que produzem geoprópolis com características individuais, fato demonstrado nesse estudo, onde apenas duas espécies de abelha sem ferrão analisadas obtiveram uma atividade antimicrobiana.

## 4 CONCLUSÃO

A análise do perfil de compostos fenólicos realizado por LC-ESI-MS/MS possibilitou identificar 28 compostos nas amostras de geoprópolis de abelha sem ferrão, sendo 18 ainda não identificados até o momento em literatura, indicando que os conhecimentos sobre a matriz geoprópolis estão em desenvolvimento constante. As amostras apresentaram características individuais e distintas uma das outras, indicando variação entre espécies e locais de coleta. A hidrólise alcalina proporcionou a identificação de maior número de compostos fenólicos entre os preparos de amostra, sendo apropriada para estudos futuros.

A complexa composição mineral das amostras de geoprópolis, característica de um produto fabricado quase que exclusivamente por solo revelou a presença tanto de minerais essenciais como de metais potencialmente tóxicos, sendo caracterizados pela região de coleta do solo pelas abelhas, as quais apresentaram semelhança conforme análise dos dados por quimiometria.

A avaliação do potencial antimicrobiano das amostras de geoprópolis evidenciou que as abelhas o produzem com características individuais, pois somente uma espécie de abelha de duas regiões distintas apresentou potencial antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, mesmo que pouco expressivo.

Portanto para a avaliação da composição química fenólica e composição mineral e antimicrobiana de amostras de geoprópolis devem ser levadas em consideração as características regionais incluindo clima, flora e espécie de abelha produtora, considerando fatores os quais refletem em sua composição química final.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises realizadas nas diferentes amostras de geoprópolis incluindo diferentes espécies de abelha sem ferrão alocadas em meliponários do estado de Santa Catarina nos revelaram uma complexa composição química, distintas e individuais uma das outras com particularidades para cada amostra. Com o estudo do perfil de compostos fenólicos, foi observado que a geoprópolis é uma potencial fonte de compostos bioativos com importante atividade antioxidante é pouco explorada, visto os poucos estudos relacionados a matriz. O potencial antimicrobiano embora pouco expressivo para as amostras avaliadas pode estar associado a presença de compostos fenólicos que atuam em sinergismo com outros constituintes da matriz.,.

O entendimento sobre as características da matriz geoprópolis pode ser de interesse para a formulação de produtos com funções conservantes e também na cosmetologia podendo impulsionar a agricultura familiar e sustentável, além de contribuir para a manutenção de espécies de insetos potencialmente polinizadores .

Assim sendo, o estudo proposto contribuiu com informações pertinentes a respeito da geoprópolis de abelha sem ferrão de meliponários do estado de Santa Catarina, e almeja ser utilizado como base para futuras pesquisas e formulação de novos produtos.



## REFERÊNCIAS

- ACEVES, M. DE L. D.; ORTEGA, J. Á. A.; BARRAGÁN, C. A. R. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan , Jalisco Physical-chemical description of propolis collected in. **Revista Mexicana de Ciencias Forestales**, v. 6, n. 28, p. 74–87, 2015.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, jun. 2014.
- AGÜERO, M. B. et al. Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 166–173, jun. 2014.
- ALBANO, M. et al. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 83–90, 1 dez. 2016.
- ARABI, M.; GHAEDI, M.; OSTOVAN, A. Synthesis and application of in-situ molecularly imprinted silica monolithic in pipette-tip solid-phase microextraction for the separation and determination of gallic acid in orange juice samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1048, p. 102–110, mar. 2017.
- 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, n. 1, p. 61–68, 2016.
- ARAÚJO, M. J. A. M. **Geoprópolis de *Melipona fasciculata* SMITH: ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; BOSCO, S. DE M. G.; SFORCIN, J. M. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 863–869, out. 2016.
- ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 110–124, jan. 2018.

ATOUI, A. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27–36, jan. 2005.

BALLESTEROS, L. F. et al. Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 1–8, abr. 2017.

BANKOVA, V. et al. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 53, n. 5–6, p. 402–406, 1998.

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

BATISTA, M. C. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 315–322, set. 2016.

