

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIEL MARTINS MORAES

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*:
ENSAIOS *in vitro* E *in vivo* EM MODELO DE *Galleria mellonella***

ALFENAS/MG

2026

GABRIEL MARTINS MORAES

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*:
ENSAIOS *in vitro* E *in vivo* EM MODELO DE *Galleria mellonella***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

ALEFNAS/MG

2026

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Moraes, Gabriel Martins.

Determinação da composição química e avaliação da atividade biológica do extrato etanólico de própolis de *Frieseomelitta varia* : ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella* / Gabriel Martins Moraes. - Alfenas, MG, 2025.

118 f. : il. -

Orientador(a): Masaharu Ikegaki.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Abelha sem ferrão. 2. Produtos naturais. 3. Compostos fenólicos. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana. I. Ikegaki, Masaharu, orient. II. Título.

GABRIEL MARTINS MORAES

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*: ENSAIOS *in vitro* E *in vivo* EM MODELO DE *Galleria mellonella*

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovado em: 18 de dezembro de 2025.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Priscilla Siqueira Melo

Instituição: Universidade de São Paulo – ESALQ

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Masaharu Ikegaki, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2025, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1695687** e o código CRC **C9A3B7A0**.

Ao infinito universo que envolve minha existência e nutre minha espiritualidade, fonte inesgotável de sabedoria e inspiração ao longo desta jornada. A mim mesmo, por ter enfrentado desafios, encontrado forças e perseverado para alcançar este momento tão significativo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente à Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) pelo apoio institucional, espaço e recursos fornecidos para a realização deste projeto. Sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento e futura conclusão deste trabalho.

Sou imensamente grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro concedido na forma de bolsa durante a execução deste projeto, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo à pesquisa e formação acadêmica.

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ-02122-22) também contribuiu diretamente para a infraestrutura experimental deste estudo, por meio do financiamento destinado à criação e manutenção das larvas de *Galleria mellonella*, modelo biológico essencial para a realização dos ensaios que sustentam esta dissertação.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Masaharu Ikegaki, pela oportunidade de desenvolver este projeto sob sua supervisão. Agradeço também pelo espaço e pela confiança depositada em mim ao longo dessa jornada.

Expresso minha gratidão às minhas veteranas e parceiras de laboratório, Sarah Valero Cochut e Rafaela Franco Dias Bruzadelli, que contribuíram significativamente para a idealização deste projeto. Elas me ensinaram, treinaram, ajudaram e apoiaram em diversas etapas, seja colaborando diretamente comigo ou realizando testes que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Agradeço também a Ana Sofia Martelli Chaib Saliba, Adna Prado Massarioli e ao Prof. Severino Matias de Alencar, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP), parceiros responsáveis pela execução do ensaio antioxidante ORAC e pelas análises cromatográficas utilizadas na determinação dos compostos bioativos dos extratos.

Agradeço também a todas as pessoas que cruzaram meu caminho durante a

pós-graduação, sejam professores, técnicos, profissionais ou colegas, com um destaque especial aos membros do Laboratório de Bioprocessos. Cada uma delas possui um significado especial e essencial em minha trajetória. Não é possível me esquecer de ninguém, pois cada indivíduo contribuiu com pequenos e belos detalhes que foram determinantes para o meu desenvolvimento acadêmico, espiritual e pessoal.

Por fim, expresso meu agradecimento ao Todo, ao universo, ao Tao, à Centelha Divina, àquele com muitos nomes, em quem professo minha fé e espiritualidade. Sou grato às forças espirituais que me guiaram ao longo dessa jornada, fornecendo inspiração, força e direção em todos os momentos.

Desejo expressar minha profunda gratidão pelo esforço e dedicação que empreguei na construção deste trabalho e pela conquista que este momento representa. Cada desafio superado e cada pequena vitória ao longo do percurso contribuíram intensamente para meu crescimento acadêmico e pessoal. Sou sinceramente grato por esta jornada transformadora, que ampliou meus conhecimentos, fortaleceu minha determinação e marcou minha trajetória de forma especial.

“[...], Mas Deus, em sua manifestação suprema, onde a plenitude de Seu Ser encontra sua expressão final no último e todo abrangente de seus atributos, é chamado Eu”

(AMIT GOSWANI, 1993)

RESUMO

Os produtos naturais desempenham papel essencial no desenvolvimento científico, fornecendo compostos bioativos com potencial aplicação em saúde e biotecnologia. Este estudo investigou a composição química e a atividade biológica dos extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia*, uma abelha sem ferrão pouco estudada. As amostras foram coletadas em Viçosa, Minas Gerais, e extraídas por maceração com etanol P.A., devido à sua eficiência na extração de compostos bioativos, seguindo protocolo padronizado. Para ampliar o conhecimento sobre a bioatividade desta própolis, foram quantificados os compostos fenólicos totais e flavonoides totais, avaliadas a capacidade antioxidante por diferentes métodos (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC) e investigadas a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, bem como a toxicidade *in vivo* utilizando *Galleria mellonella* como modelo experimental. A quantificação de fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, variou entre $21,57 \pm 2,2$ e $25,65 \pm 1,21$ mg GAE/g de extrato, ligeiramente superior a valores previamente reportados para a espécie, enquanto o teor de flavonoides totais foi de $0,1314 \pm 0,069$ mg EQ/g. A análise química revelou que os extratos são ricos em terpenoides, destacando-se ácido corosólico, ácido desidroabiético e ácido betulínico. A atividade antioxidante foi expressiva: DPPH variou de $21,69 \pm 0,46$ a $30,72 \pm 0,74$ $\mu\text{mol TEAC/g}$; ABTS, de $162,02 \pm 5,74$ a $237,58 \pm 1,81$ $\mu\text{mol TEAC/g}$; FRAP, de $52,47 \pm 2,42$ a $54,65 \pm 4,62$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$; e ORAC, de $1,287 \pm 0,65$ a $2,276 \pm 0,50$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$, evidenciando o potencial antioxidante. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi observada contra *Bacillus cereus*, com CIM entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, não havendo efeito sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Candida albicans*. A avaliação de toxicidade *in vivo* em *G. mellonella*, com dose de 1600 mg/kg, não apresentou diferenças significativas na sobrevivência ou no índice de saúde em relação ao controle, indicando baixa toxicidade dos EEP. Entretanto, a própolis não demonstrou atividade antimicrobiana *in vivo*, não impedindo a mortalidade das larvas infectadas por *B. cereus*. A escassez de estudos sobre a própolis de *F. varia* dificulta comparações com a literatura, reforçando a relevância desta pesquisa para ampliar o conhecimento sobre a composição química, potencial antioxidante e atividade biológica desta espécie de abelha sem ferrão.

Palavras-chave: abelha sem ferrão; abelha marmelada, atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; compostos fenólicos; meliponíneos; produtos naturais.

ABSTRACT

Natural products play an essential role in scientific development, providing bioactive compounds with potential applications in health and biotechnology. This study investigated the chemical composition and biological activity of ethanol extracts of propolis (EEP) from *Frieseomelitta varia*, a little-studied stingless bee. Samples were collected in Viçosa, Minas Gerais, and extracted by maceration with analytical grade ethanol due to its efficiency in extracting bioactive compounds, following a standardized protocol. To broaden the understanding of the bioactivity of this propolis, total phenolic and flavonoid contents were quantified, antioxidant capacity was evaluated using different methods (DPPH, ABTS, FRAP, and ORAC), and antimicrobial activity was investigated both *in vitro* and *in vivo*, along with *in vivo* toxicity assessment using *Galleria mellonella* as an experimental model. Total phenolic content, determined by the Folin–Ciocalteu method, ranged from 21.57 ± 2.2 to 25.65 ± 1.21 mg GAE/g of extract, slightly higher than previously reported values for this species, while total flavonoid content was 0.1314 ± 0.069 mg QE/g. Chemical analysis revealed that the extracts are rich in terpenoids, particularly corosolic acid, dehydroabietic acid, and betulinic acid. Antioxidant activity was significant: DPPH ranged from 21.69 ± 0.46 to 30.72 ± 0.74 $\mu\text{mol TEAC/g}$; ABTS from 162.02 ± 5.74 to 237.58 ± 1.81 $\mu\text{mol TEAC/g}$; FRAP from 52.47 ± 2.42 to 54.65 ± 4.62 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$; and ORAC from 1.287 ± 0.65 to 2.276 ± 0.50 $\mu\text{mol TEAC/mg}$, demonstrating notable antioxidant potential. *In vitro* antimicrobial activity was observed against *Bacillus cereus*, with MIC values between 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$, showing no effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, or *Candida albicans*. *In vivo* toxicity assessment in *G. mellonella* at a dose of 1600 mg/kg showed no significant differences in survival or health index compared to the control, indicating low EEP toxicity. However, the propolis did not exhibit *in vivo* antimicrobial activity, failing to prevent mortality in larvae infected with *B. cereus*. The scarcity of studies on *F. varia* propolis limits comparisons with the literature, highlighting the relevance of this research in expanding knowledge on the chemical composition, antioxidant potential, and biological activity of this stingless bee species.

Keywords: stingless bee; *Frieseomelitta varia*; antioxidant activity; antimicrobial activity; phenolic compounds; *Meliponini*; natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de classificação taxonômica dos principais grupos de abelhas	25
Figura 2 – Anatomia geral de uma abelha.....	26
Figura 3 – Espécie <i>Apis mellifera</i> em comparação com uma abelha sem ferrão	30
Figura 4 – Exemplar da espécie <i>Frieseomelitta varia</i> (destacado à esquerda) e sua distribuição geográfica no Brasil (destacado à direita)	33
Figura 5 – Estrutura básica e principais subclasses dos compostos fenólicos	46
Figura 6 – Representação esquemática do método DPPH.....	51
Figura 7 – Representação esquemática do método ABTS.....	53
Figura 8 – Representação esquemática do método FRAP	54
Figura 9 – Representação esquemática do método ORAC	55
Figura 10 – Principais vantagens do uso de <i>Galleria mellonella</i> como modelo <i>in vivo</i> alternativo.....	60
Figura 11 – Fluxograma da operacionalização das etapas da pesquisa	61
Figura 12 – Mapa de localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de própolis produzidas por <i>Frieseomelitta varia</i>	62
Figura 13 – Etapas do processo de obtenção dos extratos etanólicos de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i> a partir do amostras brutas	64
Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> inoculadas com extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> após 72 horas.....	99
Figura 15 – Índice de saúde das larvas de <i>Galleria mellonella</i> inoculadas com extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> após 72 horas ...	101
Figura 16 – Porcentagem de sobrevivência das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>B. cereus</i> e tratadas com os extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> após 24 horas.....	103
Figura 17 – Índice de saúde das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>B. cereus</i> e tratadas com os extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> após 24 horas.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema de pontuação para avaliação das larvas de <i>Galleria mellonella</i> .	75
Tabela 2 – Rendimento dos extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> .	78
Tabela 3 – Quantificação do teor de compostos fenólicos totais em extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> .	79
Tabela 4 – Compostos preliminarmente identificados no extrato etanólico de própolis (EEP) A1 de <i>Frieseomelitta varia</i> .	83
Tabela 5 – Atividade antioxidante (DPPH) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> .	87
Tabela 6 – Atividade antioxidante (ABTS) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> .	89
Tabela 7 – Atividade antioxidante (FRAP) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> .	91
Tabela 8 – Atividade antioxidante (ORAC) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> .	92
Tabela 9 – Atividade inibitória e microbica <i>in vitro</i> dos extratos etanólicos de própolis (EEP) de <i>Frieseomelitta varia</i> contra diferentes microrganismos.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% v/v	Porcentagem volume por volume
A1, A2, A3, A4	Amostras 1, 2, 3 e 4 de própolis
AAPH	2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) di-hidroclorato
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de Variância
ASF	Abelhas Sem Ferrão
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMM	Concentração Microbica Mínima
DDA	Data-Dependent Acquisition (Aquisição Dependente de Dados)
DF	Distrito Federal
DHA	Ácido desidroabiético
DL	Desolvation Line (Linha de Dessolvatação)
DL50	Dose Letal 50%
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EEGP	Extrato Etanólico de Geoprópolis
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
FeSO ₄	Sulfato Ferroso
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Antioxidante Redutor Férrico)
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detector de Arranjo de Diodos)

HPLC-ESI-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem)
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg EAG/g	Miligramas de Equivalente de Ácido Gálico por grama
mg EQ/g	Miligramas de Equivalente de Quercetina por grama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MS/MS	Espectrometria de Massas em Tandem
NaCl	Cloreto de Sódio
Iod	Iodeto de Sódio
nm	Nanômetro
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)
P.A.	Para Análise (grau analítico)
PPGCB	Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
QTOF	Quadrupole-Time of Flight (Quadrupolo-Tempo de Voo)
RAM	Resistência antimicrobiana
ROS	Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
rpm	Rotações por Minuto
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SPE	Solid-Phase Extraction (Extração em Fase Sólida)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Equivalente de Trolox)
TFC	Total Flavonoid Content (Teor de Flavonoides Totais)
TPC	Total Phenolic Content (Teor de Compostos Fenólicos Totais)
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa

UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
USP	Universidade de São Paulo
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 BIODIVERSIDADE E A IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS	21
2.1.1 Diversidade e importância taxonômica das abelhas.....	23
2.1.2 Abelhas sem ferrão: diversidade e papel ecológico	27
2.1.3 Diferenças entre <i>Apis mellifera</i> e abelhas sem ferrão	29
2.1.4 A importância da meliponicultura	31
2.1.5 Caracterização da espécie <i>Frieseomelitta varia</i>	32
2.2 PRODUTOS NATURAIS E O POTENCIAL BIOATIVO DA PRÓPOLIS.....	34
2.2.1 A própolis e suas múltiplas funções na colmeia e na saúde humana.....	37
2.2.2 Própolis e geoprópolis: diferenças estruturais e funcionais	39
2.3 COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE QUÍMICA DA PRÓPOLIS.....	41
2.3.1 Compostos fenólicos e flavonoides na própolis	44
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DA PRÓPOLIS	48
2.4.1 Própolis como agente antioxidante	49
2.4.2 Potencial antimicrobiano da própolis.....	56
2.5 A IMPLEMENTAÇÃO DE UM NOVO MODELO ALTERNATIVO <i>IN VIVO</i> : LARVAS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	58
3 METODOLOGIA	61
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	61
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	63
3.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	65
3.3.1 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos da própolis de <i>Frieseomelitta varia</i>	65
3.3.2 Quantificação do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i>	65

3.3.3 Caracterização dos compostos bioativos presentes nos extratos etanólicos de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i>	66
3.4 ANÁLISES DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	68
3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH	68
3.4.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS	68
3.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP	69
3.4.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC	70
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	70
3.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	71
3.5.2 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)	72
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> EM MODELO DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	73
3.6.1 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> dos extratos etanólicos de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i>	73
3.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vivo</i> dos extratos etanólicos de própolis de <i>Frieseomelitta varia</i>	75
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	77
4.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	79
4.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	81
4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	82
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	86
4.5.1 Potencial antioxidante pela eliminação de radicais livres do DPPH	87
4.5.2 Potencial antioxidante pela eliminação de radicais livres do ABTS	89

4.5.3 Potencial antioxidante pelo poder redutor do ferro (FRAP)	90
4.5.4 Potencial antioxidante pela capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC)	92
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA</i>	94
4.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE <i>FRIESEOMELITTA VARIA IN VIVO</i> EM MODELO ALTERNATIVO DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	98
4.7.1 Avaliação da toxicidade em modelo sistêmico <i>in vivo</i> de <i>Galleria mellonella</i>	98
4.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana em modelo sistêmico <i>in vivo</i> de <i>Galleria mellonella</i>	102
5 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

As abelhas desempenham um papel crucial como polinizadoras na reprodução da maioria das angiospermas, sendo fundamentais para a manutenção da biodiversidade e o equilíbrio dos ecossistemas. Globalmente, estima-se que existam mais de 20 mil espécies de abelhas. No Brasil, destacam-se as abelhas sociais, que incluem as abelhas domésticas (*Apis mellifera L.*), introduzidas pelos colonizadores, e as abelhas sem ferrão do grupo *Meliponini*, também conhecidas como abelhas nativas ou melíponas. Essas últimas são altamente valorizadas não apenas por sua eficiência na polinização, mas também pela produção de mel de alta qualidade e outros subprodutos de interesse comercial (Domingos; Nóbrega; Silva, 2016, Bendini *et al.* 2020).

A criação racional de abelhas sem ferrão, conhecida como meliponicultura, oferece diversos benefícios econômicos e ambientais. Além de garantir a polinização de espécies vegetais nativas, essa prática permite a obtenção de produtos como mel, pólen, cera e própolis (Santos *et al.* 2021). Dentre esses, a própolis se destaca por sua composição complexa, formada por substâncias resinosas coletadas pelas abelhas de brotos, flores e ramos de plantas. Na colmeia, a própolis é utilizada para vedar frestas e proteger contra agentes externos, mas suas propriedades biológicas têm despertado crescente interesse científico, incluindo atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e até mesmo antitumorais (Pereira *et al.* 2015). Esse interesse tem sido amplificado pelo aumento da resistência antimicrobiana (RAM) associada ao uso indiscriminado de antibióticos, o que impulsiona a busca por alternativas naturais e a identificação de novos agentes antimicrobianos (Ostrosky *et al.* 2008).

Apesar do potencial da própolis, sua exploração na meliponicultura ainda é limitada, principalmente devido à escassez de informações sobre sua qualidade e à falta de técnicas adequadas de coleta (Pereira *et al.* 2015). No entanto, algumas espécies, como *Frieseomelitta varia*, popularmente conhecida como abelha marmelada, espécie relevante para a meliponicultura brasileira, por ser um polinizador essencial em ecossistemas naturais e agrícolas na região Neotropical, demonstram grande potencial na produção de própolis, embora ainda sejam pouco estudadas.

Essa espécie apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo diversos estados brasileiros, o que reforça sua importância para pesquisas futuras (Gonçalves, 2010).

Para explorar o potencial biológico da própolis de *F. varia*, este estudo realizou a determinação da composição química e de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, como atividade antioxidante, antimicrobiana e toxicidade. A análise química foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), permitindo a identificação dos compostos presentes nos extratos etanólicos de própolis (EEP), além de ensaios para quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais. Paralelamente, a atividade biológica foi avaliada por meio de testes antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC) e ensaios antimicrobianos contra diferentes microrganismos patogênicos.

Além das análises *in vitro* das propriedades biológicas da própolis, o uso de metodologias *in vivo* tem se mostrado uma abordagem promissora. Entre os modelos alternativos disponíveis, as larvas de *Galleria mellonella* (traça-da-cera) vêm sendo amplamente utilizadas para investigações de infecções microbianas e avaliação da eficácia de compostos antimicrobianos. Esse modelo se destaca por sua praticidade, baixo custo de manutenção e ausência de restrições éticas relacionadas ao uso de invertebrados em pesquisas científicas (Iwanczuk, 2016). Sua aplicabilidade inclui diferentes formas de inoculação e permite simulações realistas de infecções, tornando-se uma ferramenta valiosa para ampliar o conhecimento sobre a atividade biológica de compostos naturais, como a própolis produzida por abelhas sem ferrão. Neste estudo, as larvas foram expostas aos extratos para análise da toxicidade e atividade antimicrobiana, considerando parâmetros como taxa de sobrevivência, melanização, atividade locomotora e formação de casulos.

1.1 OBJETIVOS

Diante deste contexto, o presente trabalho tem como foco a espécie *F. varia*, amplamente distribuída no território brasileiro, porém ainda pouco explorada em relação à composição e aplicações de sua própolis.

Assim, objetivou-se:

1.1.1 Objetivo geral

Determinar a composição química e avaliar o potencial de atividades biológicas de extratos etanólicos de própolis produzidos por *F. varia*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) determinar a composição química dos extratos etanólicos de própolis de *F. varia* por meio de técnicas cromatográficas;
- b) quantificar o teor de fenólicos totais e flavonoides totais presentes na própolis;
- c) avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis utilizando métodos espectrométricos;
- d) investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos contra diferentes microrganismos;
- e) avaliar a toxicidade e a atividade antimicrobiana *in vivo* dos extratos etanólicos de própolis.

Este trabalho está estruturado da seguinte forma: na Seção 2, será apresentada uma revisão de literatura, abordando desde aspectos da biodiversidade e o impacto das abelhas na natureza até a importância de produtos naturais como a própolis produzida por abelhas nativas. Também serão discutidas sua composição química e as atividades biológicas evidenciadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, incluindo o modelo alternativo *G. mellonella*. A Seção 3 descreve a metodologia utilizada para investigar a composição química e a atividade biológica dos extratos etanólicos de própolis (EEP) de *F. varia*. Por fim, a Seção 4 apresenta os resultados obtidos, suas análises e discussões, destacando as contribuições do estudo para a área.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIODIVERSIDADE E A IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS

Evidências arqueológicas indicam que o *Homo sapiens* surgiu na África há aproximadamente 200 mil anos, enquanto a agricultura, resultado do aprimoramento de ferramentas e técnicas alimentares, teve início apenas no período Neolítico, cerca de 10 mil anos atrás. Durante essa fase, culturas como o trigo eram utilizadas na produção de pães, e a videira e a cevada, na fabricação de vinho e cerveja, conforme apontado por Bertolini *et al.* (2023).

