

Composição química e atividade biológica da própolis de *Melipona quadrifasciata*

Chemical composition and biological activity of propolis from *Melipona quadrifasciata*

Composición química y actividad biológica del propóleo de *Melipona quadrifasciata*

Recebido: 16/08/2022 | Revisado: 29/08/2022 | Aceito: 03/09/2022 | Publicado: 11/09/2022

Alexandre Piccinini

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2023-1714>
Universidade Federal do Rio Grande, Brasil
E-mail: alepicap13@hotmail.com

Matheus Henrique Oliveira de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2366-8754>
Universidade Federal do Rio Grande, Brasil
E-mail: matheus.furg@gmail.com

Marta dos Santos Diniz Freitas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1778-1152>
Universidade Federal do Rio Grande, Brasil
E-mail: martadiniz79@gmail.com

Karina Cesca

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8932-919X>
Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
E-mail: karinacesca@gmail.com

Neusa Fernandes de Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5744-8242>
Universidade Federal do Rio Grande, Brasil
E-mail: nfmfurg@gmail.com

Resumo

A própolis é um produto viscoso produzido e coletado por abelhas operárias, a partir de brotos ou exsudatos de plantas, utilizados para proteção da colmeia. O objetivo deste trabalho foi realizar o perfil fitoquímico e a atividade biológica da própolis de abelha sem ferrão (ASF) *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) nativa do Rio Grande do Sul, Brasil. A própolis apresentou concentração fenólica total de 126,52 mg g⁻¹, e os principais compostos fenólicos identificados foram ácido *p*-cumárico (35,64 mg g⁻¹) e ácido gálico (18,33 mg g⁻¹). Os carotenóides β-caroteno, β-criptoxantina, luteína e licopeno foram identificados na própolis de *M. quadrifasciata*, sendo que o β-caroteno apresentou a maior concentração (1,56 mg/100g). Os compostos voláteis foram obtidos por headspace e identificados por CG/EM, sendo o α-pineno o composto majoritário, seguido de limoneno, silvestreno e β-pineno. A própolis apresentou alta atividade antiradicalar pelo método DPPH, com EC₅₀ de 2,29 μg mL⁻¹, atividade antimicrobiana (CIM) contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e baixa redução na viabilidade celular das linhagens celulares L929, GL, A549, MDA e SKMEL.

Palavras-chave: Meliponíneos; Abelha sem ferrão; Fenólicos; Carotenóides; Compostos voláteis.

Abstract

Propolis is a viscous product produced and collected by worker bees from shots or plant exudates used for the protection of hive. The aims of this work were to perform the phytochemical profile and biological activity of propolis from stingless bee (SB) *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) native from Rio Grande do Sul, Brazil. The propolis had a total phenolic concentration of 126,52 mg g⁻¹, and the major phenolic compounds identified were *p*-coumaric acid (35,64 mg g⁻¹) and gallic acid (18,33 mg g⁻¹). The carotenoids β-carotene, β-criptoxanthin, lutein and lycopene were identified in the propolis of *M. quadrifasciata*, and β-carotene showed the highest concentration (1.56 mg/100g). The headspace analysis of volatile compounds identified the highest concentration of α-pinene, followed by limonene, sylvestrene and β-pinene. The propolis of *M. quadrifasciata* showed high antioxidant activity by the DPPH method, with EC₅₀ of 2,29 μg mL⁻¹, antimicrobial activity (MIC) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and low reduction in cell viability of cell lines L929, GL, A549, MDA and SKMEL.

Keywords: Meliponines; Stingless bee; Phenolics; Carotenoids; Volatile compounds.

Resumen

El propóleo es un producto viscoso producido y recolectado por abejas obreras, a partir de yemas o exudados de plantas, utilizado para proteger la colmena. El objetivo de este trabajo fue realizar el perfil fitoquímico y la actividad biológica del propóleo de la abeja sin aguijón (ASA) *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) originaria de Rio Grande do Sul, Brasil. El propóleo tuvo una concentración fenólica total de 126,52 mg g⁻¹, y los principales compuestos

fenólicos identificados fueron ácido *p*-cumárico (35,64 mg g⁻¹) y ácido gálico (18,33 mg g⁻¹). Los carotenoides β-caroteno, β-criptoxantina, luteína y licopeno fueron identificados en el propóleo de *M. quadrifasciata*, y el β-caroteno tuvo la mayor concentración (1,56 mg/100g). Los compuestos volátiles se obtuvieron por espacio de cabeza y se identificaron por GC/MS, siendo el α-pineno el compuesto mayoritario, seguido por el limoneno, el silvestreno y el β-pineno. Entre las actividades biológicas realizadas con el propóleo de *M. quadrifasciata*, mostró alta actividad antirradicalaria por el método DPPH, con EC₅₀ de 2,29 µg mL⁻¹, actividad antimicrobiana (MIC) contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y baja reducción en la viabilidad celular de las líneas celulares L929, GL, A549, MDA y SKMEL.