BELWAL, T. et al. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 207, p. 115–124, set. 2016.

BENLLOCH-GONZÁLEZ, M. et al. Effect of moderate high temperature on the vegetative growth and potassium allocation in olive plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 207, p. 22–29, dez. 2016.

BILAL, M. et al. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 554–574, out. 2017.

BILUCA, F. C. **Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão (Meliponinae spp.) produzidos no estado de Santa Catarina**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

BILUCA, F. C. et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89–97, out. 2017.

BOGDANOVSKA, L. et al. Chemometric evaluation of the efficacy of locally administered chlorhexidine in patients with periodontal disease. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 7, p. 1022–1031, nov. 2017.

BOLAM, T. et al. Cadmium levels in food containing crab brown meat: A brief survey from UK retailers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 54, p. 63–69, dez. 2016.

BONA, E. A. M. DE et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, set. 2014.

BONVEHÍ, J. S.; BERMEJO, F. J. O. Element content of propolis collected from different areas of South Spain. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 7, p. 6035–6047, 28 jul. 2013.

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, jan. 1995.

BURATTI, S.; BENEDETTI, S.; COSIO, M. S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1387–1392, 28 fev. 2007.

CALVO, N. L.; MAGGIO, R. M.; KAUFMAN, T. S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 538–564, jan. 2018.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374–380, mar. 2014.

CANTARELLI, M. Á. et al. Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 256–260, jan. 2011.

CARDOZO, D. V. et al. Chemical Variability of Geopropolis from Jatáí, Mandacaiá and Mandurí Stingless Bees. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2457–2474, 2015.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. **Food Bioscience**, v. 11, p. 8–15, 1 set. 2015.

CHAIMANEE, V. et al. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. **Journal of Insect Physiology**, v. 89, p. 1–8, jun. 2016.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, set. 2009.

CHAN, G. C.-F.; CHEUNG, K.-W.; SZE, D. M.-Y. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 44, n. 3, p. 262–273, 17 jun. 2013.

CHEN, L. et al. Heavy metals in food crops, soil, and water in the Lihe River Watershed of the Taihu Region and their potential health risks when ingested. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 141–149, fev. 2018a.

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, abr. 2018b.

CHENG, J. et al. Concentrations and human health implications of heavy metals in market foods from a Chinese coal-mining city. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 37–44, mar. 2017.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical profiles of stingless bee (*Apidae: Meliponini*) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, fev. 2016.

ÇIFTÇİ, T. D.; HENDEN, E. Leaching of arsenic from glazed and nonglazed potteries into foods. **Science of The Total Environment**, v. 569–570, p. 1530–1535, nov. 2016.

CONAMA. **Resolução nº 346**Brasil, 2004.

COZZOLINO, S. M. F. Deficiências de minerais. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 60, p. 119–126, ago. 2007.

**CUBA, G. SETOR APÍCOLA BRASILEIRO EM NÚMEROS.**

Disponível em:

<[http://brazilletsbee.com.br/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_abril\\_2016.pdf](http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_abril_2016.pdf)>. Acesso em: 19 ago. 2016.

**CUNHA, M. S. et al. PADRONIZAÇÃO DE EXTRATIVOS DE GEOPRÓPOLIS DE MELIPONA FÁSCICULATA SMITH (TIÚBA).**

**Cadernos de Pesquisa**, v. 16, n. 3, p. 31–38, 2009.

DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 23, 28 dez. 2013.

DA CUNHA, M. G. et al. Prediction of pharmacokinetic and toxicological parameters of a 4-phenylcoumarin isolated from geopropolis: In silico and in vitro approaches. **Toxicology Letters**, v. 263, p. 6–10, nov. 2016.

DA ROSA, C. G. et al. Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 138–146, abr. 2013.

DA SILVA FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, fev. 2013.

DE LIMA, M. V. D. **Geopropolis Produzida Por Diferentes Espécies De Abelhas : Atividades Antimicrobiana E Antioxidante E Determinação Do Teor De Compostos Fenólicos**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2015.

DEMERA, J. H.; ANGERT, E. R. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 411–417, jul. 2004.