O surgimento das angiospermas, há cerca de 135 milhões de anos, estabeleceu uma relação coevolutiva com os insetos polinizadores, gerando uma dependência mútua que favoreceu a diversidade dessas espécies (Bertolini *et al.* 2023). As abelhas originaram-se na antiga Gondwana ocidental (África e América do Sul) há cerca de 120 milhões de anos, ainda no Cretáceo, essa origem coincide com a diversificação inicial das angiospermas, evidenciando uma coevolução íntima entre abelhas e plantas floríferas (Almeida *et al.* 2023)

Entre os principais polinizadores, destacam-se os *Hymenoptera*, popularmente conhecidos como abelhas, marimbondos, mamangavas, vespas, formigas e outros, que incluem as abelhas sem ferrão, do grupo *Meliponini*. De acordo com Pedro (2014), esse grupo, amplamente distribuído em regiões tropicais e de origem antiga, é de grande relevância socioeconômica, atuando como polinizador essencial de diversas plantas cultivadas.

Atualmente, mais de 20.000 espécies de abelhas já foram descritas globalmente (Almeida *et al.* 2023). As abelhas selvagens desempenham um papel crucial na polinização, contribuindo diretamente para a formação de sementes e a produção de frutos em diversas culturas agrícolas, como demonstrado por Tanda (2021). Além de sua importância na agricultura, as abelhas têm um valor ecológico e econômico significativo. De Paula Freitas *et al.* (2020), destacam que a relação milenar dessas espécies com os seres humanos é particularmente notável entre as abelhas altamente eussociais, como as *Apini* e *Meliponini*, que fornecem produtos como mel, pólen, cera e própolis.

Embora a *A. mellifera* tenha sido reconhecida como a principal polinizadora historicamente, as abelhas sem ferrão sempre desempenharam um papel fundamental em diversas civilizações, com grande importância sociocultural (Silva; Paz, 2012; Tanda, 2021). Dependendo dos recursos florais, essas abelhas desenvolveram adaptações para localizá-los e coletá-los, promovendo, assim, a polinização de forma involuntária. Silva e Paz (2012) ressaltam que esse processo é um serviço ecológico essencial para a preservação dos ecossistemas, além de fazer das abelhas bioindicadoras da qualidade ambiental.

A importância ecológica das abelhas sem ferrão é indiscutível, pois elas atuam como polinizadoras naturais de plantas nativas em diversos biomas (Lavinias *et al.* 2019). Nos ecossistemas florestais, Al-Hatamleh *et al.* (2020) destacam o impacto direto dessas abelhas na comunidade, diversidade e evolução das plantas. Na agricultura, são responsáveis por polinizar aproximadamente 70% das culturas essenciais para a alimentação humana globalmente. Além disso, contribuem para a preservação da biodiversidade, fertilizando diversas espécies vegetais. Nos trópicos, as abelhas sem ferrão polinizam entre 40% e 90% das espécies nativas ou cultivadas (Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

As abelhas nativas sem ferrão desempenham um papel ainda mais significativo, sendo responsáveis por até 90% da polinização das flores de árvores nativas, conforme Popova, Trusheva e Bankova (2021). Esses organismos são cruciais não apenas no contexto socioeconômico, mas também na manutenção de serviços ecossistêmicos, atuando como fonte de alimento para vertebrados e invertebrados, decompositores, recicladores de nutrientes e dispersores de sementes e pólen (Pedro, 2014).

A relevância dos meliponíneos vai além dos benefícios econômicos, desempenhando um papel fundamental na recuperação de florestas tropicais e na conservação de áreas remanescentes (Silva; Paz, 2012). Eles influenciam diretamente processos ecológicos essenciais, sublinhando a urgência de medidas de sensibilização, como a educação ambiental em escolas e organizações. De acordo com Silva e Paz (2012), o serviço ecológico prestado por essas abelhas é vital para a preservação da diversidade vegetal e, indiretamente, da fauna que dela depende.

No entanto, as populações de abelhas sem ferrão são altamente vulneráveis a perturbações ambientais. Algumas espécies são encontradas principalmente em áreas preservadas, como florestas primárias, tornando-as suscetíveis ao desmatamento e a outras ações humanas, como queimadas e perda de *habitat*. Isso coloca os meliponíneos em risco, podendo levar à extinção de espécies vegetais nativas essenciais e ao desequilíbrio de diversos *habitats* (Silva; Paz, 2012).

Compreender a biodiversidade das abelhas, que desempenham um papel crucial na manutenção dos ecossistemas naturais por meio de interações com suas plantas hospedeiras, é essencial para o manejo desses ambientes. Rêgo e Albuquerque (2012) enfatizam que sua função como polinizadores eficientes de plantas nativas e cultivadas reforça a necessidade de políticas públicas voltadas para sua preservação e manejo. Além de serem componentes vitais da biodiversidade, as abelhas são aliadas indispensáveis na produção de alimentos. A diminuição dos polinizadores pode resultar diretamente na queda da produção de diversas culturas, evidenciando o papel significativo das espécies selvagens na polinização da maioria delas (Tanda, 2021).

Portanto, a conservação das abelhas, especialmente as sem ferrão, que são espécies nativas no Brasil, é fundamental não apenas para a manutenção da biodiversidade, mas também para a sustentabilidade dos ecossistemas e da produção agrícola global.

2.1.1 Diversidade e importância taxonômica das abelhas

Os insetos constituem o subfilo Hexapoda e representam o grupo mais diverso entre os organismos vivos, englobando aproximadamente 60% das espécies atualmente descritas, como indicado por Pedro (2014). Dentro dessa enorme diversidade, as abelhas se inserem entre os artrópodes e compartilham características morfológicas e fisiológicas com outros representantes desse filo, incluindo aranhas, crustáceos e miriápodes. Além das abelhas, espécies amplamente presentes no cotidiano humano, como baratas, pulgas e gafanhotos, também fazem parte desse conjunto taxonômico, conforme discutido por Bertolini *et al.* (2023).

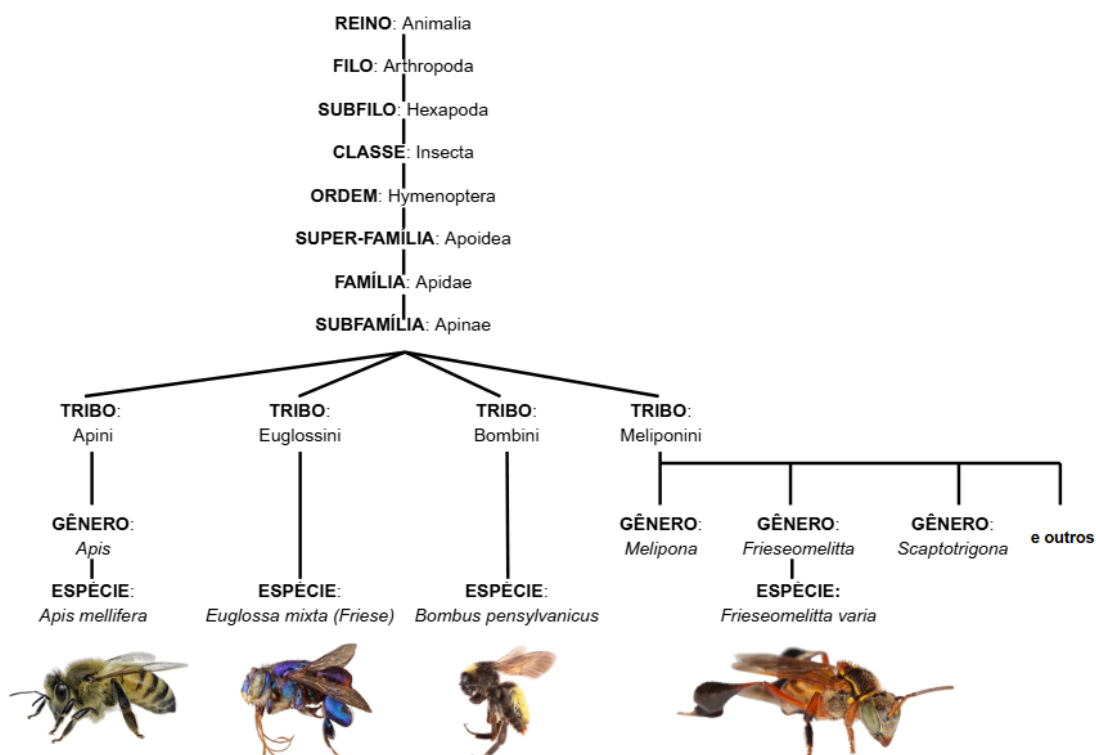
No contexto da classe Insecta, a ordem *Hymenoptera* destaca-se por sua

expressiva diversidade. Esse grupo reúne organismos com ampla variação de hábitos e comportamentos, sendo reconhecido pela complexidade social observada em vespas, formigas e, sobretudo, nas abelhas, consideradas importantes agentes polinizadores, segundo Portal e Cordova (2023).

As abelhas integram a superfamília Apoidea, que reúne diversas famílias, entre elas a Apidae. Dentro dessa família, encontram-se grupos com organização social mais complexa, distribuídos atualmente na subfamília Apinae. Essa subfamília reúne tanto espécies sociais quanto solitárias e é dividida em quatro tribos principais: Apini, que inclui as espécies do gênero *Apis*; *Meliponini*, composta pelas abelhas sem ferrão; *Bombini*, correspondente aos zangões; e *Euglossini*, que abrange as abelhas conhecidas como euglossíneas ou abelhas-das-orquídeas, conforme discutido por Portal e Cordova (2023).

De forma mais ampla, as abelhas estão distribuídas globalmente em sete famílias dentro da superfamília Apoidea, sendo a Apidae uma das mais representativas devido à diversidade de comportamentos sociais e ecológicos encontrados em seus grupos. A organização interna da subfamília Apinae, estruturada nas tribos *Apini*, *Meliponini*, *Bombini* e *Euglossini*, reflete essa diversidade e destaca a relevância evolutiva desses táxons (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama de classificação taxonômica dos principais grupos de abelhas

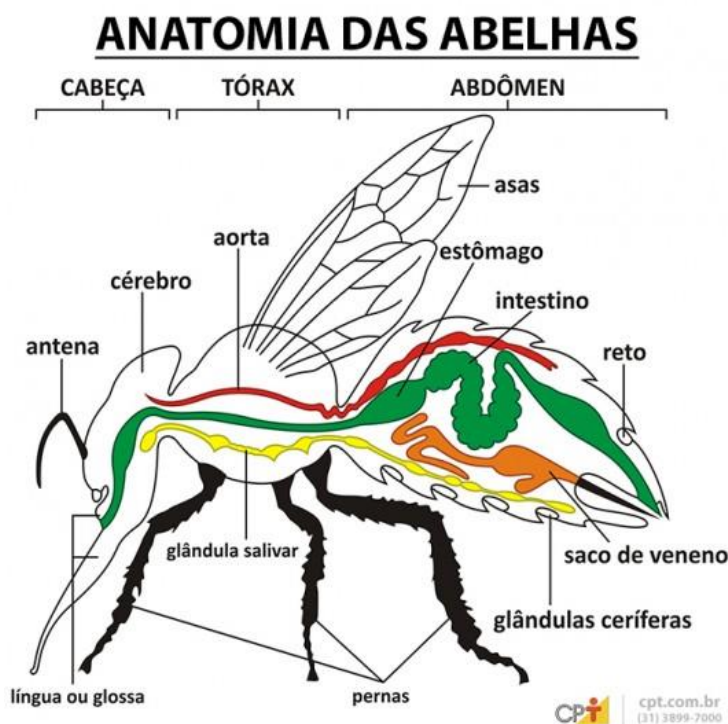


Fonte: Adaptado de Atlas Nacional de Las Abejas de México, s. d.

Segundo De Paula Freitas *et al.* (2020), a tribo *Apini* abrange as abelhas altamente eussociais, como as do gênero *Apis* (abelhas melíferas), que incluem menos de uma dúzia de espécies. A tribo *Meliponini*, conhecida pelas abelhas sem ferrão, é composta por mais de 500 espécies distribuídas em 48 a 61 gêneros, como *Melipona*, *Trigona*, *Frieseomelitta*, *Scaptotrigona* e *Tetragonisca*. Essas abelhas são polinizadoras generalistas, visitando uma grande variedade de plantas ao longo do ano, o que as torna fundamentais para a polinização de diversas culturas, incluindo aquelas de alto valor econômico e até mesmo cultivos em estufas (Silva; Paz, 2012).

A tribo *Bombini* inclui abelhas primitivamente eussociais, como os zangões (*Bombus*), enquanto a *Euglossini* abrange as abelhas das orquídeas, que variam de solitárias a incipientemente sociais. Bertolini *et al.* (2023) destacam que todas as abelhas compartilham características morfológicas comuns, como a divisão do corpo em cabeça, tórax e abdômen, um par de antenas, três pares de pernas, dois pares de asas e um exoesqueleto (Figura 2).

Figura 2 – Anatomia geral de uma abelha



Fonte: Cursos CPT (2025).

A sociabilidade das abelhas, especialmente nas tribos *Apini* e *Meliponini*, constitui uma vantagem significativa em relação a outros polinizadores, pois o forrageamento é realizado por vários indivíduos de uma mesma colônia, aumentando a eficiência na coleta de recursos (Silva; Paz, 2012). Além do papel ecológico fundamental na polinização, Silva e Paz (2012) destacam que as abelhas produzem itens de elevado valor econômico, como mel, pólen, própolis e geoprópolis, favorecendo sua criação racional e manejo. Esses insetos também desenvolveram características comportamentais importantes, como a capacidade de distinguir cores e aromas, que auxiliam na busca por néctar e pólen, suas principais fontes de alimento. Tais adaptações beneficiam igualmente as plantas, uma vez que, durante o forrageamento, as abelhas transferem o pólen da antera de uma flor ao estigma de outra, promovendo a polinização (Portal; Cordova, 2023).

Embora os produtos das abelhas *A. mellifera* (abelhas melíferas) tenham sido amplamente estudados e suas propriedades biológicas e medicinais sejam bem documentadas, os benefícios dos produtos das abelhas sem ferrão ainda são menos

explorados (Al-Hatamleh *et al.* 2020). Essa lacuna na pesquisa sugere que seu potencial ainda não foi totalmente aproveitado, indicando a necessidade de mais estudos para compreender e valorizar os produtos dessas abelhas.

2.1.2 Abelhas sem ferrão: diversidade e papel ecológico

A abelha africanizada (*Apis mellifera L.*), resultado do cruzamento entre linhagens europeias e africanas, é a espécie mais amplamente reconhecida no Brasil, destacando-se tanto pela capacidade de produzir mel quanto pela ferroadada dolorosa. As linhagens europeias foram introduzidas no país em 1839, enquanto as africanas chegaram em 1956. Apesar de sua notoriedade, *A. mellifera* representa apenas uma entre mais de 2.500 espécies de abelhas registradas no Brasil, das quais cerca de 10% apresentam comportamento social e uma parcela ainda menor está associada à produção de mel (Nogueira *et al.* 2023).

Entre as abelhas sociais, o grupo de maior diversidade é o dos meliponíneos (família Apidae, tribo *Meliponini*), com mais de 250 espécies descritas no território brasileiro (Catálogo de Abelhas Moure). Em escala global, estima-se que existam cerca de 20.555 espécies de abelhas, distribuídas em sete famílias; entretanto, apenas cinco dessas famílias ocorrem naturalmente no Brasil (Nogueira *et al.* 2023). Os meliponíneos, popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, também chamadas de abelhas nativas, indígenas ou sociais, constituem o maior grupo de abelhas eussociais do mundo, com mais de 600 espécies reconhecidas. Essas abelhas, organizadas em 61 gêneros, ocorrem predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo a América Latina, América Central, parte meridional da América do Norte, além de áreas da África, sudeste asiático, Austrália e Oceania (Bertolini *et al.* 2023; Lavinias *et al.* 2019; Souza *et al.* 2021; Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

Os meliponíneos, amplamente conhecidos como abelhas sem ferrão (ASF) ou abelhas indígenas, recebem essa denominação devido ao registro histórico de manejo por povos originários. O Brasil abriga a maior diversidade mundial dessas abelhas, com espécies distribuídas por todo o território nacional, especialmente na região Amazônica. A predominância de clima quente, aliada à grande disponibilidade de

plantas fornecedoras de néctar, pólen e resinas, cria condições ambientais particularmente favoráveis ao desenvolvimento dessas espécies (Portal; Cordova, 2023). A relação entre os povos indígenas e os meliponíneos é tradicional e profunda, envolvendo práticas de manejo, coleta e uso dos produtos da colônia.

Segundo Al-Hatamleh *et al.* (2020), as espécies mais comuns produtoras de mel entre as abelhas sem ferrão pertencem aos gêneros *Melipona* e *Trigona*, embora outros gêneros como *Plebeia*, *Scaptotrigona* e *Trigonisca* também apresentem número expressivo de espécies (Lavinias *et al.* 2019). Todas essas abelhas compõem a tribo *Meliponini*, caracterizada pelo comportamento eussocial e pela vida em colônias altamente organizadas, formadas por uma rainha e um número variável de operárias, de algumas dezenas a milhares. A rainha exerce exclusivamente a função reprodutiva, sendo a única capaz de gerar novas rainhas, machos e operárias, enquanto estas desempenham tarefas essenciais, como forrageamento, cuidado da prole, defesa do ninho, processamento de alimento e construção das estruturas internas da colônia (Popova; Trusheva; Bankova, 2021; Nogueira *et al.* 2023; Portal; Cordova, 2023).

Nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, os meliponíneos foram historicamente os principais polinizadores até a introdução da abelha melífera *A. mellifera* no século XVIII (De Paula Freitas *et al.* 2020). São conhecidos como “abelhas indígenas” ou “abelhas nativas”, pois sua criação remonta a práticas tradicionais de povos indígenas (Silva; Paz, 2012). Apesar de possuírem ferrão, este se encontra atrofiado nas fêmeas e ausente nos machos, o que explica o termo “abelhas sem ferrão” (Nogueira *et al.* 2023).

O Brasil abriga grande diversidade de meliponíneos, distribuídos por diversos domínios fitogeográficos. Algumas espécies apresentam ampla distribuição, enquanto outras são restritas a condições ambientais específicas (Nogueira *et al.* 2023). Aproximadamente 89 espécies são endêmicas do país, representando cerca de 20% das abelhas sem ferrão neotropicais (Pedro 2014; Lavinias *et al.* 2019).

Além de sua relevância ecológica como polinizadores de plantas nativas e cultivadas, esses insetos produzem mel, pólen, cera e própolis, essenciais para a dinâmica interna da colônia (Bonamigo *et al.* 2017). Seus ninhos apresentam arquitetura complexa e variada, frequentemente utilizada como critério taxonômico

para identificação das espécies (Silva; Paz, 2012).

A importância dos meliponíneos se estende à manutenção dos ecossistemas e à economia, uma vez que sua atividade de polinização contribui diretamente para a conservação da flora, a produção de frutos e sementes e o incremento da produtividade agrícola (Portal; Cordova, 2023).

2.1.3 Diferenças entre *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão

A introdução da abelha europeia *A. mellifera* no Brasil ocorreu por volta de 1839, quando os portugueses a trouxeram com o objetivo de produzir velas de cera. Posteriormente, em 1956, o biólogo e geneticista Warwick Kerr, a pedido do governo brasileiro, importou rainhas africanas para realizar cruzamentos por inseminação artificial. O objetivo era desenvolver linhagens mais produtivas e adaptadas ao clima tropical, o que resultou no surgimento das abelhas africanizadas (Portal; Cordova, 2023).

As abelhas africanizadas, amplamente reconhecidas por sua coloração, morfologia e alta produtividade de mel, são híbridos resultantes do cruzamento entre subespécies europeias (*A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*) e a subespécie africana *A. m. scutellata* (Bertolini *et al.* 2023). Em contraste, as abelhas sem ferrão (ASF) pertencem à família Apidae e à tribo *Meliponini*, apresentando características biológicas e comportamentais distintas das abelhas melíferas (Lavinias *et al.* 2019).

A diferença mais evidente entre os dois grupos está no tamanho corporal e na presença do ferrão: as abelhas africanizadas são maiores, mais robustas e possuem ferrão funcional, enquanto as abelhas sem ferrão são menores e apresentam ferrão atrofiado, incapaz de ferroar, demonstrado na Figura 3 (Bertolini *et al.* 2023). Além disso, diferem em diversos aspectos da biologia social, incluindo o tamanho e estrutura da colônia, os padrões de nidificação, a organização dos favos de cria, os mecanismos de produção de rainhas, as estratégias de armazenamento de alimento e os métodos de recrutamento de forrageiras (Lavinias *et al.* 2019).