Palabras clave: Meliponinas; Abeja sin aguijón; Fenólicos; Carotenoides; Compuestos volátiles.

1. Introdução

A própolis é uma substância viscosa produzida pela mistura de secreções de insetos (saliva e cera) com resinas vegetais coletadas de plantas por abelhas. Esse produto é importante para a construção do ninho e o bem-estar da colônia (Salatino, 2019), sendo usada para selar a colmeia e impedir a entrada de ar ou visitantes indesejados. Além disso, as propriedades antimicrobianas da própolis proporcionam uma defesa química contra microorganismos das próprias abelhas e do seu mel (Sanches, 2017 & Simone-Finstrom, 2010).

Devido às suas propriedades biológicas, a própolis é usada na medicina alternativa como remédio para prevenir e tratar de resfriados, feridas, úlceras entre outros. Popularmente é utilizado na cicatrização de feridas e como antisséptico, na forma de extrato (hidroalcoólico). Estudos comprovam que a própolis possui atividade medicinal, entre elas antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatórias, imunomoduladoras, antinociceptivas, anti-helmínticas e antiproliferativas (Sanches, 2017; Kasote et al., 2019; Campos et al., 2014; Pazin et al., 2017; Souza et al., 2014 & Cervantes et al., 2020).

As abelhas sem ferrão (ASF), também chamadas de abelhas indígenas ou meliponíneos, fazem parte de um grupo de abelhas com ferrão atrofiado (Witter, 2008). A domesticação de ASF, a exploração de seus produtos e os ganhos derivados da polinização desses insetos remonta aos tempos pré-colombianos. No Brasil, os povos indígenas Kayapó, presentes na floresta tropical brasileira, usam várias espécies de abelhas sem ferrão para obter mel e pólen (Laurino et al., 2006).

A própolis obtida de várias espécies de ASF tem ganhado muita atenção de pesquisadores no mundo devido ao seu potencial farmacológico (Lavinias et al., 2019). Seu uso comercial permanece limitado, pois pouco se sabe sobre a composição química e propriedades biológicas, ou se a produção de própolis dessas espécies é economicamente viável.

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão a *Melipona quadrifasciata*, popularmente conhecida como mandaçaia, é encontrada em grande parte do território brasileiro. A literatura descreve a presença de compostos fitoquímicos com atividades antimicrobianas, antirradicalar e citotóxica, entre eles o ácido caurenóico, estigmasterol, ácido cafeico, quercetina, luteolina, ácido *p*-cumárico, catequina, apigenina (Santos et al., 2017 & Torres et al., 2018).

Curiosamente, a própolis de *M. quadrifasciata* é conhecida como geoprópolis por apresentar traços de solo em sua composição. A composição química da própolis de *M. quadrifasciata* varia amplamente e depende diretamente da flora local e da relação das plantas hospedeiras com o clima, e indiretamente da localização e época da coleta (Bankova, 1992). Esses fatores contribuem para que a própolis produzida por *M. quadrifasciata* apresente características químicas e biológicas distintas. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição química da própolis produzida por *M. quadrifasciata* localizada na região sul do Brasil e investigar seu potencial antirradicalar, antibacteriano e citotóxico.

2. Metodologia

2.1 Abelhas e amostras

A espécie de abelha estudada foi coletada em 26 de novembro de 2019 e identificada pelo PhD. Betina Blochtein como *Melipona quadrifasciata* (em Gravataí – RS – Brasil, georreferenciado em 29°57'24,41"S e 50°55'8,91"W). A própolis desta espécie foi coletada em frascos estéreis e mantida sob refrigeração de 1 a 6 °C para futuro processamento e análise.

2.2 Preparação dos extratos

A própolis foi triturada até obtenção de pó (0,5 g) e então adicionado 25 mL de metanol. A solução metanólica foi agitada em sonicador por 20 minutos, deixada em repouso por uma hora e novamente levada ao sonicador por 10 minutos. Em seguida, a amostra ficou em repouso por 24 horas para extração. Após 24 horas a amostra foi levada ao sonicador por 30 minutos, seguida de centrifugação e filtração em papel para remover qualquer material particulado na suspensão. Posteriormente, parte do extrato foi liofilizado para análises biológicas.