DIAS, M. I. et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9–22, abr. 2016.

DIMKIĆ, I. et al. Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 856–871, 30 dez. 2016.

DORĐEVIĆ, T. M.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. I. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 957–963, 1 abr. 2010.

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

DUTRA, R. P. et al. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 26 mar. 2014.

EL NEMR, A. et al. The distribution, contamination and risk assessment of heavy metals in sediment and shellfish from the Red Sea coast, Egypt. **Chemosphere**, v. 165, p. 369–380, dez. 2016.

FAN, G.; BETA, T. Discrimination of geographical origin of Napirira bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on phenolic profiles and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 62, p. 217–222, set. 2017.

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

FREITAS, A. DA S.; VIT, P.; BARTH, O. M. 9 . Pollen analysis of geopropolis and propolis from stingless bees. **Stingless Bee Process Honey and Pollen in Cerumen Pots**, p. 1–7, 2013.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 31 jan. 1979.

GOLUBKINA, N. A. et al. Variations of chemical element composition of bee and beekeeping products in different taxons of the biosphere. **Ecological Indicators**, v. 66, p. 452–457, jul. 2016.

GOMES, T. et al. Optimization of mead production using Response Surface Methodology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 680–686, set. 2013.

GÓMEZ-CANELA, C. et al. Analysis of neurobehavioural data by chemometric methods in ecotoxicological studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 583–590, nov. 2017.

GONG, S. et al. Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 583–588, set. 2012.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M. et al. Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. **Sensors**, v. 15, n. 11, p. 27854–27868, 3 nov. 2015.

GREGORY, P. J. et al. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. **Global Food Security**, 2016.

GUTIÉRREZ-CORTÉS, C.; SUAREZ MAHECHA, H. Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensoral characteristics in sausages. **Vitae**, v. 21, n. 2, p. 90–96, 2014.

HABEYCH, E. et al. Strategies to limit colour changes when fortifying food products with iron. **Food Research International**, v. 88, p. 122–128, out. 2016.

HEMPEL, E. V.; BOLLARD, E. R. The Evidence-Based Evaluation of Iron Deficiency Anemia. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 5, p. 1065–1075, set. 2016.

HUNDRE, S. Y.; KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein isolate and  $\beta$ -cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray–freeze drying method. **Food Chemistry**, v. 174, p. 16–24, maio 2015.

JEAN, J. et al. Impact of a modification of food regulation on cadmium exposure. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 478–483, out. 2015.

KALAYCIOĞLU, Z. et al. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 402–408, 1 out. 2017.

KALLITHRAKA, S.; MAMALOS, A.; MAKRIS, D. P. Differentiation of

Young Red Wines Based on Chemometrics of Minor Polyphenolic Constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3233–3239, maio 2007.

KAPLAN INCE, O. et al. A food waste utilization study for removing lead(II) from drinks. **Food Chemistry**, v. 214, p. 637–643, jan. 2017.

KARUNARATNE, R.; ZHU, F. Physicochemical interactions of maize starch with ferulic acid. **Food Chemistry**, v. 199, p. 372–379, maio 2016.

KASOTE, D. et al. Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 156–163, ago. 2014.

KIM, K. et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 466–473, abr. 2006.

KORN, M. G. A. et al. Evaluation of Sample Preparation Procedures for Trace Element Determination in Brazilian Propolis by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Their Discrimination According to Geographic Region. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 872–880, 9 jun. 2013.

KUSTIAWAN, P. M. et al. In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 7, p. 549–556, jul. 2014.

LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, 4 dez. 2011.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1003–1008, jan. 2007.

LIU, L. et al. Complex enzyme hydrolysis releases antioxidative phenolics from rice bran. **Food Chemistry**, v. 214, p. 1–8, jan. 2017.

LONGOBARDI, F. et al. Discrimination of geographical origin of lentils (*Lens culinaris* Medik.) using isotope ratio mass spectrometry combined



with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 188, p. 343–349, dez. 2015.

LUIS-VILLAROYA, A. et al. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 90–97, jul. 2015.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447–454, set. 2008.

LUTZ, I. A. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: [s.n.].