Enquanto as abelhas do gênero *Apis* apresentam comportamentos e morfologia relativamente uniformes, os meliponíneos destacam-se pela grande diversidade de formas, estratégias ecológicas e modos de organização social (Portal; Córdoba, 2023).

Figura 3 – Espécie *Apis mellifera* em comparação com uma abelha sem ferrão



Fonte: Tetra Native Bees (2025).

Uma diferença crucial está no ferrão, uma estrutura presente nas fêmeas da espécie *Apis mellifera*. Segundo Popova; Trusheva; Bankova (2021), nas abelhas sem ferrão, as fêmeas não possuem ferrão ou apresentam uma versão atrofiada. Em vez disso, elas defendem seus ninhos com mordidas fortes, desenvolvendo uma estratégia defensiva alternativa.

Ambas as espécies produzem mel, pólen, cera e própolis. Segundo Al-Hatamleh *et al.* (2020), os produtos apícolas das abelhas sem ferrão são considerados fontes promissoras de compostos biologicamente ativos, muitas vezes superiores aos das abelhas melíferas. Isso se deve, principalmente, à maior diversidade de espécies de abelhas sem ferrão e à sua relação com plantas nativas, o que resulta em uma composição química mais rica e variada (Popova; Trusheva; Bankova, 2021). Além disso, elas utilizam resinas vegetais e cerume na construção dos potes onde armazenam seus produtos, o que pode enriquecer ainda mais esses compostos.

A construção de seus ninhos difere significativamente. As abelhas melíferas priorizam o uso de cera, enquanto as abelhas sem ferrão recorrem a resinas vegetais, gomas de plantas e, em certos casos, até solo, incorporando própolis em suas estruturas (Popova; Trusheva; Bankova, 2021). Seus ninhos são formados principalmente por cera e cerume, uma mistura de cera com própolis, e algumas espécies ainda utilizam geoprópolis, combinando barro e resina para

impermeabilização, conforme mencionado por Bertolini *et al.* (2023). A colônia, que funciona como abrigo, local de criação e armazenamento de alimentos, é organizada em ninhos e potes, onde mel e pólen são guardados separadamente (Bertolini *et al.* 2023).

Além disso, as abelhas sem ferrão possuem características únicas, como menor vulnerabilidade a doenças, lealdade à colmeia, capacidade de polinizar flores pequenas e facilidade na extração de seus produtos (Al-Hatamleh *et al.* 2020).

2.1.4 A importância da meliponicultura

A meliponicultura, prática dedicada à criação de abelhas sem ferrão, é uma atividade ancestral desenvolvida há séculos. Silva e Paz (2012) relatam que registros históricos indicam sua ocorrência desde civilizações antigas, como no Egito Antigo. Em diferentes regiões do mundo, essa atividade mantém forte vínculo com sociedades tradicionais, especialmente nas Américas, onde desempenha papel ecológico fundamental e contribui para a produção de diversos produtos de interesse industrial, incluindo alimentos, cosméticos e insumos farmacêuticos, com destaque para a própolis (Rocha *et al.* 2023).

No Brasil, a meliponicultura tem origem entre povos indígenas e, ao longo do tempo, consolidou-se como prática tradicional entre pequenos e médios produtores, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste (Silva; Paz, 2012). Rocha *et al.* (2023) ressaltam que ela também é amplamente difundida em outros países latino-americanos, como México e Costa Rica, onde constitui um elemento cultural significativo. O meliponicultor mantém as colônias em caixas organizadas em meliponários, visando principalmente a obtenção de produtos como mel, própolis, resina e pólen (Nogueira *et al.* 2023).

Além das comunidades indígenas, a meliponicultura também é praticada há gerações por diversos grupos tradicionais brasileiros, como quilombolas, ribeirinhos, sertanejos, caipiras e caiçaras, reforçando sua importância cultural, econômica e ecológica (Portal; Cordova, 2023).

O mel produzido por abelhas sem ferrão é altamente valorizado, tanto pelo sabor quanto por suas propriedades medicinais. Além do mel, a meliponicultura

permite a obtenção de outros produtos, como colônias de abelhas, pólen, cerume e própolis, que têm ganhado espaço em um mercado emergente em diversas regiões do mundo (Lavinias *et al.* 2019; Popova; Trusheva; Bankova, 2021). Segundo Dos Santos *et al.* (2021), essa atividade é especialmente relevante para comunidades tradicionais e agricultores familiares, que a utilizam como fonte de sustento ou complemento de renda, vendendo colônias e produtos derivados.

Além dos benefícios econômicos, a meliponicultura desempenha um papel crucial na promoção da sustentabilidade e na preservação das abelhas nativas. Nogueira *et al.* (2023) ressaltam que seus produtos, além de nutritivos e úteis na alimentação, são valorizados na área da saúde por suas propriedades cicatrizantes, hidratantes e anti-inflamatórias. A prática também é vista como uma garantia de renda para os meliponicultores, devido ao baixo custo de implantação dos meliponários e à facilidade de manejo, além de seu potencial para gerar produtos e subprodutos de alto valor econômico (Bertolini *et al.* 2023).

Ligada à agroecologia e à extensão rural, a meliponicultura viabiliza projetos de impacto socioeconômico e ambiental. Conforme Bertolini *et al.* (2023), essa prática contribui para a agrobiodiversidade, oferece novas fontes de renda para pequenos produtores rurais e desempenha um papel significativo na mitigação das mudanças climáticas. Estudos indicam que a criação de abelhas sem ferrão pode contribuir para a fixação de dióxido de carbono, além de fortalecer os ecossistemas. Dessa forma, ela se alinha aos quatro pilares da sustentabilidade: cultural, econômico, social e ambiental.

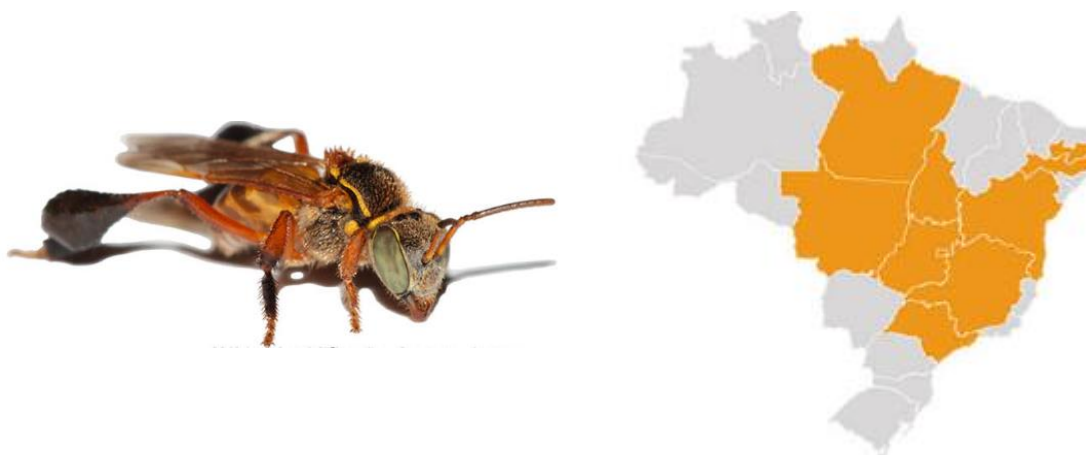
Embora as abelhas sem ferrão sejam frequentemente associadas à produção de mel, cera e própolis, sua verdadeira importância reside no papel fundamental que desempenham nos ecossistemas, no fornecimento de serviços ecossistêmicos valiosos por meio da polinização (Silva; Paz, 2012). Atualmente, a meliponicultura não se limita a comunidades tradicionais; ela pode ser incentivada e desenvolvida até mesmo em grandes cidades, servindo como uma ferramenta poderosa para a educação ambiental e despertando o interesse de crianças e adultos na preservação das abelhas e do meio ambiente (Silva; Paz, 2012).

2.1.5 Caracterização da espécie *Frieseomelitta varia*

O Brasil é reconhecido como um dos países com maior diversidade de abelhas-sem-ferrão, abrigando atualmente 251 espécies registradas no Catálogo Moure de Abelhas Neotropicais. Segundo Lavinias *et al.* (2019), desse total, 244 espécies foram citadas em uma revisão realizada por Pedro (2014), sendo aproximadamente 89 endêmicas do território brasileiro, o que representa cerca de 20% do total estimado de abelhas-sem-ferrão neotropicais. Dentre as espécies conhecidas, apenas as pertencentes aos gêneros *Frieseomelitta*, *Melipona*, *Nannotrigona*, *Plebeia*, *Scaptotrigona* e *Tetragonisca* são manejadas para a produção de mel e comercialização de colônias (Dos Santos *et al.* 2021).

Este estudo tem como foco a espécie *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836), que pode ser observada na Figura 4, popularmente conhecida como "marmelada". Trata-se de uma abelha sem ferrão de médio porte, pertencente ao gênero *Frieseomelitta*, que ocorre em diversas regiões do Brasil, incluindo Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins (Figura 4) (Pedro, 2014). Aleixo *et al.* (2014) ressaltam que suas colônias podem ser encontradas tanto em áreas de vegetação natural quanto em ambientes urbanos. Embora não possuam abelhas de guarda, utilizam uma resina pegajosa ao redor da entrada de suas colônias, que impede a aproximação de outros insetos (Patrício *et al.* 2002).

Figura 4 – Exemplar da espécie *Frieseomelitta varia* (destacado à esquerda) e sua distribuição geográfica no Brasil (destacado à direita)



Fonte: Catálogo A.B.E.L.H.A (disponível em www.abelha.org.br)

As espécies do gênero *Frieseomelitta* constroem seus ninhos em cavidades, como troncos de árvores podres ou outros espaços pequenos e protegidos. Segundo Patrício *et al.* (2002), o orifício de entrada do ninho, com diâmetro entre 0,3 e 0,5 cm, permite a passagem de apenas uma abelha por vez. Uma característica peculiar de *F. varia* é a presença de uma casta operária completamente estéril (De Paula Freitas *et al.* 2020). Estudos demonstraram que os ovários das operárias dessa espécie sofrem morte celular programada completa durante o estágio de pupa, como parte de um mecanismo evolutivo de diferenciação de castas, assegurando a esterilidade permanente dessas abelhas, mesmo na ausência da rainha, situação que em outras espécies geralmente estimula o desenvolvimento ovariano nas operárias, contribuindo para a estabilidade e organização social da colônia de *F. varia* (Boleli *et al.* 1999). Além disso, De Paula Freitas *et al.* (2020) destacam que *F. varia* foi a terceira espécie de abelha sem ferrão a ser selecionada para o sequenciamento do genoma.

Marques-Souza (2010) observou que, ao longo de um ano, as operárias de *F. varia* apresentaram elevada diversificação em suas fontes de alimento, coletando pólen de um número expressivo de espécies vegetais. A análise polínica e a identificação da frequência mensal dos grãos de pólen revelaram que as plantas mais visitadas pertenciam, em ordem de coleta, às famílias Cecropiaceae, Sapotaceae, Myrtaceae e Moraceae.

Apesar da reconhecida importância ecológica e econômica das abelhas nativas brasileiras, a literatura sobre seus produtos ainda é limitada, sendo particularmente escassos os estudos dedicados a *F. varia*.

Além do papel crucial na polinização e na manutenção dos ecossistemas, as abelhas sem ferrão produzem substâncias bioativas de grande interesse para a saúde humana e para a indústria. Entre esses produtos, a própolis se destaca como um dos mais investigados. A seguir, discutiremos a relevância dos produtos naturais originados dessas abelhas, com ênfase especial na própolis.

2.2 PRODUTOS NATURAIS E O POTENCIAL BIOATIVO DA PRÓPOLIS

A natureza é a principal fonte da maioria das substâncias orgânicas conhecidas,

e os produtos naturais, como o próprio nome indica, são aqueles originados diretamente de organismos vivos, conforme descrito por Viegas Jr., Bolzani e Barreirroll, (2006). Ao longo da história, a humanidade dependeu amplamente desses recursos para suprir necessidades básicas, incluindo o tratamento de enfermidades por meio do uso de plantas medicinais (Cragg; Newman, 2013). Desde os tempos remotos, o consumo de ervas e folhas constituiu uma das formas mais antigas de utilização de produtos naturais para alívio e cura de doenças (Viegas Jr.; Bolzani; Barreirroll, 2006).

Berlinck *et al.* (2017) destacam que o conhecimento acumulado por povos primitivos e indígenas sobre o arsenal químico da natureza desempenhou papel fundamental na identificação de substâncias tanto terapêuticas quanto tóxicas ao longo da história humana. Nesse contexto, os produtos naturais, substâncias químicas produzidas por organismos vivos, consolidaram-se como uma fonte tradicional e valiosa de compostos farmacologicamente ativos (Buseti; Maggs; Gilmore, 2017).

Historicamente, os produtos naturais têm desempenhado um papel fundamental como fonte de medicamentos, sendo responsáveis pela origem de grande parte dos princípios ativos utilizados na medicina (Seidl, 2002). Nos últimos anos, a busca por novos recursos genéticos e bioquímicos, impulsionada pela biodiversidade de plantas e animais, tem se intensificado, com foco na identificação de moléculas bioativas com potencial terapêutico (Campêlo *et al.* 2015).

Dini e Laneri (2021), destacam que, além disso, a demanda por matérias-primas de origem natural para a fabricação de suplementos alimentares, nutracêuticos e produtos cosméticos tem crescido significativamente.

Entre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal destaca-se como a principal fonte de metabólitos secundários (Pinto *et al.* 2002). Embora as pesquisas com produtos naturais de plantas ainda sejam predominantes, microrganismos, especialmente fungos, representam a segunda fonte biológica mais investigada por pesquisadores brasileiros na área (Berlinck *et al.* 2017). Além disso, organismos marinhos têm demonstrado grande potencial, com diversos metabólitos eficazes contra alvos biológicos de interesse terapêutico (Viegas Jr.; Bolzani; Barreirroll, 2006).

Um dos maiores desafios contemporâneos na área da saúde é a resistência antimicrobiana (RAM), que se consolidou como um grave problema de saúde pública.

Tsai, Loh e Proft (2016) destacam que o aumento da resistência a antibióticos em patógenos clínicos importantes, como *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Acinetobacter*, evidencia a necessidade urgente de desenvolver novos agentes antimicrobianos. Nesse cenário, terapias alternativas, incluindo combinações de antibióticos com adjuvantes, bacteriófagos, peptídeos antimicrobianos, fitoquímicos e outros produtos naturais, têm recebido crescente atenção (Ménard *et al.* 2021).

Desde a descoberta da penicilina em 1928 e, sobretudo, com a consolidação do uso clínico dos antibióticos a partir das décadas de 1940 e 1950, poucos novos antimicrobianos têm sido desenvolvidos a partir de plantas, uma vez que as principais fontes naturais desses compostos passaram a ser bactérias e fungos. No entanto, o avanço da resistência microbiana tem renovado o interesse pela prospecção de metabólitos secundários de origem vegetal e outras fontes naturais promissoras (Portal; Cordova, 2023).

Diante do aumento global da resistência antimicrobiana (Portal; Cordova, 2023), os produtos naturais despontam como alternativas estratégicas para a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos destinados ao controle de infecções, reforçando sua relevância no enfrentamento desse problema crescente.

Dentre os produtos naturais, a própolis merece atenção especial. Rocha *et al.* (2024) relatam que a própolis foi utilizada por diversas civilizações ao longo da história, incluindo egípcios, romanos, gregos, chineses e povos indígenas das Américas, sendo sempre valorizada por suas propriedades medicinais. Além dela, outros produtos apícolas, como mel e geleia real, também foram amplamente empregados no tratamento de doenças (Silva; Paz, 2012). O mel, em particular, foi historicamente a principal fonte de açúcar e sempre foi altamente valorizado por suas propriedades medicinais (Silva; Paz, 2012). Nos últimos anos, o interesse comercial por outros derivados meliponícolas, como a própolis e a geoprópolis, tem crescido significativamente (Silva; Paz, 2012).

A própolis de abelhas sem ferrão tem despertado crescente interesse científico e comercial, tanto pela valorização e preservação das abelhas nativas quanto pela investigação de compostos com potencial biológico (Popova; Trusheva; Bankova, 2021; Rocha *et al.* 2023). Segundo Rocha *et al.* (2024), os compostos ativos presentes na própolis têm origem em diversas fontes vegetais, o que confere a cada tipo de

própolis uma atividade biológica e farmacológica distinta. Rica em moléculas com diversas propriedades biológicas, a própolis é amplamente utilizada na medicina tradicional e apresenta grande potencial para novas descobertas, especialmente no campo dos compostos fenólicos (Rocha *et al.* 2023).

Além de seu uso medicinal, a própolis é um produto versátil, amplamente empregado nas indústrias cosmética e alimentícia. Bonamigo *et al.* (2017) afirmam que, considerada um alimento funcional (nutracêutico), ela pode ser incorporada a produtos alimentícios com o objetivo de prevenir doenças. Atualmente, a própolis está disponível em diversas formas, desde sua versão pura até combinações com outros produtos naturais, sendo utilizada em preparações de venda livre, cosméticos e alimentos saudáveis (Bankova; Trusheva; Popova, 2021).

2.2.1 A própolis e suas múltiplas funções na colmeia e na saúde humana

A origem do termo "própolis" remonta ao grego antigo, sendo uma combinação das palavras "*pro*", que significa "proteção", e "*polis*", que se refere a "cidade" (Rocha *et al.* 2023). Desde a antiguidade, os egípcios já reconheciam as propriedades antiputrefativas da própolis, utilizando-a no processo de embalsamamento de corpos (Lustosa *et al.* 2008). Já a própolis de abelhas sem ferrão, também conhecida como cerume ou geoprópolis, tem sido empregada há séculos na medicina tradicional de países como México, Brasil, Argentina, Índia e Vietnã, como um remédio natural para promover a saúde e tratar diversas doenças, como destacam Popova, Trusheva e Bankova (2021).

Para produzir a própolis, as abelhas coletam resinas vegetais selecionando, de forma natural e eficiente, compostos capazes de proteger o ninho e garantir a sobrevivência da colônia. Essa seleção prévia realizada pelas abelhas, baseada em seu comportamento e conhecimento ecológico, contribui para a composição química singular da própolis e explica o crescente interesse científico por suas propriedades biológicas (Portal; Cordova, 2023).

A própolis é formada a partir da mistura de resinas vegetais com cera, secreções salivares e fragmentos de tecidos vegetais (Rocha *et al.* 2023). As abelhas coletam exsudatos de diferentes partes das plantas, ramos, flores, brotos e até mesmo

pólen, e os combinam com enzimas presentes na saliva, produzindo um material resinoso e viscoso (Bonamigo *et al.* 2017). Popularmente conhecida como “cola de abelha”, essa substância desempenha papel essencial na proteção da colmeia, atuando como barreira contra microrganismos, insetos invasores e variações climáticas (Rocha *et al.* 2023; Lavinias *et al.* 2019).

A própolis é composta predominantemente por 50% a 60% de resinas e bálsamos, 30% a 40% de cera, 5% a 10% de óleos essenciais e cerca de 5% de pólen e micronutrientes, incluindo vitaminas como B1, B2, B6, C e E (Bonamigo *et al.* 2017; Dos Santos *et al.* 2017). Sua cor e composição química variam de acordo com a origem botânica das resinas e com a espécie de abelha produtora, podendo apresentar tonalidades que vão do marrom escuro ao verde ou vermelho (Lustosa *et al.* 2008). Essa diversidade resulta dos diferentes processos botânicos que originam os materiais vegetais utilizados na sua formação (Portal; Cordova, 2023).

A própolis apresenta um aroma característico derivado de seus componentes voláteis, os quais também possuem importante atividade biológica (Portal; Cordova, 2023). Suas propriedades físicas são igualmente variáveis: pode ser dura e quebradiça ou apresentar textura pegajosa e elástica, além de exibir colorações que vão do creme e amarelo ao verde, marrom claro ou marrom escuro (Portal; Cordova, 2023).

Dentro da colmeia, a própolis cumpre funções essenciais. Ela é utilizada para vedar frestas, criar ambientes assépticos para a postura de ovos pela rainha e até mesmo envolver e mumificar insetos invasores, prevenindo sua decomposição e a proliferação de microrganismos (Lustosa *et al.* 2008). Suas propriedades antimicrobianas oferecem ainda uma barreira química eficaz, contribuindo para a proteção das abelhas, da colmeia e do mel contra bactérias e fungos (Lavinias *et al.* 2019; Portal; Cordova, 2023).

No caso das abelhas sem ferrão (*Meliponini*), as resinas vegetais são ainda mais essenciais. Elas não só são usadas na construção dos ninhos, mas também atuam como repelentes naturais, impedindo a invasão de cupins e formigas. Armazenadas em grandes quantidades, essas resinas também inibem o crescimento de bactérias e fungos, garantindo a sobrevivência e a manutenção dos ninhos (Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

A própolis tem despertado grande interesse científico devido às suas propriedades farmacológicas. Estudos destacam suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antimicrobiana, especialmente no caso da própolis produzida por abelhas sem ferrão (Al-Hatamleh *et al.* 2020). Segundo Popova, Trusheva e Bankova (2021), a composição química da própolis, que determina suas bioatividades, varia conforme a flora local e a espécie de abelha.