2.3 Determinação de fenólicos totais (FT)

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Denis (Brand-Williams, 1995) com uma ligeira modificação. 50 µL do extrato metanólico de própolis foram misturados com 250 µL de reativo de Folin-Denis, 500 µL de solução supersaturada (40%) de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e 4,2 mL de água destilada. Os tubos foram agitados em vórtex e depois incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após a incubação, a amostra foi filtrada em filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) (0,45 µm), e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 760 nm em espectrofotômetro Halo SB10 UV-VIS.

2.4 Determinação de atividade antiradicalar (AA)

A atividade antiradicalar do extrato metanólico de própolis foi determinada pelo método DPPH (Brand-Williams, 1995). Alíquotas de 1,0 mL solução de DPPH (60 µmol L⁻¹) foram adicionadas a 2,5 mL solução de extrato metanólico, em 4 diferentes concentrações, obtendo-se 3,5 mL de volume total. As misturas foram mantidas no escuro, por 30 minutos, em seguida a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Halo SB-10 UV/VIS). O resultado foi apresentado em valores de EC₅₀ (concentração que apresenta 50% de atividade antiradicalar).

2.5 Identificação e quantificação de fenólicos

O extrato metanólico foi pré-tratado em cartucho C-18 ec (Chromabond®) para limpeza, filtrado através de um filtro de membrana PTFE de 0,45µm e depois injetados no CLAE.

As análises quantitativas dos compostos fenólicos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Gualberto (2013) com modificações. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu), composto por um módulo de injeção automática (SIL-20A HT), módulo forno de coluna (CTO-20A) e módulo detector DAD (SPD-MS20A). Para obter os cromatogramas, foi utilizada uma coluna Restek Ultra C 18 (250 x 4,6 mm, 4,8 µm). O método do gradiente utiliza uma mistura de água acidificada com ácido acético a 1% (Fase A) e acetonitrila (Fase B). O tempo total de corrida foi de 50 minutos e o gradiente de concentração variou de 5 a 100% B em 35 minutos, permaneceu em 100% B até 40 minutos, depois retornou a 5% B até 50 minutos. Foi utilizada uma taxa de fluxo constante de 0,9 mL·min⁻¹ e temperatura do forno de 40°C. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. A faixa de detecção do PDA (detector) foi de 200 a 500 nm. A quantificação das análises foi obtida pelo método de calibração externa e os padrões utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich.

2.6 Quantificação de Carotenoides

A amostra de própolis foi triturada em almofariz e 0,2 g foram pesados em tubo Falcon, ao qual foram adicionados 2 mL de metanol e agitados em vórtex por 20 segundos. Em seguida, foi adicionado 8 mL de Tetrahydrofurano (THF) e a amostra novamente agitada por 1 minuto para extração completa. Em seguida, a amostra foi centrifugada e uma alíquota do sobrenadante filtrada através de um filtro de membrana PTFE de 0,45 µm para remover o material particulado e então seguiu para análise em CLAE. Os padrões utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich. A quantificação foi realizada por calibração de adição padrão.

A separação dos compostos foi utilizando o eluente acetonitrila (Fase A), metanol (Fase B) e THF (Fase C). A corrida foi realizada no modo gradiente, mantida em 50:40:10 (A:B:C) de 0 a 5 minutos, alterada para 40:40:20 (A:B:C) de 5 a 15 minutos, e voltou para 50:40:10 (A:B:C) de 15 a 20 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹, com temperatura de 40°C e volume de injeção de 20 µL. A detecção foi realizada através de um detector PDA no comprimento de onda de 470 nm.

2.7 Compostos Voláteis

A extração dos compostos voláteis foi realizada por headspace a 80°C por 15 minutos utilizando aproximadamente 1,0 g de própolis triturada em um frasco de vidro de 20,0 mL. Um mililitro da fase vapor do headspace foi injetado no espectrômetro de massa tandem de cromatografia gasosa (Shimadzu modelo GC-MS/MS TQ8050), equipado com um amostrador automático AOC 6000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A injeção no modo splitless usou hélio como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 1,02 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 220°C. Uma coluna capilar de sílica fundida modelo RTX-5MS (5% fenil-95% polidimetilsiloxano, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) foi empregada na separação dos compostos. A temperatura do forno foi programada de 60°C a 246°C a uma taxa de 3°C·min⁻¹. O espectrômetro de massa foi utilizado com ionização eletrônica (70 eV) e varredura de massa na faixa de 41 a 415 Da. As temperaturas da fonte de íons e da interface CG-EM/EM foram 220 e 240 °C, respectivamente. Os índices de retenção aritmética (IR) foram calculados em referência a uma solução padrão de n-alcenos (C8 – C30) e comparados com os dados de IR de Van Den Doll e Kratz (Adams, 2017) para identificação dos compostos. Além disso, eles foram identificados comparando seus espectros de massa com a biblioteca espectral do NIST.