MARCUCCI, M. C. **Propriedades Biológicas E Terapêuticas Dos Constituintes Químicos Da Própolis**. Química Nova, 1996. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/qnol/1996/vol19n5/v19\\_n5\\_12.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qnol/1996/vol19n5/v19_n5_12.pdf)>

MARTINEZ, O. A.; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 982–990, dez. 2012.

MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648–670, 15 nov. 2015.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 1–12, fev. 2016.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533–539, fev. 2010.

MELUCCI, D. et al. Rapid direct analysis to discriminate geographic origin of extra virgin olive oils by flash gas chromatography electronic nose and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 204, p. 263–273, ago. 2016.

MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*.

**Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913–920, nov. 2003.

MIZÉHOUN-ADISSODA, C. et al. Dietary sodium and potassium intakes: Data from urban and rural areas. **Nutrition**, v. 33, p. 35–41, jan. 2017.

MONTES, A. et al. Micronization of vanillin by rapid expansion of supercritical solutions process. **Journal of CO2 Utilization**, v. 21, p. 169–176, out. 2017.

MOUHOUBI-TAFININE, Z.; OUCHEMOUKH, S.; TAMENDJARI, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 85–90, out. 2016.

MUNEKATA, P. E. S. et al. Characterization of phenolic composition in chestnut leaves and beer residue by LC-DAD-ESI-MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 52–58, maio 2016.

MUÑOZ, O. et al. Arsenic, cadmium, mercury, sodium, and potassium concentrations in common foods and estimated daily intake of the population in Valdivia (Chile) using a total diet study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1125–1134, nov. 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, out. 2004.

NAITO, Y. et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 452–456, maio 2007.

NARDINI, M. et al. Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 119–124, out. 2002.

NEVES, D. R. DAS. **Avaliação de interface de reação e colisão para eliminar interferências poliatômicas na análise de etanol combustível por ICP-MS**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2010.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: [s.n.]. v. 34

NOVÁK, M. et al. Combined cluster and discriminant analysis: An efficient

chemometric approach in diesel fuel characterization. **Forensic Science International**, v. 270, p. 61–69, jan. 2017.

ODA, H. et al. Effect of Brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. **Journal of Oral Biosciences**, v. 58, n. 2, p. 50–54, maio 2016.

OELLIG, C. Acetonitrile extraction and dual-layer solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in propolis. **Journal of Chromatography A**, v. 1445, p. 19–26, maio 2016.

OH, H. E.; DEETH, H. C. Magnesium in milk. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 89–97, ago. 2017.

OLIVEIRA, F. F. et al. **Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. [s.l.: s.n.].

OLIVEIRA, M. S. et al. **AVALIAÇÃO DE TRÊS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUALIDADE EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS E GEOPROPÓLIS DE ABELHAS NATIVAS SEM FERRÃO DA AMAZÔNIA**. Belém: [s.n.].

OLIVEIRA, M. L. DE; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 389–394, set. 2005.

OSÉS, S. M. et al. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1215–1223, abr. 2016.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy Abr**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PALANI SWAMY, S. KUMARAN; GOVINDASWAMY, V. Therapeutical properties of ferulic acid and bioavailability enhancement through feruloyl esterase. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 657–666, ago. 2015.

PARK, Y. K. et al. ESTUDO DA PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE

PRÓPOLIS E SUAS APLICAÇÕES. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313–318, ago. 1998.

PEREIRA, A. DOS S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. DE. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321–326, maio 2002.

PIERINI, G. D. et al. Development of an electroanalytical method for the determination of lead in Argentina raw propolis based on bismuth electrodes. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 102–106, jan. 2013.

PINHEIRO, F. DE M. et al. **PÓLEN DE ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata*: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60389/1/polen-de-abelhas-indigenas-sem-ferrao-melipona.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBÜCHEL, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 296–314, ago. 2001.

RAFIEE, Z. et al. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. **Food Chemistry**, v. 220, p. 115–122, abr. 2017.

RAMÓN-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ, J. C.; DE LA LUZ ORTIZ-VÁZQUEZ, E. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43–48, set. 2015.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, p. 657–664, 2016.