No Brasil, o interesse pela própolis ganhou força na década de 1980, com os estudos pioneiros de Ernesto Ulrich Breyer, que destacou suas propriedades terapêuticas e seu potencial como antibiótico natural (Lustosa *et al.* 2008). Hoje, o país é o maior produtor mundial de própolis, com uma produção anual que varia entre 50 e 150 toneladas (Dos Santos *et al.* 2017). A qualidade do produto é regulamentada pelos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) do MAPA, que estabelecem parâmetros como teor de cera, flavonoides, compostos fenólicos, atividade de oxidação e características sensoriais, como aroma, cor e sabor (Oliveira, 2023).

Atualmente, a própolis é amplamente utilizada como remédio popular em diversas partes do mundo, sendo comercializada tanto em sua forma pura quanto combinada a outros produtos naturais em preparações de venda livre, cosméticos e alimentos funcionais (Bankova; Trusheva; Popova, 2021). Apesar da grande diversidade de abelhas nativas brasileiras, a maioria dos estudos sobre composição química e atividades biológicas da própolis ainda se concentra em amostras produzidas por espécies exóticas introduzidas no país (Portal; Cordova, 2023).

2.2.2 Própolis e geoprópolis: diferenças estruturais e funcionais

Esta substância resinosa pode ser combinada com partículas de solo por algumas espécies de abelhas sem ferrão, originando o material conhecido como geoprópolis (Portal; Cordova, 2023).

Para a manutenção de uma colônia, é fundamental a produção e a obtenção de materiais estruturais. Entre eles, destacam-se a cera, a própolis e a geoprópolis, cada um com composição e funções específicas (Bertolini *et al.* 2023). A cera é secretada por abelhas jovens e, quando misturada às resinas vegetais, origina o

cerume, essencial na construção de estruturas da colônia, como células de cria. Além disso, funciona como barreira entre o ambiente interno e externo, conferindo propriedades impermeabilizantes e antibacterianas (Bertolini *et al.* 2023).

A própolis, por sua vez, é formada pela coleta de resinas vegetais que são posteriormente misturadas à cera em proporções variáveis. Quando a resina predomina, obtém-se a própolis, utilizada principalmente para vedação e proteção da colônia. Quando há maior proporção de cera, forma-se o cerume. Bertolini *et al.* (2023) destacam que, a resina vegetal pura também pode ser aplicada diretamente para vedação.

É comum haver confusão na literatura entre os termos “cerume” e “própolis”. O cerume resulta da mistura de resina vegetal com cera e é empregado na construção de estruturas internas, como potes de mel. Já a própolis possui composição distinta, incluindo saliva e secreções glandulares, e desempenha funções específicas na proteção da colônia (Popova; Trusheva; Bankova, 2021; Rocha *et al.* 2023).

Entre algumas espécies de *Meliponini*, destaca-se ainda a produção de geoprópolis, material composto pela combinação de resinas vegetais com partículas de solo ou argila. Diferentemente da própolis, a geoprópolis apresenta menor maleabilidade e contém minerais característicos da região de origem. É utilizado na construção do ninho, especialmente na formação do batume, e na vedação (Bertolini *et al.* 2023; Rocha *et al.*, 2023). A adição de terra, embora não majoritária, representa seu principal diferencial (Portal; Cordova, 2023).

É importante reforçar que “geoprópolis” e “própolis” não são sinônimos. De acordo com Popova, Trusheva e Bankova (2021), a maioria das abelhas *Meliponini* não incorpora partículas de solo à própolis. Enquanto esta é composta majoritariamente por resinas e cera, a geoprópolis inclui solo, resultando em maior rigidez e em perfis químicos distintos, marcados por minerais específicos do ambiente (Lavinhas *et al.* 2019; Rocha *et al.* 2023).

Em síntese, tanto *Apis mellifera* quanto abelhas sem ferrão produzem própolis, mas apenas algumas espécies de *Meliponini*, como *Melipona scutellaris*, *Melipona marginata* e *Melipona quadrifasciata*, produzem geoprópolis. Embora menos maleável, esse material desempenha funções semelhantes de proteção e estruturação da colônia (Rocha *et al.* 2023).

A diversidade biológica das abelhas sem ferrão também se reflete na composição química da própolis que produzem. Essa variação está diretamente relacionada às fontes vegetais exploradas e influencia suas propriedades biológicas e farmacológicas. Assim, compreender os efeitos terapêuticos da própolis demanda a análise detalhada de sua composição química e dos principais metabólitos envolvidos.

2.3 COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE QUÍMICA DA PRÓPOLIS

A própolis é um material resinoso elaborado pelas abelhas a partir da coleta de exsudatos vegetais presentes ao redor das colmeias, resultando em um produto de composição química ampla e heterogênea (Hipólito, 2013). Essa composição é modulada por diversos fatores, entre eles a flora disponível, a espécie de abelha, as condições ambientais, como clima e sazonalidade, e até aspectos genéticos, incluindo a linhagem da rainha (Oliveira, 2023; Lustosa *et al.* 2008). Como exemplo, Oliveira (2023) destaca que própolis coletada em períodos chuvosos pode apresentar um perfil químico distinto da obtida na mesma região durante a estação seca.

A variação geográfica também exerce influência marcante, uma vez que o perfil químico depende diretamente das plantas das quais as abelhas obtêm a resina durante a forrageação. Estudos indicam que abelhas da mesma espécie tendem a produzir própolis quimicamente semelhante dentro de uma mesma área, reforçando a importância da flora local (Dos Santos *et al.* 2017; Rocha *et al.* 2023). Dessa forma, a variabilidade química está relacionada ao ambiente, à disponibilidade de fontes vegetais e ao momento da coleta (Lustosa *et al.* 2008; Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

A caracterização química das amostras é fundamental na pesquisa científica, pois permite relacionar a composição aos efeitos biológicos observados. Grande parte dos compostos responsáveis pelas propriedades bioativas da própolis e da geoprópolis deriva de metabólitos fenólicos provenientes das plantas visitadas pelas abelhas. Esses metabólitos integram o metabolismo secundário vegetal e, diferentemente dos metabólitos primários, diretamente relacionados ao crescimento e à manutenção celular, estão principalmente associados à defesa, às interações ecológicas e à resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos (Portal; Cordova,

2023).

Embora presentes em menor proporção, os constituintes voláteis da própolis também fornecem informações importantes sobre sua atividade antimicrobiana e sua origem botânica. Os voláteis são metabólitos secundários amplamente distribuídos nas plantas, exercendo funções ecológicas diversas, como atração de polinizadores, defesa contra herbívoros e microrganismos e ações inseticidas, fungicidas e bactericidas (Portal; Cordova, 2023). Entre esses compostos, os terpenos constituem a maior fração.

A seleção de resinas pelas abelhas não depende apenas da abundância desse material, mas também de características sensoriais, especialmente cor e volatilidade. Compostos como mono e sesquiterpenoides são citados como os principais responsáveis pela atração, seguidos por diterpenoides, triterpenoides e diferentes fenólicos, incluindo flavonoides (Lavinias *et al.* 2019; Rocha *et al.* 2023). Em conjunto com os ácidos fenólicos, esses compostos formam o núcleo bioativo da própolis.

Mais de 300 substâncias já foram descritas em diferentes amostras, envolvendo polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenoides, esteroides, aminoácidos e outros metabólitos secundários (Hipólito, 2013; Oliveira, 2023). Flavonoides como galangina, quercetina, pinocembrina, kaempferol, apigenina e crisina, além de ácidos fenólicos como o caféico e o clorogênico, são encontrados com frequência em própolis de diferentes origens. Outros compostos, entretanto, são característicos de determinados tipos e regiões, como demonstrado por Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) e confirmado por Oliveira (2023).

A composição também pode variar entre espécies de abelhas. Popova, Trusheva e Bankova (2021) apontam que, a própolis de *Meliponini* costuma apresentar maior diversidade química quando comparada à produzida por *A. mellifera*. Espécies dos gêneros *Melipona*, *Frieseomelitta*, *Scaptotrigona*, *Trigona* e *Tetragonisca* produzem própolis quimicamente ricas, especialmente em terpenoides e fenólicos (Lavinias *et al.* 2019).

Além dos fenólicos e terpenoides, a própolis contém cumarinas, benzofenonas, alcaloides, ácidos graxos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, minerais, vitaminas e proteínas em diferentes proporções (Lustosa *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2023). Essa variedade de compostos explica suas diversas ações biológicas já relatadas, como

efeitos antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, antioxidantes, anticancerígenos e antidiabéticos (Dos Santos *et al.* 2017; Popova; Trusheva; Bankova, 2021; Oliveira, 2023). Estudos também indicam atividades antinociceptivas, antimutagênicas e relacionadas à inibição da perda óssea (Popova; Trusheva; Bankova, 2021). Entre esses constituintes, flavonoides e ácidos fenólicos se destacam por sua atuação antibacteriana, antiviral e antioxidante (Lustosa *et al.* 2008).

Outro elemento que contribui para a variação química da própolis é o método de extração utilizado. Além da espécie de abelha e dos fatores ambientais, o tipo de solvente e a técnica de extração influenciam na obtenção dos metabólitos secundários de interesse. O objetivo da extração é separar os compostos vegetais de impurezas, como a cera, para análises químicas ou bioensaios (Bankova *et al.* 2019).

A literatura demonstra que extrações realizadas com solventes alcoólicos tendem a apresentar maior eficiência na obtenção de compostos bioativos quando comparadas às extrações aquosas, em função da maior afinidade desses solventes com metabólitos de polaridade intermediária, como os compostos fenólicos (Bankova; Trusheva; Popova, 2021; Kolaylı & Birinci, 2024). Dessa forma, o etanol destaca-se como um dos solventes mais utilizados, por favorecer a solubilização, a difusão e a reatividade dos compostos presentes na matriz da própolis.

Como a própolis é composta majoritariamente por resinas e cera, a investigação química foca principalmente nos metabólitos de origem vegetal, que são os responsáveis por sua atividade biológica. Esses compostos também permitem identificar as espécies vegetais visitadas pelas abelhas, sendo fundamentais para o controle de qualidade e para a padronização do produto. Em tipos de própolis pouco estudados, essa análise pode revelar novos compostos bioativos (Bankova *et al.* 2019).

A caracterização química utiliza diferentes metodologias analíticas, escolhidas conforme o tipo de amostra, sua volatilidade e seu estado físico (sólido, líquido ou gasoso). Entre as técnicas mais empregadas estão a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), essenciais para a identificação e quantificação dos componentes químicos (Lustosa *et al.* 2008; Popova; Trusheva; Bankova, 2021). Outras abordagens, como LC-MS, também são amplamente utilizadas devido à alta sensibilidade e resolução

(Al-Hatamleh *et al.* 2020). A GC-MS, por sua vez, combina separação cromatográfica e identificação espectrométrica, sendo indicada para análises de misturas complexas (Bankova *et al.* 2019).

Na indústria farmacêutica, a análise química é fundamental tanto para compreender mecanismos de ação de compostos quanto para identificar novos candidatos terapêuticos, com potencial para reduzir efeitos adversos, aumentar a eficácia ou atuar sinergicamente com fármacos já existentes.

2.3.1 Compostos fenólicos e flavonoides na própolis

A composição química da própolis consiste em um conjunto diversificado de compostos fenólicos, cuja variabilidade inclui muitas moléculas pertencentes a distintas classes (Bankova *et al.* 2019). Esses compostos exercem funções essenciais na biologia vegetal, atuando como antioxidantes naturais e contribuindo para a proteção das plantas contra estresses ambientais, como radiação ultravioleta e infecções por patógenos.

A maior parte das pesquisas sobre própolis tem se concentrado na análise química da própolis produzida pela espécie *A. mellifera*, uma abelha introduzida artificialmente no ecossistema brasileiro (Dos Santos *et al.* 2017). No entanto, a própolis produzida por abelhas nativas sem ferrão tem ganhado destaque, especialmente devido às elevadas concentrações de flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides presentes em seus extratos. Esses compostos demonstram potencial antioxidante e atividade antimicrobiana promissora, o que torna a própolis de abelhas sem ferrão uma fonte valiosa para a descoberta de novas moléculas com propriedades funcionais e nutricionais, como indicado por Rocha *et al.* (2024).

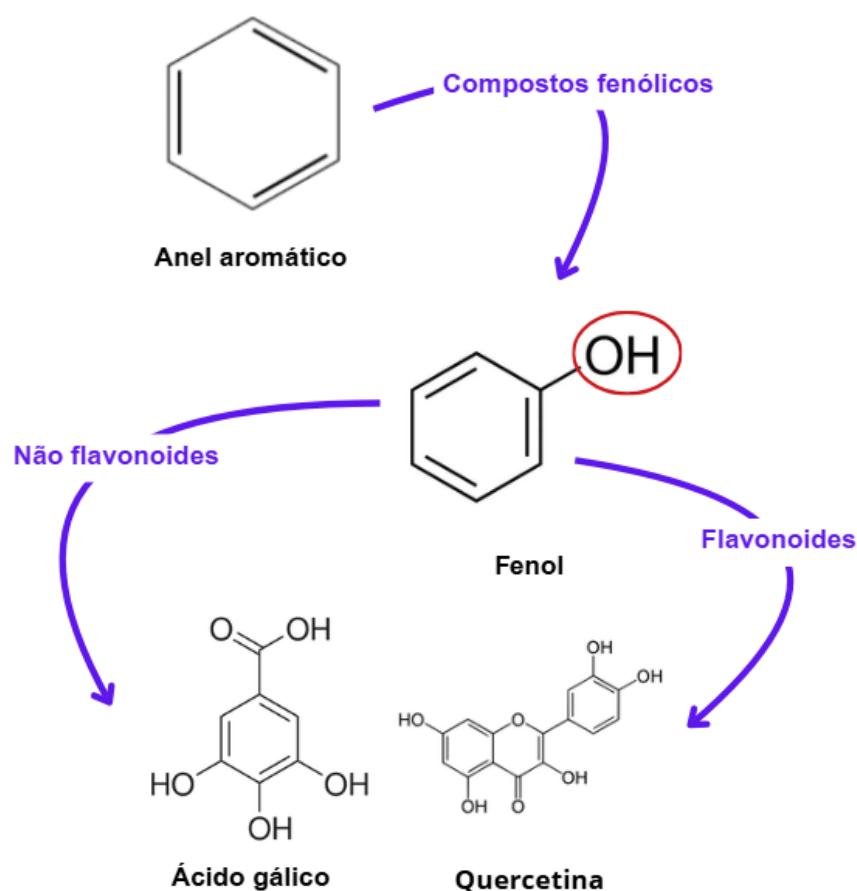
Segundo Dos Santos *et al.* (2017), os compostos fenólicos, uma classe relevante de substâncias químicas presentes em diversas partes das plantas (folhas, flores, cascas e frutos), são os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas da própolis. Eles possuem atividades imunomoduladoras, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórias e antimicrobianas, desempenhando um papel essencial na defesa das plantas contra microrganismos e, conseqüentemente, na proteção de humanos e animais contra patógenos (Rocha *et al.* 2024). Esses compostos são

incorporados à própolis durante a coleta de resinas e exsudatos vegetais, como os produzidos por *Dalbergia ecastophyllum* (origem da própolis vermelha) e *Baccharis dracunculifolia* (origem da própolis verde) (Rocha *et al.* 2023).

Com mais de 8.000 tipos já identificados em plantas, os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza. Eles podem atuar como pigmentos, responsáveis pelas cores dos alimentos, ou como produtos do metabolismo secundário, geralmente resultantes de reações de defesa das plantas contra agressões ambientais. Sua atividade antioxidante é atribuída à capacidade de doar hidrogênio ou elétrons, além da formação de radicais intermediários estáveis, que ajudam a evitar a oxidação de componentes alimentares, especialmente lipídios (Silva *et al.* 2010).

Os compostos fenólicos são classificados como metabólitos secundários das plantas, sintetizados em resposta a situações de estresse ou danos (Rocha *et al.* 2023). Apresentados didaticamente na Figura 5, incluem todos os fenóis, simples (monofenóis) e complexos (polifenóis). Os polifenóis, um subgrupo dos compostos fenólicos, por sua vez são divididos em duas categorias principais: flavonoides (como flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas) e não flavonoides (como ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e taninos hidrolisáveis). Sua estrutura química inclui pelo menos um anel aromático (benzeno), ao qual está ligado uma ou mais hidroxilas (-OH) (Sucupira *et al.* 2015).

Figura 5 – Estrutura básica e principais subclasses dos compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Cartilha de Alimentos Funcionais – UFRA (2024).

Os polifenóis, também chamados de fitoquímicos, por serem produzidos pelas plantas, formam um grupo amplo e heterogêneo de metabólitos secundários presentes em ambientes aquáticos e terrestres. Remya *et al.* (2022) destacam que, devido à variedade de atividades biológicas que exercem, esses polifenóis naturais têm sido considerados potenciais substitutos em formulações industriais, incluindo nutracêuticos, suplementos alimentares, cosmecêuticos e produtos farmacêuticos.

Essa diversidade estrutural e funcional explica a ampla gama de propriedades terapêuticas atribuídas à própolis (Silva *et al.* 2010; Dos Santos *et al.* 2017). Entre os fenólicos, os ácidos fenólicos desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres, protegendo as células contra danos oxidativos. Compostos como ácido cafeico e ácido ferúlico também apresentam ação anti-inflamatória, atuando na inibição de enzimas pró-inflamatórias e na redução da produção de citocinas.

Os flavonoides, por sua vez, representam o maior grupo de polifenóis. Eles possuem uma estrutura característica composta por 15 átomos de carbono (C6-C3-C6), formada por dois anéis aromáticos conectados por uma cadeia de três carbonos (Bankova *et al.* 2019). Esses metabólitos secundários, frequentemente responsáveis pelas cores vibrantes de flores, frutos e plantas medicinais, desempenham funções protetoras importantes contra estresses bióticos e abióticos (Santos; Silva, 2020). Além disso, exibem uma ampla variedade de atividades farmacológicas e biológicas, como ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, estrogênica e imunossupressora.

Os compostos fenólicos também funcionam como marcadores químicos úteis para determinar a origem botânica da própolis. Um exemplo marcante é a presença de isoflavonas como formononetina e biochanina A, além de chalconas como isoliquiritigenina, características da própolis vermelha (Rocha *et al.* 2023).

Para a análise desses compostos, métodos espectrofotométricos se destacam pela eficiência e confiabilidade na determinação do teor de fenólicos totais ou flavonoides totais. Como observam Bankova *et al.* (2019), tais técnicas são particularmente úteis pela rapidez na caracterização de própolis, já que fenólicos e flavonoides figuram entre seus componentes bioativos majoritários. O Teor de Compostos Fenólicos Totais (TPC) é geralmente determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, que quantifica todos os compostos capazes de reduzir o reagente, sendo os resultados expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (Wolff; Silveira; Lazzarotto, 2019). Já o Teor Total de Flavonoides (TFC) é usualmente obtido por ensaios baseados na formação de complexos com cloreto de alumínio (Bankova *et al.* 2019).

Entretanto, estudar produtos naturais como a própolis envolve desafios, especialmente devido à elevada diversidade de compostos presentes e à dificuldade de identificar quais moléculas são responsáveis por atividades biológicas específicas. Outro obstáculo é determinar as concentrações exatas necessárias para que tais efeitos ocorram, conforme discutido por Rocha *et al.* (2023). Entre as atividades mais investigadas da própolis estão as ações antimicrobiana e antioxidante, esta última frequentemente avaliada por métodos como DPPH, ABTS, FRAP e ORAC.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DA PRÓPOLIS

A própolis e a geoprópolis, produzidas por diferentes espécies de abelhas sem ferrão, têm atraído crescente interesse científico devido ao expressivo potencial farmacológico que apresentam (Lavinias *et al.* 2019). Ambas são reconhecidas por um amplo espectro de propriedades terapêuticas, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória, conforme descrito por Lustosa *et al.* (2008).

Essas atividades estão diretamente relacionadas à composição química desses produtos, a qual varia conforme a espécie de abelha e a vegetação disponível em cada região (Bonamigo *et al.* 2017; Lavinias *et al.* 2019). Os compostos bioativos presentes são os principais responsáveis por suas ações biológicas, e sua concentração é influenciada tanto pelas características da flora quanto pelas condições climáticas locais, como indicado por Escriche e Juan-Borrás (2018) e Rocha *et al.* (2023).