2.8 Atividade antimicrobiana

O teste de avaliação da atividade antimicrobiana (CIM) foi realizado de acordo com a metodologia usada por Suffredini et al. (2004) e por Da Silva (2008), seguindo os protocolos de microdiluição em caldo da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Para determinação do CIM os seguintes microorganismos foram utilizados: *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). As bactérias liofilizadas foram ativadas em tubo contendo 0,5 mL de caldo nutritivo e incubadas a 37 °C por 48 h. Após o período de incubação, foi transferida uma alíquota de cada cultura bacteriana para tubos contendo solução salina a 0,8%. A turvação da suspensão microbiana é padronizada de acordo com a escala nefelométrica de MacFarland, em 0,5 que corresponde à concentração de 1,5x10⁸ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL). O meio de cultura utilizado para a suspensão microbiana e diluição do extrato metanólico liofilizado de própolis foi o Caldo Caseína de Soja. Cada poço das placas de poliestireno foi preenchido com 100 µL da suspensão microbiana, exceto as duas últimas fileiras; na primeira foi adicionado o Caldo Caseína de Soja estéril (controle do branco – CB), e a fileira seguinte foi preenchida com o controle positivo Cloranfenicol. Ao final do procedimento as placas foram tampadas e incubadas em estufa a 37 °C por 24h. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas com auxílio do revelador Cloreto de Trifenil Tetrazólico (TTC 0,5%).

2.9 Análise citotóxica

O extrato metanólico liofilizado da própolis foi solubilizado em DMSO sendo posteriormente diluídos nos meios de cultura adequados para as concentrações de 50µg/mL e 500µg/mL. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados para as linhagens celulares de adenocarcinoma NSCLC (células A549), adenocarcinoma de mama humana (células MDA-MB-231), melanoma maligno da pele humana (SK-Mel-28), glioblastoma de camundongos (GL261), glioma (C6) e melanoma (B16F10). A linha celular do fibroblasto do rato (L929) foi usada como células de controle. As células foram cultivadas em DMEM (meio modificado da Águia de Dulbecco, Gibco®, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS; Gibco®, EUA) e antibiótico (penicilina e estreptomicina) (Gibco®, EUA). Todas as linhas celulares foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de 1.104 células/poço e mantidas 24 horas a 37°C em uma incubadora de CO₂ para fixação. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi aspirado, e as células foram tratadas com a própolis no meio de cultura e mantidas em contato com as células pelo período de 24 horas em incubadora. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo (10 µg mL⁻¹), DMSO foi utilizado como controle negativo, e o controle foi constituído apenas do meio de cultura. Após o período de incubação o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato salina (PBS), e em seguida fez a adição de uma mistura de 100µL do meio de cultura e 60 µL do reagente MTS (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxymetoxifenil)-2-(4-sulfonil) 2H-tetrazolium) em cada poço.

As placas foram mantidas sob incubação por 2 horas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após essa incubação, a solução foi transferida para uma nova placa de 96 poços para a realização da leitura da densidade óptica obtida através de análise em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm.

3. Resultados e Discussão

3.1 Composição fitoquímica

Nos últimos anos, a literatura tem apresentado diversos estudos que relatam a composição química da própolis de abelhas sem ferrão (Popova, 2021), principalmente no que diz respeito à análise qualitativa, mas a análise quantitativa é de grande importância, pois a concentração de um composto pode alterar a atividade biológica da própolis. Os compostos fenólicos são uma das classes mais identificadas nos estudos com própolis, principalmente pelo fato que os compostos fenólicos, pela sua estrutura, são potentes antioxidantes.

A concentração encontrada neste estudo de fenólicos totais para própolis de *M. quadrifasciata* (P1) (126,52 mg g⁻¹) foi dezesseis vezes superior à encontrada no Paraná (7,74 mg g⁻¹) (Cardozo et al., 2015). Esse resultado mostra que embora Paraná e Rio Grande do Sul sejam geograficamente próximos e possuam características climáticas semelhantes, os resultados são muito diferentes, principalmente devido à vegetação da área de forrageamento das abelhas.

A Tabela 1 apresenta os dez compostos fenólicos identificados na própolis da *M. quadrifasciata*, entre os compostos fenólicos, o ácido p-cumárico (35,64 mg g⁻¹) é o composto majoritário, seguido pelo ácido gálico (18,33 mg g⁻¹). Estes compostos já foram identificados em própolis de ASF, sendo que Ferreira et al. (2019) identificou em própolis da *M. quadrifasciata*, porém em concentrações inferiores às encontradas neste trabalho.