ROIDOUNG, S.; DOLAN, K. D.; SIDDIQ, M. Gallic acid as a protective antioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice. **Food Chemistry**, v. 210, p. 422–427, nov. 2016.

ROY, A. J.; STANELY MAINZEN PRINCE, P. Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats.

**Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 348–354, out. 2013.

SALES, A. et al. The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV–visS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 3, p. 1352–1356, out. 2006.

SANTOS, H. et al. Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 953, 3 maio 2017.

SAÚDE, M. DA. **Guia Alimentar Para a População Brasileira: Promovendo a Alimentação Saudável**. 1. ed. Brasília: [s.n.].

SAWAYA, A. C. H. F. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 37–42, 1 abr. 2009.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. S1, p. S20–S28, jan. 2010.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125–131, nov. 2015.

**SCOPUS**. Disponível em:

<[https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=56142A35CD9967C283C0C21BC6620D6F.ZmAySxCHIBxxTXbnsoe5w:100&origin=resultslist&sr c=s&s=TITLE-ABS-KEY\(geopropolis\)&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=26&count=29&analyzeResults=Analyze+results&txGid=0](https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=56142A35CD9967C283C0C21BC6620D6F.ZmAySxCHIBxxTXbnsoe5w:100&origin=resultslist&sr c=s&s=TITLE-ABS-KEY(geopropolis)&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=26&count=29&analyzeResults=Analyze+results&txGid=0)>. Acesso em: 14 jul. 2016.

SEGURA, F. R. et al. Potential risks of the residue from Samarco’s mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813–825, nov. 2016.

SERPEN, A. et al. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 3, p. 816–820, nov. 2008.

SGARIGLIA, M. A. et al. Properties of honey from *Tetragonisca angustula*

fiebrigi and *Plebeia wittmanni* of Argentina. **Apidologie**, v. 41, n. 6, p. 667–675, 2 jun. 2010.

SILVA, J. C. et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, maio 2012.

SILVA, E. C. C. DA et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628–633, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: [s.n.].

SONG, Y. et al. Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 141–147, jul. 2014.

SOUSA, C. M. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, abr. 2007.

SOUSA, D. M. N. DE et al. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, TOXICIDADE IN VITRO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIRADICALAR E ANTIBACTERIANA DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAÍRA. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 134–140, 2015.

SOUZA, R. C. DA S. et al. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 333–336, 2004.

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

SOUZA, S. S. et al. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 692–695, jan. 2011.

SPINELLI, S. et al. Microencapsulated Propolis to Enhance the Antioxidant Properties of Fresh Fish Burgers. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 6, p. 527–535, dez. 2015.

SRINIVASAN, K.; PLATEL, K.; RAO, M. V. L. Hypotriglyceridemic effect of dietary vanillin in experimental rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 1, p. 103–108, 1 nov. 2008.

SUN, Q. et al. Interactions of cinnamaldehyde and its metabolite cinnamic acid with human serum albumin and interference of other food additives. **Food Chemistry**, v. 243, p. 74–81, mar. 2018.

TANASE, C. M. et al. Sodium and potassium in composite food samples from the Canadian Total Diet Study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 2, p. 237–243, mar. 2011.

TEODORO, M. T. F. et al. Determination of copper total and speciation in food samples by flame atomic absorption spectrometry in association with solid-phase extraction with bamboo ( *Bambusa vulgaris* ) fiber loaded with bathocuproine. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 351–357, maio 2017.

TOMÉ, H. V. V. et al. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103–109, abr. 2015.

USEPA, E. Method 3051: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. **Test Methods for Evaluating Solid Waste**, n. February, p. 1–30, 2007.

VELAGAPUDI, V. et al. Computer-assisted image processing 12 lead ECG model to diagnose hyperkalemia. **Journal of Electrocardiology**, v. 50, n. 1, p. 131–138, jan. 2017.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian *Meliponinae*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 785–789, 1 jan. 2000.

VERMA, C.; TAPADIA, K.; SONI, A. B. Determination of iron (III) in food, biological and environmental samples. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1415–1420, 2017.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão**. [s.l.:

s.n.].