Embora menos estudada que a própolis produzida por *A. mellifera*, a própolis de abelhas sem ferrão tem demonstrado, em estudos recentes, maior atividade antimicrobiana (Al-Hatamleh *et al.* 2020). Segundo Dos Santos *et al.* (2017), sua capacidade de inibir o crescimento microbiano, especialmente de bactérias gram-positivas, está entre as propriedades mais estudadas e bem documentadas (Rocha *et al.* 2023). Independentemente da origem, a própolis apresenta ação antimicrobiana, atuando como agente bactericida e fungicida, desempenhando funções essenciais na proteção da colmeia.

A atividade antioxidante da própolis também varia conforme o gênero e a espécie das abelhas, indicando que a diversidade genética influencia diretamente sua composição química e, conseqüentemente, suas propriedades biológicas, como sugerido por Lavinias *et al.* (2019). Essa variabilidade igualmente se aplica à geoprópolis que, embora menos investigada, compartilha diversas características benéficas da própolis (Dos Santos *et al.* 2017).

Por fim, a elevada atividade antioxidante da própolis é atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, que figuram entre os mais de 300 compostos já identificados nesse produto natural (Rocha *et al.* 2023).

2.4.1 Própolis como agente antioxidante

A atividade antioxidante da própolis está diretamente relacionada à sua capacidade de sequestrar radicais livres no organismo. Essa propriedade é atribuída principalmente aos compostos fenólicos, especialmente aos flavonoides, que neutralizam espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxila, peroxila e superóxido, e quelam metais de transição, reduzindo seus efeitos nocivos (Dos Santos *et al.* 2017).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade do sistema antioxidante endógeno, sendo um fator importante no desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos e no envelhecimento (Jeong *et al.* 2024). Embora essenciais em baixas concentrações, níveis elevados de ROS podem danificar moléculas biológicas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (Jeong *et al.* 2024).

Antioxidantes naturais, como vitaminas, polifenóis e carotenoides presentes em frutas, vegetais e outras dietas ricas em plantas, exercem diversos efeitos biológicos capazes de neutralizar ROS e prevenir o estresse oxidativo (Jeong *et al.* 2024). Nesse contexto, a própolis brasileira destaca-se por sua composição química diversa, influenciada pelas distintas zonas climáticas do país. Sua atividade antioxidante, especialmente evidente na própolis de abelhas sem ferrão, está associada ao elevado teor de flavonoides e compostos fenólicos (Lavinias *et al.* 2019).

Esses antioxidantes atuam retardando ou impedindo a oxidação de lipídios e outras moléculas mesmo em baixas concentrações, interrompendo reações oxidativas e protegendo células dos danos causados por radicais livres (Al-Duais *et al.* 2009; Sucupira *et al.* 2015; Bonamigo *et al.* 2017). Assim, a atividade antioxidante da própolis contribui diretamente para a prevenção de doenças e o retardamento do envelhecimento (Lavinias *et al.* 2019; Rocha *et al.* 2023). Segundo Rocha *et al.* (2023), radicais livres podem oxidar DNA e membranas celulares, favorecendo o desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes e problemas cardiovasculares; identificar compostos naturais capazes de neutralizá-los é, portanto, essencial (Lavinias *et al.* 2019).

Os flavonoides são os antioxidantes mais abundantes na própolis e se destacam pela presença de grupos hidroxila em sua estrutura, que conferem elevada capacidade de neutralização de radicais livres, protegendo contra danos celulares associados ao estresse oxidativo (Lustosa *et al.* 2008; Rocha *et al.* 2023). Além deles, a própolis contém tocoferóis, vitamina C e carotenoides, que também desempenham funções importantes na proteção antioxidante (Sucupira *et al.* 2015).

A atividade antioxidante da própolis é geralmente avaliada por métodos *in vitro*, divididos em dois grupos: (1) métodos baseados na captura de radicais livres e (2) métodos que avaliam a oxidação de uma molécula-alvo (Sucupira *et al.* 2015). Entre os mais utilizados estão os testes DPPH, ABTS, FRAP e ORAC, que quantificam a capacidade da amostra de neutralizar radicais ou reduzir processos oxidativos (Oliveira, 2015; Sucupira *et al.* 2015; Lavinias *et al.* 2019). Esses métodos também avaliam a transferência de elétrons, favorecendo a redução de íons metálicos, grupos carbonila e radicais livres (Jeong *et al.* 2024).

No teste DPPH, observa-se a redução da coloração roxa; no ABTS, há diminuição da cor azul-esverdeada, ambas proporcionais à potência antioxidante. No FRAP, ocorre intensificação da cor azul devido à redução do complexo férrico-TPTZ (Fe^{3+}) para sua forma ferrosa (Fe^{2+}), conforme descrito por Al-Hatamleh *et al.* (2020). O ORAC, por sua vez, avalia a capacidade de absorção de radicais oxigenados.

Cada método possui limitações e nenhum é suficiente, sozinho, para representar a capacidade antioxidante total de uma amostra. Por isso, recomenda-se o uso combinado de múltiplos ensaios para maior precisão e confiabilidade (Oliveira, 2015; Sucupira *et al.* 2015). Entre eles, os testes DPPH e ABTS são os mais amplamente aplicados na literatura (Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

2.4.1.1 Método DPPH para avaliação da atividade antioxidante

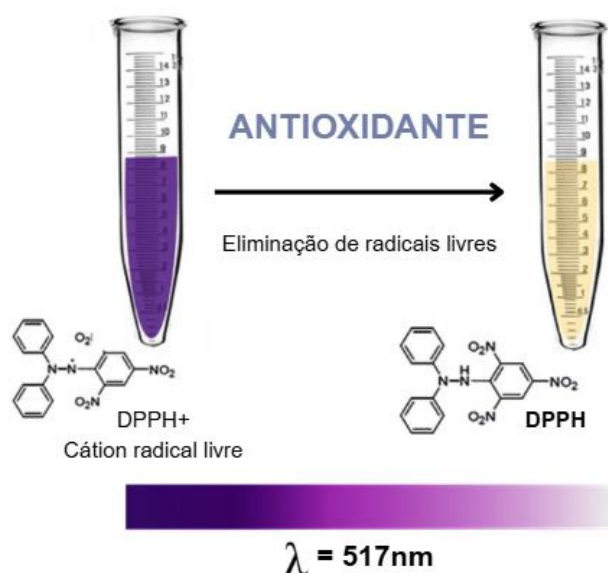
O método mais amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos é o ensaio baseado na captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Rocha *et al.* 2023). Sua popularidade se deve à rapidez, praticidade, estabilidade e elevada sensibilidade, sendo aplicável a amostras sólidas e líquidas, incluindo alimentos e sistemas biológicos complexos (Kedare; Singh, 2011; Sucupira

et al. 2015).

O DPPH é um radical livre estável de nitrogênio, de coloração púrpura ou violeta, que apresenta absorção máxima em soluções etanólicas ou metanólicas na faixa de 515–520 nm. Quando um composto antioxidante é adicionado à solução contendo DPPH, ocorre a doação de um átomo de hidrogênio ou a transferência de um elétron para o radical, levando à sua neutralização (Figura 6). Esse processo converte o DPPH em sua forma reduzida e diamagnética (DPPH-H), provocando a diminuição da absorbância e a mudança da cor violeta para amarelo pálido ou violeta claro, dependendo do tempo de reação (Oliveira, 2015; Sucupira *et al.* 2015). Assim, no teste DPPH, a redução do radical livre resulta diretamente na alteração cromática de roxo para amarelo (Jeong *et al.* 2024).

Quando a solução de DPPH é misturada com um substrato antioxidante (AH) capaz de doar um átomo de hidrogênio, forma-se a espécie reduzida, com conseqüente perda da coloração violeta (Alam; Bristi; Rafiquzzaman, 2013).

Figura 6 – Representação esquemática do método DPPH



Fonte: Jeong *et al.* (2024, p. 04).

Nota: Quando uma solução de DPPH⁺ é combinada com antioxidantes, o DPPH⁺ é convertido em sua forma reduzida e a cor muda de violeta para amarelo pálido.

A redução do radical DPPH é monitorada pela diminuição da absorbância ao longo do tempo, permitindo quantificar a capacidade antioxidante do composto ou extrato avaliado. O ensaio é especialmente útil para substâncias solúveis em solventes orgânicos, característica comum a muitos antioxidantes presentes em frutas, vegetais e outros alimentos (Sucupira *et al.* 2015). Além disso, o DPPH é comercialmente disponível, dispensando a geração prévia do radical e tornando o método mais simples que outros ensaios, como o ABTS (Sucupira *et al.* 2015).

Apesar de suas vantagens, o método DPPH apresenta limitações. Desde sua primeira aplicação, passou por diversas modificações metodológicas, resultando na existência de múltiplos protocolos, o que pode comprometer a comparabilidade dos resultados entre diferentes estudos. Além disso, o radical apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, restringindo a avaliação de antioxidantes hidrofílicos; é sensível à luz e às condições experimentais; pode sofrer interferência da cor e da turbidez da amostra, especialmente em matrizes complexas como a própolis; e apresenta seletividade de reação e cinética variável para diferentes classes de compostos antioxidantes (Oliveira, 2015).

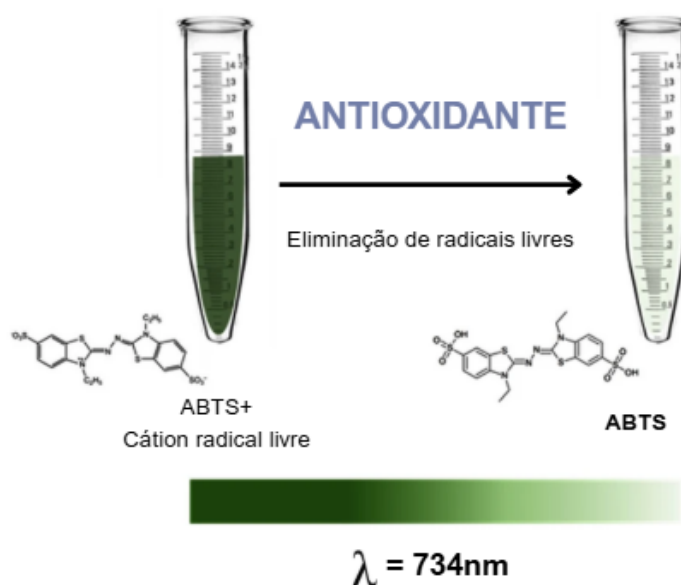
2.4.1.2 Método ABTS para avaliação da atividade antioxidante

O teste ABTS baseia-se na capacidade dos antioxidantes de reduzir o radical cátion $ABTS^{\cdot+}$, formado a partir do composto 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) por oxidação. Esse radical apresenta elevada solubilidade tanto em meio aquoso quanto em solventes orgânicos, o que permite a avaliação de compostos hidrossolúveis e lipossolúveis, tornando o método versátil para a análise de alimentos, extratos vegetais e substâncias puras.

A redução do radical $ABTS^{\cdot+}$ pelos antioxidantes provoca o descolorimento da solução, associado à diminuição da coloração azul-esverdeada ilustrada na Figura 7, sendo essa variação monitorada espectrofotometricamente para determinação da atividade antioxidante. Trata-se de um método rápido, reprodutível e aplicável em diferentes meios orgânicos e aquosos (Kuskoski *et al.* 2005; Sucupira *et al.* 2015; Santos; Silva, 2020).

O radical $ABTS^{\cdot+}$ é geralmente gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio, produzindo um cátion estável de coloração azul-esverdeada, que é subsequentemente reduzido pelos antioxidantes, resultando em seu descolorimento, mecanismo descrito tanto por Jeong *et al.* (2024) quanto por Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013), que reforçam que o radical não ocorre naturalmente no organismo humano, sendo utilizado exclusivamente como ferramenta analítica.

Figura 7 – Representação esquemática do método ABTS



Fonte: Jeong *et al.* (2024, p. 04).

Nota: O $ABTS^{\cdot+}$ reage com antioxidantes para reduzir o radical ABTS. A reação progride faz com que perca sua cor verde-azulada.

2.4.3.3 Atividade antioxidante pelo poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

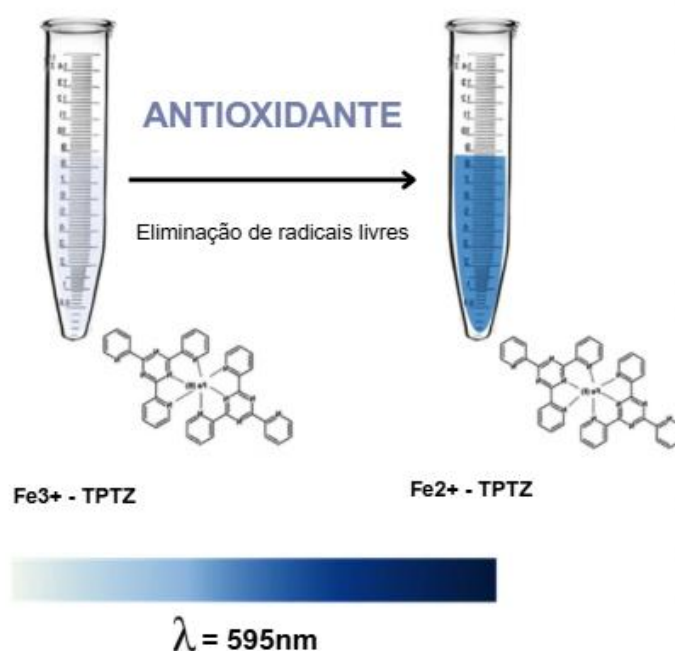
O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) não avalia a neutralização de radicais específicos, mas sim a capacidade global de redução dos compostos presentes na amostra. Dessa forma, mede o potencial antioxidante por meio da habilidade do antioxidante em reduzir o ferro, sendo amplamente utilizado na análise de extratos, alimentos e frutas (Sucupira *et al.* 2015).

No ensaio, o complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{3+} -TPTZ) reage com

substâncias antioxidantes em meio ácido, sendo reduzido a Fe^{2+} -TPTZ, conforme demonstrado na Figura 8. Esse produto apresenta uma coloração azul intensa, com máximo de absorção em 593 nm, o que permite sua quantificação espectrofotométrica (Sucupira *et al.* 2015).

De acordo com Jeong *et al.* (2024), o método FRAP determina o poder redutor do antioxidante por meio da formação do complexo ferroso colorido, cuja intensidade é proporcional à capacidade antioxidante da amostra. O ensaio é considerado simples, rápido e altamente reprodutível, o que justifica seu uso em análises rotineiras de capacidade antioxidante (Kuskoski *et al.* 2005; Santos; Silva, 2020).

Figura 8 – Representação esquemática do método FRAP



Fonte: Jeong *et al.* (2024, p. 04).

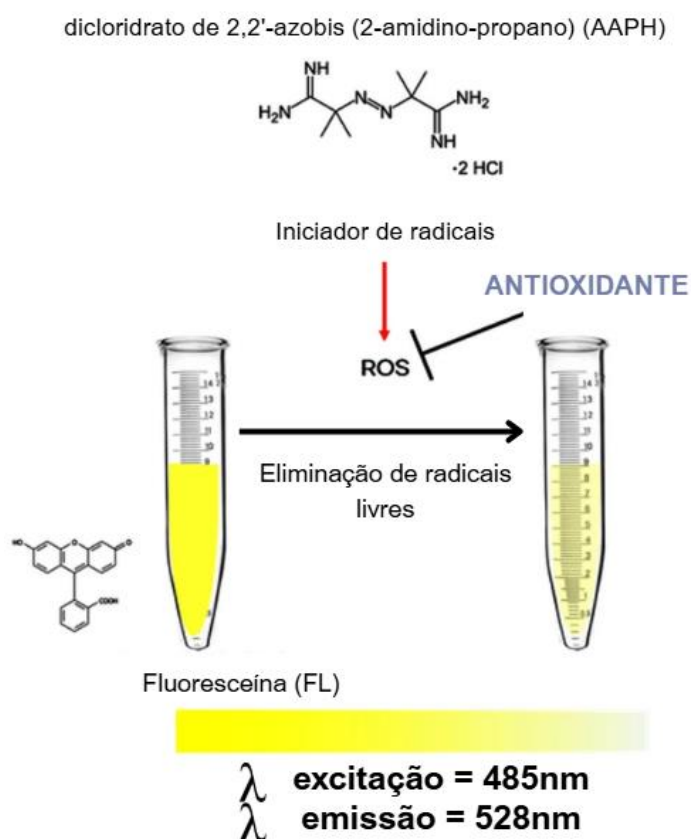
Nota: O teste FRAP avalia a capacidade dos antioxidantes de converter íons férricos (Fe^{3+}) em íons ferrosos (Fe^{2+}). À medida que os antioxidantes convertem Fe^{3+} em Fe^{2+} , um complexo ferroso colorido se forma e sua mudança de cor na absorbância é medida.

2.4.1.4 Atividade antioxidante pela capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

O método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) avalia a capacidade antioxidante de compostos por meio da quantificação da proteção contra radicais reativos do oxigênio, especialmente radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$), que estão associados a processos fisiopatológicos. A técnica baseia-se na oxidação de uma sonda fluorescente, geralmente fluoresceína, induzida pela decomposição térmica de compostos azo, como o AAPH (Figura 9). Na presença de antioxidantes, a perda de fluorescência ocorre mais lentamente, permitindo estimar a eficácia antioxidante (Kuskoski *et al.* 2005; Sucupira *et al.* 2015; Santos; Silva, 2020).

Originalmente, o método utilizava ficobiliproteínas, como β -ficoeritrina ou R-ficoeritrina, altamente sensíveis ao dano oxidativo. Contudo, a fluoresceína passou a ser preferida por apresentar maior estabilidade e melhor reprodutibilidade (Sucupira *et al.* 2015).

Figura 9 – Representação esquemática do método ORAC



Fonte: Jeong *et al.* (2024, p. 04).

Nota: O teste ORAC examina a capacidade dos antioxidantes de prevenir danos oxidativos induzidos por radicais peroxila. O radical peroxila gerado pelo iniciador de radicais reage com a fluoresceína, reduzindo sua intensidade de fluorescência. Os antioxidantes inibem o decaimento da fluorescência removendo o radical peroxila.

Uma vantagem importante do ORAC é sua versatilidade, pois permite medir antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos. No caso dos compostos lipossolúveis, utiliza-se metil- β -ciclodextrina, que auxilia na solubilização desses antioxidantes. Além disso, por empregar fluorescência em vez de absorvância, o método reduz interferências de substâncias coloridas e apresenta maior sensibilidade, refletindo mais adequadamente condições biológicas reais (Sucupira *et al.* 2015).

O teste também pode ser facilmente padronizado e automatizado, favorecendo a comparação entre laboratórios. Estudos demonstram que o ORAC é mais eficiente para avaliar a capacidade antioxidante de fenóis em sistemas biológicos do que outros métodos amplamente utilizados (Al-Duais *et al.* 2009).

Assim, o ORAC é reconhecido como um método robusto e preciso, pois utiliza radicais relevantes ao organismo humano e considera tanto a intensidade quanto a duração da ação antioxidante, tornando-se uma ferramenta confiável para avaliação da atividade antioxidante (Al-Duais *et al.* 2009).

2.4.2 Potencial antimicrobiano da própolis

O mundo enfrenta uma crescente crise decorrente das infecções resistentes a antibióticos, consideradas atualmente a segunda principal causa de morte prematura no planeta. A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma das maiores ameaças à saúde humana nas próximas décadas. Nesse cenário, torna-se essencial descobrir novos antimicrobianos, desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes e aprimorar métodos diagnósticos, além de revisar o uso atual de antibióticos (Buseti; Maggs; Gilmore, 2017).

A própolis tem se destacado por suas expressivas propriedades biológicas, especialmente as atividades antibacteriana e antifúngica. Esses efeitos são atribuídos a compostos como a flavonona pinocembrina, o flavonol galangina e o éster feniletil do ácido cafeico, conhecidos por inibir a RNA-polimerase bacteriana. Outros

constituintes, como flavonoides, ácido cafeico, ácido benzóico e ácido cinâmico, podem causar danos estruturais e funcionais à membrana ou à parede celular dos microrganismos (Lustosa *et al.* 2008). Essa atividade antimicrobiana está relacionada ao comportamento natural das abelhas *Meliponini* e *A. mellifera*, que utilizam resinas vegetais como defesa contra infecções (Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

Diversos estudos têm investigado a ação da própolis contra microrganismos de relevância médica, veterinária e industrial. Segundo Rocha *et al.* (2023), *Staphylococcus aureus* é frequentemente empregado como modelo de bactéria Gram-positiva, enquanto pesquisas antifúngicas concentram-se principalmente em leveduras do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*.

A própolis tende a ser mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas, devido à barreira adicional formada pela membrana externa destas últimas, que dificulta a penetração dos compostos bioativos (Przybyłek e Karpiński, 2019). Além disso, evidências mostram que a própolis pode interferir na permeabilidade da membrana, alterar o potencial transmembrana, inibir a produção de ATP e reduzir a motilidade bacteriana (Przybyłek e Karpiński, 2019).