Na própolis da espécie *Melipona scutellaris*, foi identificada a presença de catequina, campferol e rutina, compostos encontrados neste estudo na amostra de própolis da espécie *Melipona quadrifasciata*. A catequina também foi encontrada em própolis de outras espécies como a *Melipona fasciculata* (Araújo, 2016), assim como o ácido p-cumárico e ácido caféico em própolis de *Melipona quadrifasciata* e *Melipona marginata* (Cardozo et al., 2015).

Tabela 1. Compostos fenólicos (mg g⁻¹) de própolis de *Melipona quadrifasciata*.

Padrão	Própolis
1-Ácido cinâmico	2,69 ± 0,30
2-Ácido ferulico	3,85±0,19
3-Ácido gálico	18,33±0,22
4-Ácido p-cumárico	35,64 ± 0,43
5-Rutina	1,28 ± 0,81
6-Ácido protocatecuico	ND*
7-Quercetina	3,46 ± 0,93
8-Catequina	2,18 ± 0,78
9-Ácido cafeico	9,36 ± 0,37
11-Campferol	6,15 ± 0,96
12-Ácido clorogênico	4,49 ± 0,23

*Não detectado (ND). O teor dos compostos representativos é apresentado como a média +- o desvio padrão (n=3). Fonte: Autores.

Os carotenoides são terpenos encontrados em uma grande variedade de espécies vegetais. São responsáveis pela coloração e também por diversas atividades biológicas. A Tabela 2 apresenta os carotenoides identificados na própolis da *M. quadrifasciata*, sendo o β -caroteno o composto majoritário presente. Cruz (2020) encontrou 1,55 mg g⁻¹ de β -caroteno na geoprópolis de *Melipona scutellaris*, resultado muito superior ao encontrado em nosso estudo. No entanto, os achados de Mouhoubi-Tafinine (2016) em própolis de abelhas *A. mellifera* variaram significativamente de 25,82 a 44,37 mg 100g⁻¹.

Tabela 2: Carotenoides (mg 100g⁻¹) de própolis de *Melipona quadrifasciata*.

Padrão	Própolis
β -caroteno	1,56 ± 0,29
β -criptoxantina	0,25 ± 0,03
Licopeno	0,09 ± 0,02
Luteína	0,32 ± 0,05

O teor dos compostos representativos é apresentado como a média +- o desvio padrão (n=3). Fonte: Autores.

A própolis tem uma grande variedade de compostos voláteis influenciados por espécies de plantas conhecidas pelas abelhas (Bankova, 2014). A variação das fontes vegetais influencia muito em como a composição dos compostos voláteis pode melhorar as propriedades da própolis devido ao seu aroma e atividade biológica e pode fornecer informações sobre a origem das amostras relacionadas à sua rastreabilidade (Falcão, 2016). Leonhardt (2010) mostrou que as abelhas sem ferrão de Bornéu usam pistas olfativas para encontrar árvores das quais coletam resinas. Especificamente, eles usam mono e sesquiterpenos para localizar e reconhecer a fonte das resinas.

A Tabela 3 apresenta os compostos voláteis obtidos por headspace. Nesta extração, monoterpênicos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos e ésteres foram identificados na própolis de *M. quadrifasciata*, onde predominam os monoterpênicos hidrocarbonetos, sendo o α -pineno o composto majoritário. Este composto é encontrado em *Baccharis uncinella*, espécie presente no local onde as abelhas tinham sua colmeia (Frizzo, 2001).

Tabela 3. Compostos voláteis da própolis de *Melipona quadrifasciata*.

Compostos	IR*Literatura	IRPrático	<i>M. quadrifasciata</i>
acetato de butila	807	851	0,53
éter metílico de carvacrol	1241	1246	0,48
acetato de fencila	1229	1223	0,05
acetato de isobornila	1283	1289	0,18
<i>n</i> -nonano	900	906	-
triciclono	921	914	0,2
α -Tujeno	924	933	5,27
α -pineno	932	945	34,2
fencheno	945	954	2,79
canfeno	946	955	3,03
verbeneno	961	961	-
sabineno	969	979	1,26
β -pineno	974	984	5,89
mirceno	988	996	4,21
felandreno	1002	1010	0,89
silvestreno	1025	1016	6,72
α -terpineno	1014	1021	3,16
ρ -cimeno	1020	1028	4,9
limoneno	1024	1032	6,51
β -ocimeno	1044	1049	0,23
Υ -terpeneno	1054	1061	3,22
terpinoleno	1086	1092	4,49
fenchol	1118	1117	-
α -camfolenal	1122	1129	0,09
t-sabinol	1137	1142	0,11
tagetone	1148	1148	0,23
β -terpineol	1156	1152	0,11
isoborneol	1155	1160	0,05
pinocarvona	1160	1166	0,05
borneol	1165	1169	0,48
terpineno-4-ol	1174	1180	2,15
cimen-8-ol	1179	1188	0,1
α -terpineol	1186	1194	0,67
mirtenal	1195	1200	0,08
verbenona	1204	1213	0,06
α -cubebeno	1345	1352	0,66
α -copaeno	1374	1379	0,15
longifoleno	1407	1408	0,76
β -humuleno	1436	1443	-
α -himacaleno	1449	1452	-