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey a legacy of stingless bees**. New York: [s.n.].

WANG, L. et al. Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay ( *Coix lachryma-jobi* L . var. *ma-yuen* Stapf) seed meal. **Food Chemistry**, v. 196, p. 509–517, abr. 2016.

WANG, T.; HE, F.; CHEN, G. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 101–111, mar. 2014.

WANG, W. et al. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food Chemistry**, v. 171, p. 40–49, mar. 2015.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P. **Manual De Boas Práticas Para O Manejo E Conservação De Abelhas Nativas (Meliponíneos)**. Porto Alegre: [s.n.].

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. S159–S166, mar. 2007.

XU, C.-C. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721–731, out. 2017.

XU, X.; AN, X. Study on acrylamide inhibitory mechanism in Maillard model reaction: Effect of p-coumaric acid. **Food Research International**, v. 84, p. 9–17, jun. 2016.

ZHANG, G. et al. Heavy metals in wetland soils along a wetland-forming chronosequence in the Yellow River Delta of China: Levels, sources and toxic risks. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 331–339, out. 2016.

ZHANG, X.; HU, X.; RAO, X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. **Microbiological Research**, v. 205, p. 19–24, 1 dez. 2017.



ZUORRO, A.; MAFFEI, G.; LAVECCHIA, R. Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. **Journal of Cleaner Production**, v. 111, p. 279–284, jan. 2016.

## APÊNDICE A – Compostos polifenólicos identificados em Georópolis

Autor	Origem da georópolis	Periódico	Compostos Identificados	Técnica utilizada												
Cardozo et al. (2015)	Prudentópolis (PR)	Revista Virtual de Química	Vanilina Ácido p-cumárico 3-hidróxi-4-metóxi-cinamaldeído Ácido cafeico Canferol Canferida Di-hidrocanferida Ácidos E/Z comúnicos Ácido agatálico Ácido cuprêssico Ácido isocuprêssico Ácido 15-acetoxi-isocuprêssico	UPLC-MS												
			Dutra et al. (2014)		Fernando Falcão, Alto Mearim e Grajau (MA)	Journal of Agricultural and Food Chemistry	Gallic acid HHDP-galloylglucose HHDP-glucose Di-HHDP-glucose Trigalloyl glucose HHDP-digalloylglucose isomer Valoneic acid dilactone Trigalloyl-HHDP-glucose isomer Di-HHDP-galloylglucose Trigalloyl-HHDP-glucose Ellagic acid	HPLC-DAD-ESI-MS/MS								
							Silva et al. (2014)		Paraíba	Sociobiology	6-O-p-coumaroyl-D-galactopyranose 6-O-cinnamoyl-1-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranose 7-O-methyl naringenin 7-O-methyl aromadendrin 7,4'-di-O-methyl aromadendrin 4'-O-methyl kaempferol 3-O-methyl quercetin 5-O-methyl aromadendrin 5-O-methyl kaempferol	HPLC				
											Araújo et al. (2016)		Novo Acordo e Santa Maria (TO)	Acta Amazonica	Ellagic acid Gallic acid Catechin Gallocatechin Hesperidin Kaempferol Morin Rutin	HPLC

Araujo et al. (2015)	Palmeirândia (MA)	Journal of Molecular Pathophysiology	Carbohydrates and their derivatives Hexoses Disaccharides Glucuronic acid Pentoses Triterpenes Lupeol Beta-amyrin Triterpenic ketone Alpha-amyrine Beta-amyrinone Alpha-amyrinone Anacardic acid Heptedecenyl salicylic acid isomer Nonadecenyl salicylic acid isomer Nonadecenyl salicylic acid Heptedecenyl salicylic acid Pentadecyl salicylic acid Alkylresorcinols Heptadecylresorcinol Nonadecenylresorcinol Heptadecylresorcinol Pentadecylresorcinol Nonadecenylresorcinol Heptedecadienylresorcinol Sugar alcohols Xylitol Glucitol Sugar alcohol Others Inositol Glycerol Methylmalonic acid	GC-MS
Batista et al. (2016)	Palmeirândia e Fernando Falcão (MA)	Acta Amazonica	Fatty acids: Palmitic Stearic Linoleic Melissic Octenoic Organic acids: Glycolic Gluconic Quinic Sugars: Glucose Fructose Mannose Arabinose	GC-MS