Entre os compostos fenólicos presentes na própolis, destaca-se a artepilina C (ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico), abundante na própolis verde brasileira e amplamente reconhecida por sua atividade antimicrobiana, sendo um dos principais responsáveis por suas propriedades biológicas (Veiga *et al.* 2017). Outros compostos, como ácidos fenólicos (gálico, cafeico, *p*-cumárico), estilbenos (resveratrol), flavonoides (quercetina, miricetina, rutina, kaempferol, formononetina) e cumarinas, também contribuem significativamente para essa atividade (Rocha *et al.* 2023).

A própolis ainda apresenta efeito sinérgico com antibióticos, inclusive contra cepas resistentes, reforçando seu potencial como complemento terapêutico no enfrentamento da resistência microbiana (Lustosa *et al.* 2008). Diante dos elevados índices de RAM, a busca por novas substâncias antimicrobianas, como aquelas encontradas na própolis, torna-se cada vez mais urgente e promissora (Dos Santos *et al.* 2017).

A comprovação dos efeitos biológicos da própolis exige não apenas testes *in vitro*, mas também abordagens experimentais *in vivo*, que permitem avaliar sua eficácia em organismos inteiros. Nesse contexto, o modelo de *G. mellonella* tem se

mostrado uma ferramenta promissora para investigações científicas, possibilitando análises de toxicidade, atividade antimicrobiana e resposta imunológica.

2.5 A IMPLEMENTAÇÃO DE UM NOVO MODELO ALTERNATIVO *in vivo*: LARVAS DE *Galleria mellonella*

O estudo das relações patógeno-hospedeiro idealmente exigiria o uso de humanos, o que não é viável devido a questões éticas e técnicas. Portanto, a seleção de um modelo animal adequado é essencial, considerando aspectos éticos, econômicos e científicos. Nesse contexto, o modelo de *G. mellonella* tem se destacado como uma ferramenta eficaz para investigar a virulência de diversos microrganismos, com resultados validados em modelos de mamíferos (Benaducci *et al.* 2016; Ménard *et al.* 2021). Embora os modelos murinos sejam considerados o padrão-ouro na pesquisa biomédica devido à sua semelhança com humanos em aspectos como metabolismo, temperatura corporal e resposta imune, seu uso envolve custos elevados, demandas logísticas complexas e preocupações éticas relacionadas ao bem-estar animal (Loh *et al.* 2013; Ménard *et al.* 2021). Essas limitações têm impulsionado o interesse por modelos alternativos, como *Acanthamoeba castellanii* (amebas), *Artemia salina* (artêmia), *Caenorhabditis elegans* (lombrigas), *Danio rerio* (peixe-zebra) e *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta). Dentre esses, as larvas de *G. mellonella* tem se mostrado uma excelente opção para substituir ou complementar modelos tradicionais em diversas pesquisas, como observado por Loh *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2018).

Conhecida como mariposa-da-cera, *G. mellonella* é um inseto da ordem *Lepidoptera* e família *Pyralidae*, com um ciclo de vida holometábolo que inclui quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Wojda *et al.* 2020). O estágio larval é o mais utilizado em pesquisas, especialmente para estudos de infecção, como indicam Tsai, Loh e Proft (2016) e Ménard *et al.* (2021). Esse inseto é cosmopolita, encontrado em quase todos os continentes, exceto na Antártica, e é considerado uma praga para colônias de abelhas, pois suas larvas se alimentam de favos de mel, cera de abelha, exúvias de larvas de abelhas e resíduos de pólen, criando túneis dentro dos favos (Wojda *et al.* 2020; Desai *et al.* 2019). Apesar de seu impacto negativo na apicultura,

G. mellonella tem se tornado, nos últimos 20 anos, um organismo modelo altamente útil para o estudo in vivo de patógenos fúngicos humanos (Wojda *et al.* 2020; Curtis; Binder; Kavanagh, 2022).

Uma das principais vantagens de *G. mellonella* como modelo experimental é a semelhança entre sua resposta imune inata e a dos mamíferos. Embora os insetos não possuam uma resposta imune adaptativa, sua resposta celular inata envolve hemócitos, células que atuam de forma semelhante aos neutrófilos humanos, e moléculas solúveis efetoras, que desempenham funções comparáveis às do sistema imune humoral dos mamíferos (Loh *et al.* 2013; Tsai; Loh; Proft, 2016; Jorjão *et al.* 2018; Pereira *et al.* 2018; Ménard *et al.* 2021; Curtis; Binder; Kavanagh, 2022). Segundo Tsai, Loh e Proft (2016), essa semelhança torna o modelo ideal para investigar infecções bacterianas e fúngicas, além de avaliar a eficácia de novos antimicrobianos.

Além disso, *G. mellonella* é um modelo conveniente e econômico, amplamente utilizado para triagem de novos tratamentos desde a década de 2010. Sua popularidade crescente reflete a busca por alternativas aos modelos tradicionais de vertebrados, que apresentam limitações financeiras, éticas e técnicas (Ménard *et al.* 2021; Curtis; Binder; Kavanagh, 2022). Por ser um invertebrado, o uso de *G. mellonella* não exige formalidades éticas rigorosas, e, embora seja prejudicial às abelhas, é inofensivo para humanos e seguro para manipulação em laboratórios (Smith; Casadevall, 2021).

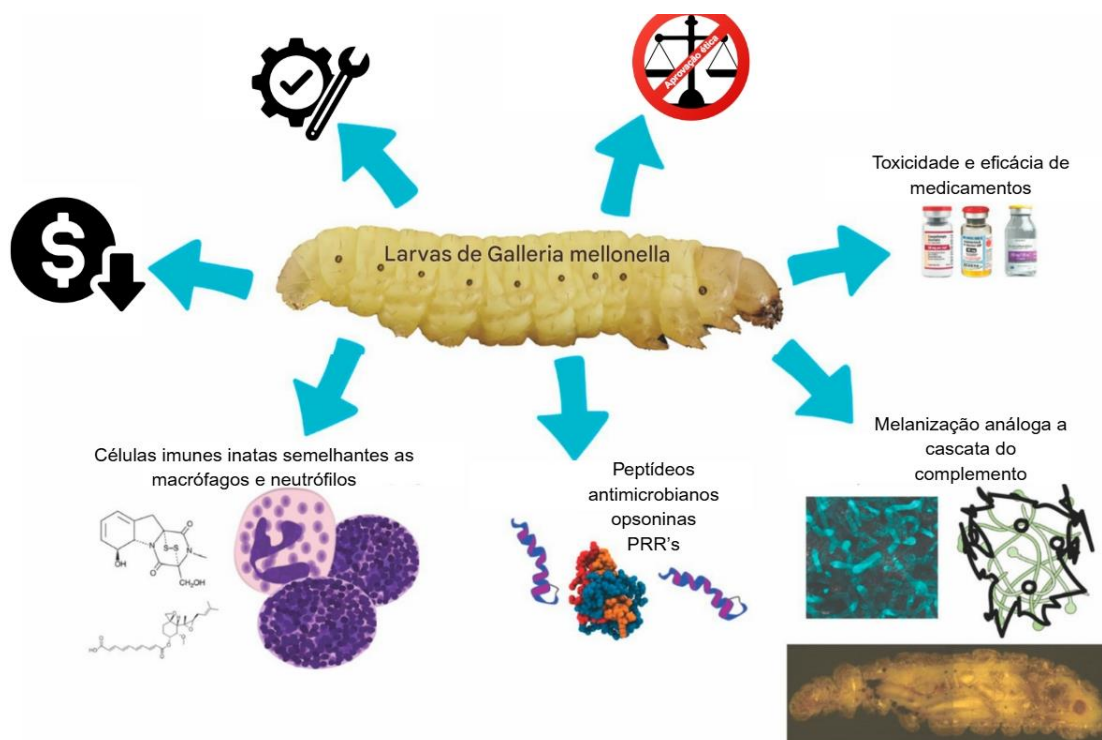
Outra vantagem significativa é a capacidade das larvas de sobreviver a 37 °C, temperatura que mimetiza o ambiente corporal humano, o que é crucial para estudar fatores de virulência dependentes da temperatura (Pereira *et al.* 2018). Esse aspecto, combinado com a facilidade de manuseio, custo acessível e ausência de restrições éticas rigorosas, torna *G. mellonella* superior a outros invertebrados, como *C. elegans* e *D. melanogaster*, para estudos de patógenos humanos, como indicam Loh *et al.* (2013).

O modelo também é amplamente utilizado para avaliar a virulência de patógenos microbianos e testar a toxicidade e eficácia de medicamentos antimicrobianos in vivo (Pereira *et al.* 2018; Wojda *et al.* 2020; Curtis; Binder; Kavanagh, 2022). Sua utilização como etapa preliminar de triagem pode reduzir as

chances de falhas em modelos de mamíferos, economizando tempo e recursos (Tsai; Loh; Proft, 2016). Além disso, o ciclo de vida curto (7 a 8 semanas) e a facilidade de controle da produção e alimentação das larvas com dieta artificial aumentam a viabilidade do modelo em laboratório (Pereira *et al.* 2018; Desai *et al.* 2019; Wojda *et al.* 2020; Ménard *et al.* 2021). O tamanho reduzido das larvas simplifica o processo de infecção, que pode ser induzida por ingestão ou injeção intra-hemocólica, permitindo um controle preciso do inóculo (Jorjão *et al.* 2018; Pereira *et al.* 2018; Wojda *et al.* 2020; Ménard *et al.* 2021; Curtis; Binder; Kavanagh, 2022).

As vantagens do uso do modelo *in vivo* alternativo *G. mellonella* podem ser observadas na Figura 10, a seguir. As larvas apresentam diversos benefícios, incluindo baixo custo de aquisição, fácil manejo, ausência de restrições éticas associadas ao uso de mamíferos e aplicabilidade em testes de toxicidade e eficácia de novos fármacos antifúngicos. Tais vantagens são possíveis devido às semelhanças entre a resposta imune inata de mamíferos e o sistema imunológico desses insetos (Kavanagh; Sheehan, 2018).

Figura 10 – Principais vantagens do uso de *Galleria mellonella* como modelo *in vivo* alternativo



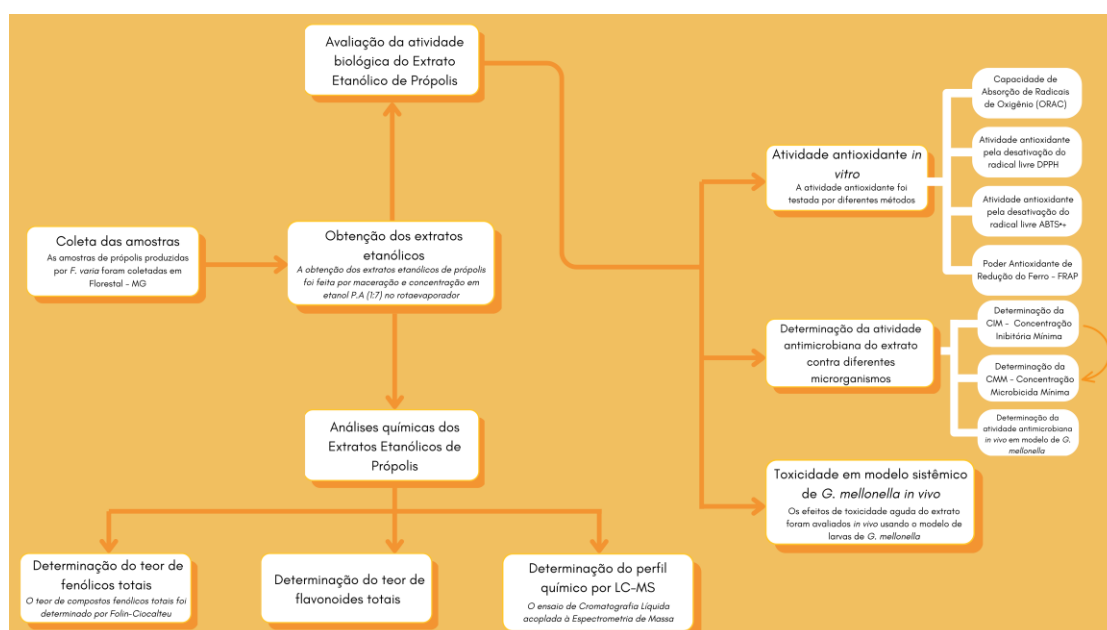
Fonte: Adaptado de Kavanagh e Sheehan (2018, p. 02).

No entanto, o uso de *G. mellonella* também apresenta limitações. A ausência de um sistema imunológico adaptativo significa que os resultados obtidos geralmente precisam ser confirmados em outros modelos (Curtis; Binder; Kavanagh, 2022). Além disso, a falta de padronização nas condições de coleta e armazenamento das larvas pode gerar variações nos resultados, e a ausência de centros de armazenamento de cepas padronizadas dificulta a comparação entre estudos (Tsai; Loh; Proft, 2016; Ménard *et al.* 2021).

3 METODOLOGIA

O procedimento metodológico, que descreve a operacionalização de todas as etapas da pesquisa, está apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Fluxograma da operacionalização das etapas da pesquisa



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

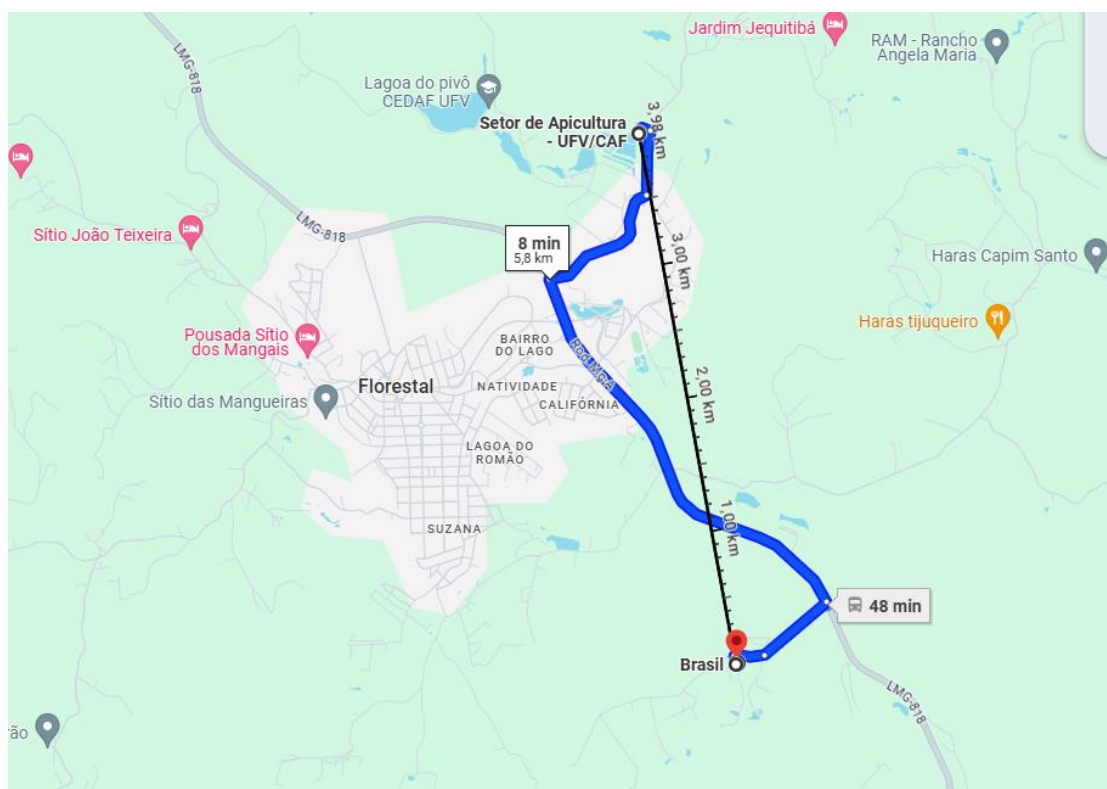
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

As amostras de própolis utilizadas neste estudo foram coletadas na cidade de Viçosa, Minas Gerais, e gentilmente cedidas pela Universidade Federal de Viçosa

(UFV). A coleta foi realizada no primeiro trimestre (entre janeiro e março) de 2024 pelo Professor Doutor Helder Canto Resende, por meio da raspagem da parte interna das tampas que cobrem as caixas das colmeias. As amostras foram identificadas sequencialmente de acordo com a ordem de coleta, recebendo as denominações Amostra 1 (A1), Amostra 2 (A2), Amostra 3 (A3) e Amostra 4 (A4).

As Amostras 1, 2 e 3 foram coletadas no meliponário localizado no campus Florestal da UFV, cujas coordenadas geográficas são 19°52'16"S e 44°24'58"W. Já a Amostra 4 foi obtida na residência do Professor Helder, situada nas coordenadas 19°54'22"S e 44°24'33"W (Figura 12). No total, foram coletadas quatro amostras de própolis para análise.

Figura 12 – Mapa de localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de própolis produzidas por *Frieseomelita varia*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

O meliponário da UFV, onde parte das amostras foi coletada, abriga diversas colônias de abelhas sem ferrão e é dedicado a pesquisas sobre comportamento, ecologia e manejo de abelhas nativas. Essa infraestrutura é fundamental para a

obtenção de amostras representativas e padronizadas.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos devidamente identificados e armazenadas em freezer, onde permaneceram até o momento de sua utilização nos experimentos.

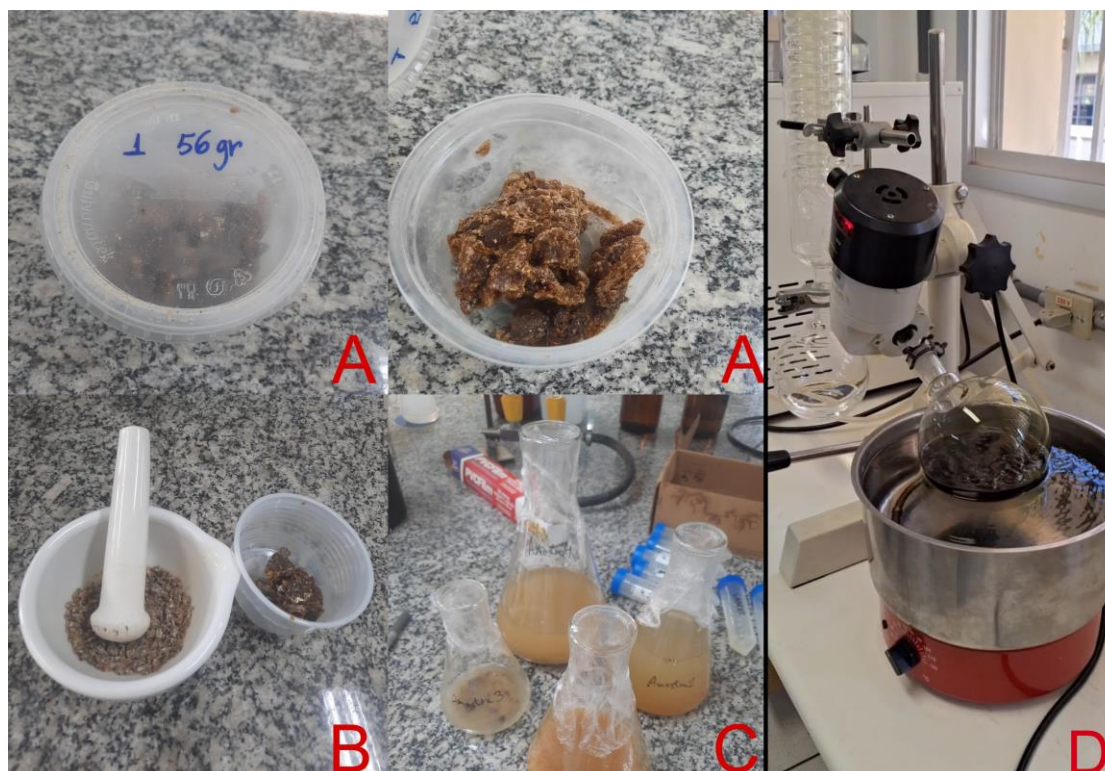
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

No presente estudo, as amostras de própolis bruta (Figura 13A) foram inicialmente limpas para remoção de resíduos de madeira e outras impurezas. Em seguida, foram maceradas manualmente em almofariz e pistilo até obtenção de um pó homogêneo (Figura 13B).

Cada amostra foi pesada, e o processo de extração seguiu a proporção de 1:7 (própolis e solvente), ou seja, para cada grama de própolis triturada foram adicionados 7 mL de solvente. Utilizou-se etanol P.A. devido à sua elevada pureza, que garante maior estabilidade e reprodutibilidade, especialmente em testes químicos e antioxidantes, além de favorecer a extração de compostos menos polares, como flavonoides.

A mistura foi submetida a aquecimento em banho-maria a 70 °C por 30 minutos, temperatura considerada ideal para reduzir o tempo de extração e maximizar o rendimento de constituintes ativos (Bankova, Trusheva e Popova, 2021). A solução foi agitada a cada 5 minutos, seguindo a técnica de maceração descrita por Franchin *et al.* (2012), reconhecida como o método tradicional e mais utilizado para extração dos compostos ativos da própolis (Bankova, Trusheva e Popova, 2021).