β -farneseno	1454	1459	-
<i>E</i> -cariofileno	1464	1464	-
cadina-1-(6),4-dieno	1475	1477	0,09
Υ -himacaleno	1481	1481	-
curcumeno	1481	1485	0,05
cadina-1,4-dieno	1495	1504	-
alascueno	1512	1516	0,05
Υ -cadineno	1513	1527	0,12
β -cariofileno	1423	1423	-
bisaboleno	1514	1512	-
<i>E</i> -nerolidol	1561	1566	-
maaliol	1566	1571	-
espatulenol	1577	1583	-
cedrol	1600	1605	0,05
junenol	1618	1623	-

Fonte: Autores. (*Adams, 2017).

Pino (2006) encontrou 94 voláteis na própolis de *Melipona beecheii*, sendo os majoritários: α -pineno, β -cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno, β -bourboneno, β -pineno, α -copaeno e trans-verbenol. Bankova et al. (1999) encontrou hidrocarbonetos alifáticos como C8-C25, hidrocarbonetos aromáticos p-cimen-8-ol, verbenona, espatulenol, terpinen-4-ol, α -pineno, β -pineno e p-cimeno, predominantemente de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

As abelhas sem ferrão coletam diferentes resinas, aproveitando a biodiversidade local. Como as abelhas dependem da resina para proteção, elas se beneficiam mais quando têm acesso a diversas fontes de resina. Como resultado, a composição química de sua própolis pode ser muito mais complicada, combinando os perfis de resina de duas ou até três espécies de plantas não relacionadas (Popova, 2021).

3.2 Atividade biológica

A presença de compostos fenólicos, seja em grandes ou pequenas concentrações, está relacionada com a capacidade antirradicalar e seus arranjos estruturais causam a inativação de radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou pela complexação de metais, o que ocorre devido à presença de grupos hidroxila, ligações duplas conjugadas e grupos carbonila (Pazin, 2017).

A própolis de *M. quadrifasciata* apresentou EC_{50} de 2,29 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando grande potencial antirradicalar. A literatura apresenta, para própolis da mesma espécie, uma variação na atividade antirradicalar, porém inferior ao resultado encontrado neste trabalho. Bonamigo et al. (2017) obteve EC_{50} de 60,91 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto Cardozo et al. (2015) encontrou 387 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A própolis é um produto apícola com grande potencial farmacológico e de interesse econômico. Na medicina popular, a própolis tem seu uso associado à atividade antisséptica e antimicrobiana (Barboza et al., 2020). Essas atividades dependem da composição química da própolis, que varia de acordo com a região de coleta, pois se sabe que o material coletado é proveniente das plantas que as abelhas visitam.

A própolis da *M. quadrifasciata* apresentou atividade contra as duas cepas testadas, *Staphylococcus aureus* (CIM 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e *Escherichia coli* (CIM 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Santos et al. (2017) e Torres et al. (2018) avaliaram a atividade

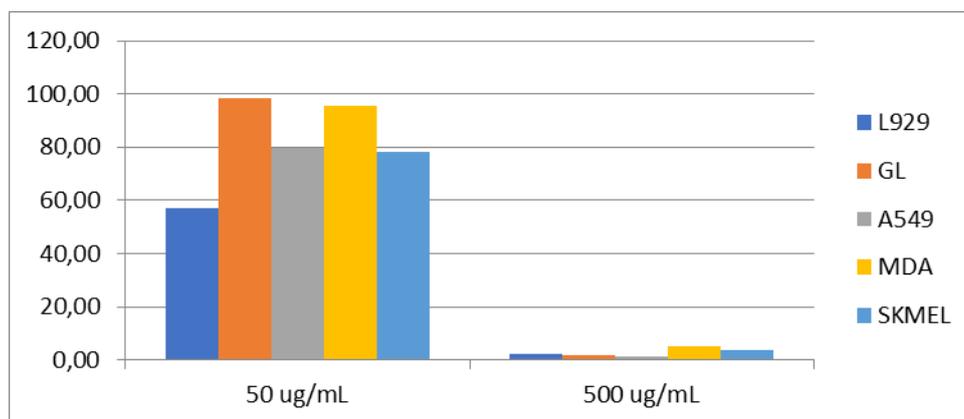
antimicrobiana da própolis de *M. quadrifasciata* contra esses dois microrganismos e relataram valores de CIM próximos aos encontrados em nosso trabalho. Esses autores encontraram em seus trabalhos o ácido *p*-cumárico e seus derivados.