---

Galactose  
Fucose  
Sorbitol  
Xylose  
Ribose  
Aucubin  
Alcohols: Erythritol  
Arabitol  
Sorbitol  
Glycerol  
Xylitol  
Inositol  
Phenolic acids: Protocatechuic  
Gallic  
Ellagic  
Triterpenes: Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo  
 $\beta$ -Amyrin  
Cycloursane  
Cycloartenol  
Steroids: Lanosterol  
Lanosterol acetate

---

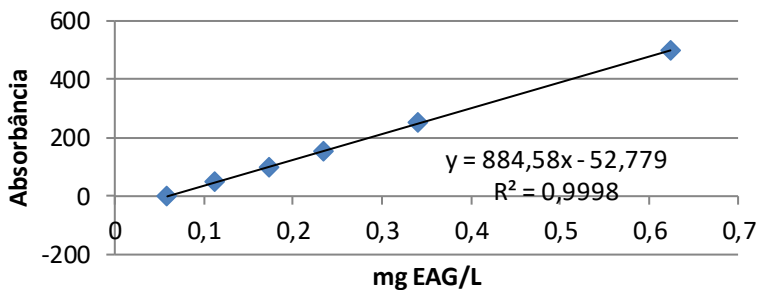
Fonte: desenvolvido pelo autor

**APÊNDICE B – MRM dos compostos fenólicos identificados na matriz geoprópolis em análise por LC-ESI MS/MS.**

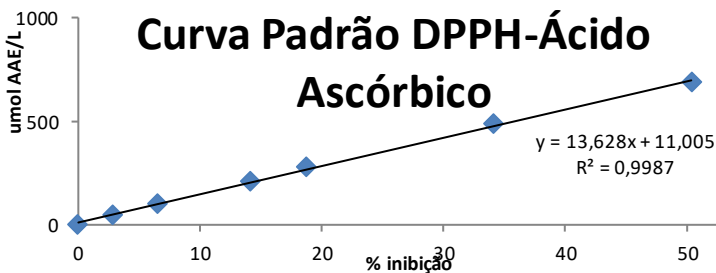
Composto	Íon precursor	Íon de	Tempo de
	( <i>m/z</i> )	identificação ( <i>m/z</i> )	
	Q1 (Da)	Q3 (Da)	retenção (min)
Ácido gálico	168.836	124,1	3,98
Ácido protocatecuico	153.019	109	6,95
Ácido clorogênico	352.863	187,8	9,19
Ácido caféico	178.834	131,3	9,45
Ácido vanílico	166.831	148,5	9,65
Ácido sirínico	196.939	121,1	9,87
Vanilina	150.892	132,8	10,42
Ácido p-cumárico	163.040	119	10,46
4- aminobenzóico	135,85	90,5	10,47
Taxifolina	302.815	120,7	10,7
Rutina	609.147	301	10,72
Ácido ferúlico	192.856	129,7	10,73
Siringaldeído	180.873	163,1	10,76
Ácido rosmarínico	358.995	159,8	10,83
Quercetina	301.010	149,3	10,84
Ácido sinápico	222.885	161,6	10,87
Ácido salicílico	136,9	91,1	10,99
Escopoletina	190.727	172,8	10,99
Aromadendrina	286.824	123,9	11,29
Coniferaldeído	176.865	160,3	11,31
Sinapaldeído	206.901	174,4	11,39
Ácido cinâmico	146.886	100,7	11,8
Eriodictiol	286.823	132,1	11,85
Naringerina	270.847	150,2	12,37
Apigenina	268.794	114,8	12,62
Hispidulina	298.825	282,7	12,72
Galangina	268.811	59.900	13,44
Pinocembrina	254.954	60,7	13,59

**APENDICE C – Curvas de calibração para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total.**

### Curva Padrão - Polifenóis Totais



### Curva Padrão DPPH-Ácido Ascórbico



### Curva Padrão DPPH- Trolox