Figura 13 – Etapas do processo de obtenção dos extratos etanólicos de própolis de *Frieseomelitta varia* a partir do amostras brutas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: A (amostra de própolis bruta), B (amostra de própolis após a maceração), C (amostras diluídas em etanol P.A., proporção 1:7 (própolis-solvente), preparadas para irem ao banho-maria), D (amostra submetida a rotaevaporador)

Após o aquecimento, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm, e o sobrenadante (filtrado 1) foi separado e reservado. O precipitado resultante da primeira extração foi submetido a uma nova extração, seguindo o mesmo procedimento, obtendo-se um segundo sobrenadante (filtrado 2). Esse filtrado foi então combinado com o filtrado 1.

A solução combinada foi concentrada em um evaporador rotativo (rotaevaporador) para remover o etanol (Figura 13D). O etanol condensado foi separado, resultando nos extratos etanólicos de própolis (EEP) de *F. varia*. Os extratos foram acondicionados em recipientes adequados e levado a uma capela de fluxo laminar para evaporar qualquer resíduo de álcool remanescente. A pesagem dos extratos foi monitorada até atingir um peso constante. Os rendimentos de extração foram calculados com base na quantidade de matéria-prima utilizada.

Por fim, os EEP foram armazenados em refrigerador, onde permaneceram até serem utilizados nos testes subsequentes do estudo.

3.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

3.3.1 Quantificação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos da própolis de *Frieseomelitta varia*

Nesse estudo, o teor de compostos fenólicos totais (TPC) nos EEP de *F. varia* foi determinado por método espectrofotométrico, conforme descrito por Al-Duais *et al.* (2009). Para a análise, utilizou-se o reagente de Folin-Ciocalteu, seguido da adição de solução de carbonato de sódio a 7,5%. A curva de calibração foi construída com padrões de ácido gálico nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL, diluídos em água destilada ($y = 0,0062x - 8E-05$; $R^2 = 0,9985$).

O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, nas quais foram pipetados 20 µL da amostra (EEP), do branco ou dos padrões, seguidos de 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu a 10%. Após cinco minutos de incubação, adicionaram-se 75 µL de carbonato de sódio a 7,5%. Água destilada foi utilizada como branco para correção das leituras.

As microplacas foram mantidas protegidas da luz por 40 minutos, e a absorbância foi medida a 740 nm em leitor de microplacas (*Epoch, BioTek Instruments, Inc.*). O reagente de Folin-Ciocalteu, inicialmente amarelado, reage com os compostos fenólicos formando um complexo azul, cuja intensidade é proporcional ao teor de fenólicos da amostra.

As análises foram conduzidas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato de própolis (mg EAG/g). Diferentes concentrações dos extratos (1,0; 2,0; 2,5; e 3,0 mg/mL), preparadas em etanol P.A., foram testadas para definição da faixa linear mais adequada para a quantificação.

3.3.2 Quantificação do teor de flavonoides totais dos extratos etanólicos de própolis de *Frieseomelitta varia*

O teor de flavonoides totais nos EEP de *F. varia* foi determinado por método espectrofotométrico, conforme descrito por Assimós (2014), com adaptações. Para a análise, empregaram-se duas soluções preparadas em etanol absoluto (100%): cloreto de alumínio (AlCl_3) a 0,63 M e acetato de potássio (CH_3COOK) a 50 mM.

A curva de calibração foi construída com padrões de quercetina nas concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 $\mu\text{g/mL}$, diluídos em água destilada, resultando na equação da reta $y = 141,65x - 13,953$ ($R^2 = 0,9983$).

O experimento foi conduzido em microplacas de 96 poços, utilizando duas séries reacionais. Na série 1 (reação com AlCl_3), foram adicionados 50 μL da amostra (EEP), do padrão ou do branco, seguidos de 100 μL da solução de acetato de potássio (50 mM) e 100 μL da solução de cloreto de alumínio (0,63 M). Na série 2 (controle), adicionaram-se 50 μL da amostra ou padrão, 100 μL de etanol absoluto e 100 μL da solução de acetato de potássio. O branco foi composto por 50 μL do solvente da amostra, 100 μL de etanol a 80% e 100 μL de acetato de potássio a 50 mM.

As microplacas foram mantidas protegidas da luz por 40 minutos, e a absorbância foi mensurada a 415 nm em leitor de microplacas (*Epoch, BioTek Instruments, Inc.*). A absorbância final foi obtida pela diferença entre as leituras da série 1 (com AlCl_3) e da série 2 (controle). As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato de própolis (mg EQ/g).

Foram avaliadas diferentes concentrações dos extratos (100, 95 e 90 mg/mL), preparadas a partir de uma solução-mãe de 100 mg/mL em etanol absoluto, com o objetivo de determinar a faixa linear adequada para comparação com a curva padrão. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

3.3.3 Caracterização dos compostos bioativos presentes nos extratos etanólicos de própolis de *Frieseomelitta varia*

3.3.3.1 Preparo da amostra

Uma alíquota de 100 μL da solução da amostra A1, na concentração de 10 mg/mL, foi submetida a uma etapa de *cleanup* antes da injeção. Primeiramente,

realizou-se uma partição com o mesmo volume de hexano para remoção de compostos apolares. Em seguida, o extrato foi aplicado em cartucho pré-condicionado SPE C18 e eluído com 1 mL de metanol 100% grau cromatográfico. A amostra A1 foi priorizada por apresentar o melhor desempenho no ensaio antioxidante ORAC, método considerado relevante para a avaliação de sistemas biológicos.

3.3.3.2 Análise dos compostos químicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS/MS)

As análises foram realizadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance (UHPLC) acoplado a um Espectrômetro de Massas do tipo Quadrupolo-Tempo de Voo (QTOF). As condições cromatográficas foram estabelecidas em um sistema UHPLC da linha *Nexera* (LC-40D XR, Shimadzu, Tóquio, Japão), acoplado a uma coluna *Kinetex* C18 (50 × 2,1 mm; 2,6 µm; 100 Å), responsável pela separação dos compostos presentes nos extratos da amostra A1.

A temperatura do forno foi ajustada para 35 °C, e o volume de injeção foi de 5 µL. A fase móvel, com fluxo de 0,2 mL/min, foi composta por (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição aplicado foi: 0–5 min, 30–40% B; 5–10 min, aumento até 95% B; 10–12 min, 95% B; 12–18 min, retorno a 30% B; 20 min, fim da corrida.

Os compostos eluídos foram detectados utilizando o software *LabSolutions Insight Explore* (Shimadzu, Tóquio, Japão). O espectrômetro de massas (MS) operou na interface ESI, nos modos ESI⁻ e ESI⁺, com voltagem da interface de -3,5 kV, fluxo de gás nebulizador de 3,0 L/min, fluxo de gás aquecedor de 10,0 L/min, fluxo de gás de secagem de 10,0 L/min, temperatura da interface de 300 °C, temperatura da linha de dessolvatação (DL) de 250 °C, temperatura do bloco aquecido de 400 °C, e energia de colisão de 35 V ± 15 V. O espectrômetro operou na faixa de m/z 100–800 em modo negativo, com aquisição MS/MS dependente de dados (DDA) na faixa de m/z 50–500, loop time de 0,2 s, e calibrado utilizando iodeto de sódio (NaI).

A análise dos dados foi realizada utilizando o software *LabSolutions Insight Explore*. Íons precursores ([M-H]⁻), juntamente com padrões de fragmentação MS/MS, foram empregados para a identificação tentativa dos compostos por comparação com

dados da literatura (Saliba *et al.* 2023) e bancos de dados como MassBank e MoNA.

3.4 ANÁLISES DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vitro* DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O potencial antioxidante da própolis de *F. varia* foi determinado pelo método do DPPH, utilizando extratos etanólicos. A metodologia, adaptada de Al-Duais *et al.* (2009), consistiu na pipetagem de 66 µL da amostra (EEP), do controle ou do padrão em microplacas de 96 poços, seguida da adição de 100 µL da solução de DPPH a 150 µM. Para o controle, empregaram-se 66 µL de etanol no lugar da amostra, enquanto o branco foi composto por 200 µL de etanol puro. As microplacas foram mantidas protegidas da luz por 45 minutos para permitir a reação.

A curva padrão foi construída com o reagente Trolox, um análogo sintético da vitamina E, nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µM, resultando na equação da reta $y = -0,0038x + 0,5939$ ($R^2 = 0,9979$). A redução do DPPH foi acompanhada pela mudança de coloração de violeta intenso para amarelo claro, sendo a absorbância medida a 517 nm.

As análises foram realizadas em triplicata, e a atividade antioxidante foi expressa em equivalentes de Trolox por grama de extrato (µMol TEAC/g). Foram avaliadas diferentes concentrações dos EEP (1,0; 2,0; 2,5; e 3,0 mg/mL), preparadas em etanol P.A., para identificar a faixa linear mais adequada para comparação com a curva padrão. As leituras foram feitas em triplicata para cada concentração.

3.4.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante dos EEP de *F. varia* foi avaliada pelo método ABTS⁺, que quantifica a capacidade do antioxidante em reduzir o radical ABTS⁺ a ABTS. A metodologia, adaptada de Al-Duais *et al.* (2009), utilizou os seguintes reagentes: (i) tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 7,4); (ii) solução de ABTS a 7 mM; (iii) solução de persulfato de potássio a 140 mM; e (iv) solução do radical ABTS⁺, obtida pela

incubação, ao abrigo da luz por 16 horas, das soluções (ii) e (iii). Após a incubação, essa solução foi diluída em tampão fosfato até alcançar absorvância de $0,7 \pm 0,02$. Paralelamente, foi preparada uma solução padrão de Trolox a 2,5 mM em tampão fosfato, com concentrações variando de 12,5 a 200 μM ($y = -0,0016x + 0,397$; $R^2 = 0,995$).

O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços, com a adição de 20 μL da amostra (EEP) ou do padrão, seguida de 220 μL da solução ajustada do radical ABTS⁺. A redução do radical, promovida pelos antioxidantes presentes nos extratos, resulta na diminuição da coloração azul-escura da solução. O branco foi constituído por 240 μL de tampão fosfato. As reações foram mantidas protegidas da luz por 6 minutos, e a absorvância foi medida a 730 nm.

As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em equivalentes de Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol TEAC/g}$). Foram testadas diferentes concentrações dos extratos (1:2; 1:4; 1:8; e 1:16 mg/mL), preparadas a partir de solução-mãe de 1 mg/mL em etanol absoluto (100%), com o objetivo de identificar a faixa linear adequada para comparação com a curva padrão. As leituras foram realizadas em triplicata para cada concentração.

3.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) baseia-se na capacidade dos antioxidantes de reduzir o complexo férrico (Fe^{3+} -TPTZ), de coloração amarelo-ferrugem, ao complexo ferroso (Fe^{2+} -TPTZ), que apresenta coloração azul-escura (Al-Duais *et al.* 2009).

O ensaio foi conduzido utilizando: tampão acetato de potássio 0,3 M (pH 3,6), solução de HCl 40 mM, solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM preparada em HCl 40 mM e solução de cloreto férrico hexaidratado 20 mM em água destilada. Esses reagentes foram combinados para formar a solução FRAP (tampão + TPTZ + cloreto férrico). A curva padrão foi elaborada com sulfato ferroso 2,5 mM nas concentrações de 100, 250, 400, 550 e 700 μM , diluídas em água destilada ($y = 0,0014x - 0,018$; $R^2 = 0,9991$).

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 20 μL da amostra (EEP), do

padrão ou do branco, 30 µL de água destilada e 200 µL do reagente FRAP. O branco consistiu em 50 µL de água e 200 µL da solução FRAP. As placas foram incubadas a 37 °C por 8 minutos, e a absorbância foi registrada a 595 nm.

As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em equivalentes de sulfato ferroso (µmol FeSO₄/g). Foram testadas diferentes concentrações do extrato (2,0; 3,0; e 4,0 mg/mL) para determinar a faixa linear adequada para comparação com a curva padrão. As leituras foram obtidas em triplicata para cada concentração.

3.4.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ORAC

Este ensaio foi conduzido em parceria com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP).

Para a realização do ensaio ORAC (Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigênio), conforme metodologia descrita por Melo et al. (2025), foram preparados os seguintes reagentes: tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4; solução de fluoresceína a 508,25 nM preparada no mesmo tampão; solução de AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride) a 76 mM; e solução padrão de Trolox a 1 mM.

A montagem da reação foi realizada em microplacas de 96 poços, com adição sequencial de 30 µL da amostra (extrato) ou da solução padrão, seguida por 60 µL da solução de fluoresceína e, por fim, 110 µL da solução de AAPH. Após a adição dos reagentes, a placa foi homogeneizada por agitação e colocada em leitor de microplacas, programado no modo cinético para realizar leituras a cada 10 minutos durante 2 horas, sob temperatura constante de 37 °C, utilizando comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 528 nm.

As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox por miligrama de amostra (µmol TEAC/mg).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

3.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), foram seguidos os protocolos M07-A11 para bactérias (CLSI, 2018, com modificações) e M27 para leveduras (CLSI, 2017, com modificações), conforme as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), por meio de um ensaio de microdiluição em caldo. Foram utilizados diversos microrganismos, incluindo cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UNIFAL-MG.

Os experimentos foram conduzidos com os seguintes microrganismos:

Bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria innocua* (CLIST 2050), *Listeria monocytogenes* (CLIST 2035), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 902).

Leveduras: *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Candida krusei* (ATCC 6458).

A concentração inibitória mínima (CIM) dos quatro extratos foi testada nas seguintes concentrações: 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL.

As cepas foram reativadas a partir de culturas de estoque em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 horas para bactérias e 48 horas para leveduras, a 35°C. Em seguida, as suspensões foram preparadas em solução salina estéril (0,9% de NaCl), e a turbidez foi ajustada com base na escala de McFarland, medindo-se a absorbância em espectrofotômetro a 660 nm, padronizando as soluções a uma transmitância de 75%, o que corresponde a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Antes da inoculação, as suspensões foram diluídas novamente para atingir uma concentração de aproximadamente $1-2 \times 10^5$ UFC/mL.

Os testes foram realizados em triplicata, utilizando microplacas de 96 poços. Inicialmente, 180 µL de meio de cultura (*Caldo Mueller-Hinton* para bactérias e RPMI 1640 para leveduras) foram adicionados à linha A, onde se iniciaram as diluições seriadas, e 100 µL foram adicionados nas linhas B a G. Em seguida, 20 µL do extrato diluído em etanol 100% foram adicionados à linha A. As diluições seriadas foram

realizadas transferindo-se 80 μL de meio de cultura para cada poço subsequente, totalizando 180 μL por poço. Por fim, 20 μL da suspensão de patógenos foram adicionados aos poços de A a G.

Foram utilizados controles para validar os testes: controle de esterilidade do meio de cultura (200 μL de meio de cultura), controle de viabilidade de crescimento do microrganismo (180 μL de meio e 20 μL de suspensão do microrganismo), controle positivo (160 μL de meio, 20 μL de antibacteriano ou antifúngico e 20 μL do microrganismo - amoxicilina para Gram-positivas, cloranfenicol para Gram-negativas e fluconazol para leveduras) e controle negativo (160 μL de meio, 20 μL de álcool e 20 μL do microrganismo, para demonstrar que não há interferência do etanol P.A. no crescimento microbiano).

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após esse período, adicionaram-se 20 μL de resazurina a cada poço para leitura visual colorimétrica. No caso das leveduras, a resazurina foi aplicada 24 horas antes da leitura, seguida de nova incubação. A coloração rosa indicou crescimento microbiano, enquanto a coloração azul indicou ausência de crescimento.

A CIM foi definida como a menor concentração dos extratos capaz de inibir o crescimento microbiano.

3.5.2 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)

A determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) foi realizada com base nos resultados obtidos no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para isso, foram selecionadas as suspensões provenientes dos poços da microplaca onde não houve crescimento microbiano. Em seguida, 10 μL de cada suspensão foram transferidos para placas contendo ágar Mueller-Hinton (para bactérias) ou ágar Sabouraud (para fungos), em triplicata, e incubadas a 35°C por 24 horas.

A CMM foi definida como a menor concentração da amostra testada capaz de causar a morte do microrganismo, ou seja, aquela em que não foi observado crescimento visível na superfície do ágar após o período de incubação.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vivo* EM MODELO DE *Galleria mellonella* DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

3.6.1 Avaliação da toxicidade *in vivo* dos extratos etanólicos de própolis de *Frieseomelitta varia*

Os efeitos da toxicidade aguda dos EEP de *F. varia* foram avaliados *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella*, seguindo o protocolo descrito por Sardi *et al.* (2017), com algumas modificações. As larvas utilizadas foram produzidas no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

O experimento foi conduzido em triplicata, empregando larvas com massa entre 0,25 g e 0,30 g, que não apresentavam sinais de melanização, faixa de peso recomendada na literatura por garantir maior uniformidade fisiológica e reduzir variações experimentais. Para cada ensaio, foram formados seis grupos, com 10 larvas cada, totalizando 180 indivíduos (N = 180). Cada larva foi inoculada com 10 µL do extrato, previamente solubilizado em etanol a 40%, ou das soluções controle (água destilada e etanol a 40%, considerando que concentrações superiores a 50% são letais para o modelo), por meio da última pseudopata esquerda, conforme metodologia descrita por Wijesinghe *et al.* (2020). Para a inoculação, utilizou-se uma seringa de insulina de 1 mL.

A concentração das amostras para ensaios *in vivo* é expressa em forma de dose, pois o peso do animal deve ser considerado na interpretação dos resultados. O cálculo utilizado para determinação do volume inoculado segue a equação:

$$\text{Volume} = \frac{\text{Dose} \times \text{peso animal}}{\text{Concentração do fármaco}}$$

Nos ensaios, utilizou-se uma concentração fixa de EEP de 40 mg/mL, administrando-se um volume constante de 10 µL (0,01 mL) por larva. Essa combinação resulta na aplicação de 0,4 mg de extrato por indivíduo, valor que corresponde à dose absoluta, ou seja, a quantidade real de substância efetivamente

injetada em cada larva.

Quando normalizada pelo peso corporal, essa mesma quantidade resulta em uma dose relativa que variou entre 1333 e 1600 mg/kg, a depender da massa individual (0,25–0,30 g). A dose selecionada (0,4 mg/larva; aproximadamente 1600 mg/kg) foi escolhida porque a concentração de 40 mg/mL, previamente, demonstrou atividade antimicrobiana contra *B. cereus* nos ensaios *in vitro*.

A toxicidade foi avaliada com base na taxa de sobrevivência e no Índice de Saúde das larvas, conforme a metodologia proposta por Loh et al. (2013), com adaptações (Tabela 1). Após a inoculação, as larvas foram incubadas a 28°C, e registros de sobrevivência, atividade locomotora, formação de casulo e sinais de melanização foram realizados aos 24, 48 e 72 horas.

Tabela 1 – Sistema de pontuação para avaliação das larvas de *Galleria mellonella*.

Categoria	Descrição	Pontuação
Atividade	Sem atividade	0
	Baixa atividade com estímulo	1
	Atividade com estímulo	2
	Atividade sem estímulo	3
Casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo completo	1
Melanização	Completa melanização (preta)	0
	Mais de 3 pontos pretos	2
	Menos de 3 pontos pretos	3
Sobrevivência	Sem melanização	4
	Morta	0
	Viva	2

Fonte: Loh *et al.* (2013, p. 09).

3.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* dos extratos etanólicos de própolis de *Frieseomelitta varia*

Os efeitos da atividade antimicrobiana do EPP de *F. varia in vivo* foram avaliados no modelo larval de *G. mellonella*, com base nos resultados obtidos *in vitro* na determinação da CIM. Como os EEP de *F. varia* apresentaram atividade inibitória frente ao crescimento de *B. cereus*, o teste *in vivo* foi conduzido especificamente para esse microrganismo. As larvas utilizadas foram produzidas no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

A atividade antimicrobiana *in vivo* foi testada contra a infecção por *B. cereus* (ATCC 11778), seguindo a metodologia proposta por Loh *et al.* (2013), com adaptações. A cepa foi reativada a partir de culturas estoque em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24 h a 35 °C e, posteriormente, suspensa em solução estéril de

NaCl 0,9%. A turbidez da suspensão foi ajustada conforme a escala de McFarland. Inicialmente, determinou-se a Dose Letal 50 (DL50) para identificar a transmitância capaz de causar a morte de 50% das larvas (90% de transmitância) e a concentração em que todos os indivíduos sobrevivem (95%). Para os testes, utilizou-se uma transmitância de 85% ($9,8 \times 10^4$ UFC/mL), mais concentrada que a DL50, de modo que todas as larvas infectadas morreriam sem tratamento. Essa escolha permite avaliar claramente o efeito protetor dos EEP de *F. varia*, já que qualquer sobrevivência observada indica atividade antimicrobiana *in vivo*.