O ácido *p*-cumárico foi o composto fenólico encontrado em maior concentração na própolis analisada neste trabalho. Sabe-se que o ácido *p*-cumárico foi estudado isoladamente por Lou et al. (2012) contra bactérias e mostrou ter um mecanismo duplo de atividade antibacteriana, rompendo as membranas das células bacterianas e ligando-se ao DNA genômico para inibir as funções celulares.

A busca por novos medicamentos derivados de produtos naturais para uso no tratamento do câncer tem aumentado nos últimos anos. A própolis é um dos objetos de estudos com potencial citotóxico, pois tem apresentado resultados satisfatórios para essa atividade em alguns estudos (Popova, 2021; Campos et al., 2014 & Cisilotto et al., 2018).

A Figura 1 apresenta os resultados encontrados para a própolis da *M. quadrifasciata* frente às linhagens celulares testadas. Os resultados encontrados demonstram que as células L929 (Fibroblasto murinho) e SKMEL (Câncer de pele) apresentam menor viabilidade celular quando tratadas com própolis em concentração de 50 mg·mL⁻¹. Em relação às células MDA e GL, a viabilidade celular foi superior a 90% quando tratadas com própolis, o que demonstra que a própolis tem baixo efeito contra essas linhagens celulares. Aumentando a concentração da própolis para 500 mg·mL⁻¹ observamos uma diminuição de viabilidade celular para todas as linhagens de células testadas.

Figura 1: Viabilidade celular para L929 (Fibroblasto murino), GL (Glioma murino), A549 (adenocarcinoma pulmonar), MDA (Adenocarcinoma mamário) e SKMEL (Câncer de pele) tratadas com própolis de *M. quadrifasciata*.



Fonte: Autores.

A composição química encontrada para a própolis de *M. quadrifasciata* possui alta concentração de ácidos fenólicos, que podem ser responsáveis por essa atividade citotóxica, uma vez que os ácidos fenólicos como os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico e seus derivados desempenham um papel vital na prevenção e tratamento do câncer (Kumar, 2019).

Cisilotto et al. (2018) e Barboza et al. (2020) também encontraram atividade para a própolis de *Meliponas* contra células tumorais de câncer de pulmão e pele, porém com melhores valores de citotoxicidade. Essa diferença de atividade está diretamente relacionada à composição química da própolis, tanto qualitativa quanto quantitativamente.

4. Considerações Finais

A própolis da *M. quadrifasciata* apresenta compostos bioativos com potencial uso medicinal. Entre os compostos encontrados destacam-se os ácidos fenólicos, β -caroteno e α -pineno. Os compostos fenólicos destacam-se pela excelente

atividade antirradicalar apresentada pela própolis. Estudos acerca da atividade citotóxica da própolis devem seguir, visto que em concentrações maiores a resposta é bastante positiva na redução de viabilidade celular de tumores.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com apoio financeiro da CAPES.

Referências

- Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Allured business media*, 4.1.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I., & Kujumgiev, A. (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70, 190-193.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., & Kuleva, L. (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23, 79-85.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem. Cent. J.*, 8-28.
- Barboza, J. R., Pereira, F. A. N., Fernandes, R. A., Vasconcelos, C. C., Cartágenes, M. S. S., Lopes, A. J. O., Melo, A. C., Guimarães, I. S., Rocha, C. Q., & Ribeiro, M. N. S. (2020). Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *Biology*, 9, 292; doi:10.3390/biology9090292.
- Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo, T. M., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., Souza, K. P., & Santos, E. L. (2017). Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid. Med. Cell. Longevity*.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.*, 28, 25–30.
- Campos, J. F., Santos, U. P., Macorini, L. F. B., Mestriner, A. M., Balestieri, J. B. P., Gamero, E. J. P., Cardoso, C. A. L., Souza, K. P., & Santos, E. L. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbigny* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.*, 65, 374-380.
- Cardozo, D. V., Mokochinski, J. B., Schineider, C. M., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, I. K., Felsner, M. L., & Torres, Y. R. (2015). Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão jataí, mandaçaia e manduri. *Rev. Virtual Quim.*, 7, 2457-2474.
- Cervantes, J. A. C., Martínez, J. G. S., Uribe, A. J. R., Saucedo, M. L. V., Castro, J. L. R., Castañeda, R. P., Martínez, Z. B., Olvera, L. G., & González, F. B. (2020). Effect of propolis, a honeybee product, against a parasite (*Ligictalurus floridanus*) from catfish (*Ictalurus punctatus*). *Acta Parasitol.*
- Cisilotto, J., Sandjo, L. P., Faqueti, L. G., Fernandes, H., Joppi, D., Biavatti, M. W., & Creczynski-Pasa, T. B. (2018). Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149 502–511.
- Cruz, L. F. S., Santos, T. S., Souza, C. O., Santos, L. S. M., & Druzian, J. I. (2020). Determination of physicochemical characteristics and bioactive compounds in samples of pollen, geopropolis and honey from *Melipona Scutellaris* bee species. *Braz. J. Develop.*, 6, 21484-21496.
- Falcão, S. I., Freire, C., Figueiredo, A. C., & Vilas-Boas, M. (2016). The Volatile Composition of Portuguese Propolis Towards its Origin Discrimination. *Rec. Nat. Prod.*, 10, 176-188.
- Ferreira, B. L., Gonzaga, L. V., Vitalib, L., Mickeb, G. A., Maltezc, H. F., Ressureição, C., Costa, A. C. O., & Fetta, R. (2019). Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. *Food Research International*, 126 108683.
- Frizzo, C. D., Serafini, L. A., Dellacassa, E., Lorenzo, D., & Moyna, P. (2001). Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. *Flavour Fragrance J.*, 16, 286–288.
- Gualberto, N. C. (2013). Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD em polpa de frutas de cajá umbu (*Spondias spp.*) e graviola (*Ammona muricata L.*). Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Sergipe, 122p.
- Kasote, D. M., Pawar, M. V., Gundu, S. S., Bhatia, R., Nandre, V. S., Jagtap, S. D., Mahajan, S. G., & Kulkarni, M. V. (2019). Chemical profiling, antioxidant, and antimicrobial activities of Indian stingless bees propolis samples. *J. Apicult, Research*, 4, 617-625.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24.
- Laurino, M. C., Fonseca, V. L. I., Roubik, D. W., Dollin, A., Heard, T., Aguilar, I., Venturieri, G. C., Eardley, C., & Neto, P. N. (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37, 275-292.
- Lavinias, F. C., Macedo, E. H. B. C., Sá, G. B. L., Amaral, A. C. F., Silva, J. R. A., Azevedo, M. M. B., Vieira, B. A., Domingos, T. F. S., Vermelho, A. B., Carneiro, C. S., & Rodrigues I. A. (2019). Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 29, 389-399.
- Leonhardt, S. D., Zeilhofer, S., Bluthgen, N., & Schmitt, T. (2010). *Chem. Senses*, 35, 603-611.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., & Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2), 550–554.

- Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S. & Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some Algerian honey and propolis. *Ind. Crops Prod.*, 18, 85-90.
- Pazin, W. M., Mónico, L. M., Soares, A. E. E., Miguel, F. G., Berretta, A. A., & Ito, A. S. (2017). Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. *J. Apicult. Research*, 56, 40-49.
- Pino, J. A., Marbot, R., Delgado, A., Zumárraga, C., & Sauri, E. (2006). *J. Essent. Oil Res.*, 18, 53-56.
- Popova, M., Trusheva, B. & Bankova, V. (2021). Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. *Phytomedicine* 86 153098.
- Salatino, A., Pereira, L. R. L., & Salatino, M. L. F. (2019). The emerging market of propolis of stingless bees in tropical countries. *Department of Botany, University of São Paulo, Brazil*, 7 Issue 2.
- Sanches, M. A., Pereira, A. M. S., & Serrão, J. E. (2017). Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). *J. Apicult. Research*, 56, 50-57.
- Santos, C. M., Campos, J. F., Santos, H. F., Balestieri, B. P., Silva, D. B., Souza, K. P., Carollo, C. A., Estevinho, L. M., & Santos, E. L. (2017). Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioids*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume, Article ID 8320804, 13 pag.
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41, 295-311.
- Souza, S. A., Dias, T. L. M. F., Silva, T. M. G., Falcão, R. A., Moreira, M. S. A., Silva, E. M. S., Camara, C. A., & Silva, T. M. S. (2014). Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, 61, 560-565.
- Torres, A. R., et. al. (2018). Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 51, 1-10.
- Torres, A. R., Sandjo, L. P., Friedemann, M. T., Tomazzoli, M. M., Maraschi, M., Mello, C. F., & Santos, A. R. S (2018). Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(6): e7118, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20187118>.
- Witter, S., & Blochtein, B. (2008). Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul. *Versátil Artes Gráficas*, Porto Alegre – BR, 1.