O experimento foi realizado em duplicata, formando seis grupos de 15 larvas, totalizando 180 indivíduos. Foram selecionadas larvas sem melanização e com peso entre 0,25 g e 0,3 g. Cada larva recebeu 10 μ L da suspensão do patógeno, inoculada através da última proleg. Após uma hora, 10 μ L das amostras, previamente solubilizadas em etanol 40%, foram administrados no mesmo local. Utilizou-se a concentração de 40 mg/mL dos EEP de *F. varia*, previamente demonstrada como eficaz contra *B. cereus in vitro* e não tóxica nos testes *in vivo*. Também foram incluídos controles com água destilada estéril e controle de viabilidade do patógeno.

As larvas foram monitoradas a cada 2 horas após a inoculação por um período de 12 horas (2, 4, 6, 8, 10 e 12 h pós-infecção) e, posteriormente, novamente após 24 h. A avaliação da atividade antimicrobiana seguiu o sistema de pontuação descrito por Loh *et al.* (2013), apresentado anteriormente na Tabela 1. Foram analisados quatro parâmetros: atividade, produção de cera (formação de casulo), melanização e sobrevivência. Apenas as larvas que não apresentaram movimento ao toque foram consideradas mortas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata, com exceção do ensaio de toxicidade *in vivo*, que foi realizado em duplicata. Os resultados das análises de compostos fenólicos, bem como das atividades antioxidante e anti-inflamatória, foram apresentados como média \pm desvio padrão. A avaliação estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* Sisvar, aplicando-se a análise de variância (ANOVA). Para a comparação entre médias, utilizou-se o teste de *Tukey*, considerando um nível

de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados os resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados com os EEP de *F. varia*, incluindo a determinação da composição química, a atividade antioxidante, os testes de atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, e demais análises complementares realizadas no estudo.

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE

Frieseomelitta varia

A própolis bruta não pode ser utilizada diretamente como matéria-prima, sendo necessária sua purificação. Esse processo visa remover o material ceroso e preservar a fração de polifenóis, considerados os principais responsáveis pelos efeitos biológicos e terapêuticos da própolis. A extração por etanol é a técnica mais empregada para a produção de extratos de própolis, uma vez que seus constituintes bioativos apresentam maior solubilidade nesse solvente (Andrade *et al.* 2017). Entre os métodos antioxidantes descritos na literatura, o extrato etanólico é o mais frequentemente utilizado (Alam; Bristi; Rafiquzzaman, 2013).

Segundo Lustosa *et al.* (2008), os extratos etanólicos de própolis (EEP) são os mais comuns e tradicionalmente obtidos por maceração em álcool para produção de tinturas. A extração constitui uma etapa fundamental para o aproveitamento dos compostos bioativos da própolis (Bankova, Trusheva e Popova, 2021), pois dissolve os compostos vegetais de interesse e elimina a cera, que pode representar até 20% da composição da própolis.

Devido à origem da própolis em resinas vegetais, sua solubilidade em água é muito baixa. Assim, todos os tipos de própolis apresentam afinidade por solventes orgânicos relativamente apolares, independentemente da composição química específica (Bankova, Trusheva e Popova, 2021).

O cálculo do rendimento do extrato é importante para avaliar a eficiência da extração para cada tipo de amostra. Na maioria dos estudos encontrados na literatura,

a extração de produtos naturais de abelhas é realizada com etanol em diferentes diluições. Neste trabalho, utilizou-se etanol P.A. absoluto para todas as amostras, devido ao seu elevado grau de pureza.

Para a realização do cálculo de rendimento, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do extrato seco}}{\text{massa inicial da própolis}} \times 100$$

Tabela 2 – Rendimento dos extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomellita varia*.

Amostra	Peso inicial da própolis bruta (g)	Peso final do extrato etanólico (g)	Rendimento (%)
A1	54,896	5,36	9,76
A2	12,465	10,09	80,95
A3	3,31	1,98	59,82
A4	65,556	47,95	73,14

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

A análise do rendimento dos EEP de *F. varia* revelou variações significativas entre as amostras. A amostra A2 apresentou o maior rendimento, alcançando 80,95%, evidenciando uma extração extremamente eficiente em relação às demais. A amostra A4 também apresentou rendimento elevado, de 73,14%, seguida da amostra A3, com 59,82%. Por outro lado, a amostra A1 apresentou o menor rendimento, de apenas 9,76%.

Comparando com dados da literatura, Dos Santos *et al.* (2017) relataram rendimentos significativamente menores para extratos de *M. quadrifasciata* (6,2% em extrato aquoso e 24,4% em hidroalcoólico) e de *T. angustula* (2,1% em aquoso e 5,0% em hidroalcoólico), enquanto Cochut (2024) observou rendimentos entre 0,72% e 2,52% para a geoprópolis de *M. capixaba*. Esses valores reforçam que a amostra A2, assim como A4 e A3, apresentou desempenho acima do observado em outras espécies, destacando-se.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

Os resultados das análises de quantificação do teor de compostos fenólicos totais (TPC), apresentados na Tabela 3, indicam que os EEP de *F. varia* não apresentaram diferenças significativas em suas composições.

Tabela 3 – Quantificação do teor de compostos fenólicos totais em extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia*.

Amostras	Fenólicos Totais (mg EAG/g de EEP ± desvio padrão) *
A1	23,52 ± 2,01 ^a
A2	25,10 ± 0,54 ^a
A3	21,57 ± 2,28 ^a
A4	25,65 ± 1,21 ^a

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: mg EAG/g (equivalentes de ácido gálico por grama de EEP).

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Parte da análise química da própolis consiste na determinação quantitativa, por espectrofotometria, de grupos de compostos fenólicos, incluindo flavonoides totais e fenólicos totais (Bankova *et al.* 2019).

Embora as amostras de própolis tenham sido coletadas em diferentes localidades (A1, A2, A3 \neq A4), as quantidades de fenólicos totais apresentaram-se semelhantes. Fatores como localização geográfica, tipo de vegetação e período do ano podem influenciar a composição desses compostos (Gerginova *et al.* 2023); contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras analisadas.

Os compostos fenólicos são amplamente reconhecidos por sua atividade antioxidante, e sua concentração está diretamente relacionada ao potencial antioxidante do extrato (Cabral *et al.* 2009). A comparação desses valores com os da literatura é desafiadora, sobretudo devido à escassez de estudos sobre a própolis de

F. varia. No Brasil, a própolis verde é considerada de alta qualidade quando apresenta teores mínimos de 50 mg/g (ou 5%) de compostos fenólicos (Sawaya; Cunha; Marcucci, 2011). Dessa forma, as concentrações de fenólicos totais nos EEP de *F. varia* podem ser classificadas como variando de baixa a moderada.

Em estudo de Machado *et al.* (2016), oito amostras de própolis de *A. mellifera* (verde, marrom e vermelha), derivadas de diferentes regiões geográficas do Brasil, apresentaram TPC entre $97,97 \pm 0,01$ e $300,36 \pm 0,01$ mg EAG/g, valores significativamente superiores aos encontrados no presente estudo. A própolis de *A. mellifera*, especialmente a verde, é amplamente reconhecida no Brasil por sua elevada concentração de compostos bioativos (Vieira *et al.* 2023).

Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo foram superiores aos relatados por Hipólito (2013), que analisou própolis de *F. varia* coletada em Alfenas, MG, com concentrações de fenólicos totais entre $15,50 \pm 0,89$ mg/g e $18,37 \pm 0,35$ mg/g em extrato seco. No presente estudo, as amostras apresentaram concentrações entre $21,57 \pm 2,28$ mg/g e $25,65 \pm 1,21$ mg/g. Essa diferença para uma mesma espécie de ASF pode ser atribuída a variações nas condições ambientais, origem geográfica e espécies vegetais disponíveis para as abelhas, fatores que influenciam diretamente a composição da própolis (Sawaya, 2009).

Os valores observados são comparáveis aos de outras espécies de abelhas sem ferrão. Rocha *et al.* (2024) relataram que, *P. droryana* apresentou teor máximo de $51,90 \pm 2,47$ mg/g, enquanto *F. doederleini* atingiu $56,22 \pm 0,85$ mg/g em amostras de própolis da Bahia. Nunes (2018) identificou 35,55 mg/g de compostos fenólicos na própolis de *F. doederleini* coletadas no Rio Grande do Norte, e *M. quadrifasciata* apresentou valor mais elevado, de $82,05 \pm 2,33$ mg/g (Rocha *et al.* 2024). Em contrapartida, o EEP de *S. postica*, coletado no Pará, apresentou valor inferior, de $21,29 \pm 0,003$ mg/g (Ferreira *et al.* 2024).

Teixeira (2024) identificaram um TPC de 3,3 mg/g para *S. aff. depilis* e 2,1 mg/g para *F. varia*. Vale destacar que esses autores utilizaram o método de Folin-Denis, o que pode explicar parte das diferenças em relação aos resultados obtidos neste estudo.

Torres *et al.* (2018) encontraram $3,87 \pm 0,32$ mg/g e $1,26 \pm 0,17$ mg/g para *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *T. angustula*, coletadas no Ceará, respectivamente.

Dos Santos *et al.* (2017) observaram que, extratos aquosos e hidroalcoólicos de própolis de *M. quadrifasciata*, coletadas em Santa Catarina, apresentaram $189,5 \pm 3,9$ mg/g e $82,4 \pm 3,8$ mg/g, respectivamente, valores superiores aos dos EEP de *F. varia*. Para *T. angustula*, também de Santa Catarina, os extratos aquoso e hidroalcoólico apresentaram $42,0 \pm 1,8$ mg/g e $34,9 \pm 1,1$ mg/g, respectivamente. Esses dados evidenciam que o tipo de extrato (aquoso, hidroalcoólico ou etanólico) influencia significativamente a concentração de compostos fenólicos, além das diferenças relacionadas à espécie e às condições ambientais.

Andrade *et al.* (2017) identificaram teores de $90,55 \pm 1,52$, $91,32 \pm 0,49$ e $55,74 \pm 0,48$ mg/g em própolis verde, vermelha e marrom de *A. mellifera*, oriundas do nordeste brasileiro, respectivamente. O estudo também indicou que os flavonoides não foram responsáveis pela atividade antioxidante, sugerindo que esta está associada a outros compostos fenólicos. Cabral *et al.* (2012) mostraram correlações positivas entre compostos fenólicos e atividade antioxidante, e entre flavonoides e atividade antioxidante, evidenciando que, embora importantes, a concentração de fenólicos e flavonoides não reflete completamente todas as atividades biológicas dos extratos de própolis.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

Os resultados da quantificação do teor de flavonoides totais (TFC) nos extratos etanólicos de própolis (EEP) de *F. varia* demonstraram que a amostra A2 apresentou um conteúdo de $0,1314 \pm 0,069$ mg EQ/g de EEP.

Ressalta-se que, para que a leitura da absorbância se mantivesse dentro da faixa linear da curva padrão, foi necessária uma elevada concentração da amostra (100 mg de EEP/mL de etanol). Em razão disso, e considerando o baixo teor de flavonoides totais identificado, não foi possível realizar as análises nas demais amostras, devido à quantidade limitada de extrato disponível. Como os flavonoides correspondem apenas a uma fração dos compostos fenólicos presentes na própolis, é esperado que seus valores sejam relativamente baixos.

O valor obtido no presente estudo foi inferior aos relatados por Hipólito (2023),

que encontrou teores de flavonoides totais variando entre $3,24 \pm 0,32$ e $8,98 \pm 1,04$ mg/g em amostras da mesma espécie coletadas em Alfenas.

Nos estudos de Torres *et al.* (2018), os valores de TFC foram de $0,14 \pm 0,03$ mg/g para *M. quadrifasciata quadrifasciata* e $0,15 \pm 0,02$ mg/g para *T. angustula*, coletadas no Ceará.

Andrade *et al.* (2017) relataram TFC de $59,45 \pm 0,82$, $31,48 \pm 0,56$ e $30,89 \pm 0,20$ mg/g para as própolis verde, vermelha e marrom produzidas por *A. mellifera*, originárias da região Nordeste.

Por sua vez, Dos Santos *et al.* (2017) identificaram TFC de $0,74 \pm 0,11$ e $0,79 \pm 0,04$ mg/g para os extratos aquoso e hidroalcoólico de própolis de *M. quadrifasciata*, e de $0,93 \pm 0,06$ e $0,82 \pm 0,03$ mg EQ/g para os extratos aquoso e hidroalcoólico de própolis de *T. angustula*, coletadas em Santa Catarina.

4.4 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

O processo de identificação dos compostos que constituem a própolis de *F. varia* ainda se encontra em andamento. Nesse contexto, até o momento, a análise foi realizada apenas para a amostra A1, não tendo sido possível concluir a identificação dos constituintes com a acurácia necessária. A identificação tentativa dos compostos químicos tem sido conduzida com base na massa exata e no padrão de fragmentação (MS/MS). Os espectros de massas obtidos estão sendo comparados com bancos de dados e com informações da literatura especializada, conforme descrito no item 3.3.3. Ainda assim, já foi possível presumir a presença de diferentes terpenoides, com destaque para triterpenoides, bem como sugerir a identificação de alguns compostos, os quais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Compostos preliminarmente identificados no extrato etanólico de própolis (EEP) A1 de *Frieseomelitta varia*.

	Composto	Rt (min)	m/z do precursor [M-H] ⁻	Erro (ppm)	Área
1	Ácido corosólico	12,10	471,3484	2,11	1.335.906
2	Ácido desidroabiético	11,00	299,2017	2,00	867.326
3	Ácido Betulinico	13,72	455,3534	1,97	680.701
4	Hecogenina	14,153	429,3011	1,39	309.371
5	Ácido Glicirretínico	11,717	469,3325	1,49	148.913

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Nota: A identificação dos compostos foi realizada de forma preliminar e tentativa, com base na massa exata do íon precursor (m/z), no erro de massa expresso em partes por milhão (ppm) e no tempo de retenção (Rt).

A caracterização química indica que o EEP A1 de *F. varia* é dominado por terpenoides, com a possível presença de ácido corosólico, seguido pelo ácido desidroabiético (DHA) e ácido betulínico como compostos majoritários. Esses compostos pertencem à classe dos metabólitos secundários do tipo terpenoide, um dos três grandes grupos químicos presentes em plantas, ao lado dos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz *et al.* 2017). Os terpenos, também conhecidos como isoprenoides ou terpenoides, são responsáveis pelo perfume, sabor e pigmentação das plantas, além de constituírem o principal componente dos óleos essenciais de origem vegetal. Entre os produtos naturais que proporcionam benefícios médicos aos organismos, os terpenos desempenham papéis importantes e variados (Cox-Georgian *et al.* 2019).

O ácido corosólico, também denominado ácido 2 α -hidroxiursólico, possui fórmula molecular C₃₀H₄₈O₄ e peso molecular de 472,70 g/mol. Trata-se de um triterpenoide pentacíclico prevalente nas folhas de Banaba (*Lagerstroemia speciosa*), conhecido por suas propriedades antidiabéticas (Zhao *et al.* 2020). Estudos anteriores identificaram esse composto em própolis gregas (Kasiotis *et al.* 2017), em própolis de *Tetragonula melanoleuca* coletadas na Tailândia (Sanpa *et al.* 2015) e em amostras de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* no Brasil (Negri *et al.* 2022).

O ácido desidroabiético (DHA) é um diterpenoide tricíclico isolado da resina de

coníferas, com múltiplas atividades biológicas, incluindo propriedades anticâncer, antibacterianas, antivirais, antiúlcera, inseticidas e herbicidas (Hao *et al.* 2022). Também foi reportado em geoprópolis de *M. quadrifasciata*, atuando como larvicida contra larvas de vetores de arbovírus (Feitosa *et al.* 2025). Estudos com própolis marrom coletada no Brasil indicam que o DHA induz mortalidade de 3,3% contra larvas de *Aedes aegypti* (Ribeiro *et al.* 2024).

O ácido betulínico é um triterpenoide pentacíclico do tipo lupano, extraído principalmente da casca de bétulas, com atividades biológicas notáveis, especialmente efeitos anti-HIV-1 e citotoxicidade contra várias linhas celulares tumorais (Hordyjewska *et al.* 2019). Este composto também foi identificado em própolis coletada na Etiópia (Afata; Kedebo, 2022).

Em conjunto, esses resultados indicam que os EEP de *F. varia* apresentam um perfil químico dominado por terpenoides bioativos.

Comparando com outras espécies do mesmo gênero, Patricio *et al.* (2002) identificaram monoterpênos, sete sesquiterpênos e dois diterpênos nas própolis de *F. languida*, *F. silvestrii* e *F. varia*, embora, segundo os autores, a lista de compostos não permita inferir a fonte vegetal da própolis. De forma semelhante, análises de LC-ESI-MS/MS de *F. longipes* revelaram predominância de benzofenonas e benzofenonas polipreniladas, compostos fenólicos bioativos como 7-epi-Nemorosona, xantoquimol, derivados da guttiferona C ou D, gambogenona e aristofenona A (Souza *et al.* 2018). A recorrência desses compostos em todas as três amostras analisadas, sugere que essas benzofenonas polipreniladas constituem um componente central das própolis produzidas por espécies do gênero *Frieseomelitta*.

Ainda segundo Souza *et al.* (2018), análises da fração volátil da própolis de *F. longipes* e *A. mellifera*, correspondente aos óleos essenciais, que incluem mono- e sesquiterpênos, além de alcanos e diversos compostos aromáticos, demonstraram teores de até 0,78% de óleo essencial em *Frieseomelitta*, em contraste com apenas 0,12% em *A. mellifera*. Nesse sentido, o EEP de *F. varia* apresenta perfil dominado por terpenoides, com baixos teores de compostos fenólicos (TPC/TFC), em concordância com o observado para outras espécies do gênero.

Conseqüentemente, a prevalência de terpenoides em detrimento de compostos fenólicos pode ser a explicação mais plausível para os resultados obtidos

posteriormente na avaliação da atividade antioxidante do EEP de *F. varia*. Embora o potencial antioxidante da própolis seja geralmente associado à presença de compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e flavonoides, reconhecidos como importantes antioxidantes naturais (Kurek-Górecka *et al.* 2013), no caso do EEP de *F. varia*, os terpenoides constituem a classe majoritária. Esses metabolitos apresentam outras atividades biológicas relevantes, conforme descrito anteriormente, o que pode justificar o desempenho antioxidante mais discreto observado para estes extratos.

Estudos com *F. varia* coletadas em Alfenas - MG também indicam predominância de terpenoides (diterpenos e triterpenos possivelmente glicosilados), sem detecção significativa de flavonoides, reforçando que a própolis de abelhas sem ferrão compartilha classes de compostos predominantes (Hipólito, 2013). Além disso, Campos *et al.* (2011) identificaram o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepelin C), atribuindo posteriormente a esse composto a atividade antimicrobiana observada na própolis de *F. varia* de Minas Gerais.

De forma mais ampla, a composição química da própolis de abelhas sem ferrão é altamente variável, influenciada pela espécie de abelha, colônia, condições ambientais e, principalmente, pela fonte vegetal utilizada. As plantas fornecem resinas e óleos contendo ácidos graxos, parafinas, ésteres, aminoácidos, carotenoides, fenólicos, isoprenoides, glicosídeos e saponinas. Algumas espécies vegetais importantes para essas abelhas incluem representantes das famílias Melastomataceae (*Mouriri*), Gesneriaceae (*Drymonia*) e Malpighiaceae (*Stigmaphyllon*) (Sanchez; Pereira; Serrão, 2017).

Exemplos de variabilidade química incluem a própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata*, que contém ácido gálico, vanilina, ácido *p*-cumárico e quercetina, enquanto *T. angustula* apresentou apenas ácido gálico detectado por HPLC-DAD (Torres *et al.* 2018). Essa diversidade reflete a preferência das abelhas por diferentes plantas e a variabilidade genética entre espécies, resultando em distintas atividades biológicas.

A análise de compostos fenólicos é complexa devido à diversidade e reatividade desses compostos, mas técnicas modernas como HPLC acoplado à espectrometria de massa permitem sua detecção e caracterização (Mohdaly *et al.*

2015). Dos Santos *et al.* (2017) demonstraram que, extratos aquosos de *M. quadrifasciata* contêm fenóis, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas e catequinas, enquanto extratos hidroalcoólicos também apresentaram saponinas, triterpenos e esteroides. De modo semelhante, extratos de *T. angustula* apresentaram fenóis, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e triterpenos, com catequinas detectadas nos extratos hidroalcoólicos, destacando que o tipo de solvente utilizado na extração influencia diretamente os compostos isolados, de modo que diferentes solventes podem extrair seletivamente terpenoides, fenólicos ou flavonoides, mesmo quando se trata de uma mesma própolis.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

Neste estudo, a atividade antioxidante da própolis coletada de diferentes fontes foi avaliada por meio de dois ensaios de sequestro de radicais livres (DPPH e ABTS) amplamente descritos na literatura (Popova, Trusheva e Bankova, 2021), além de um ensaio de poder redutor (FRAP) e um ensaio de capacidade de absorção de oxigênio (ORAC).

Até o momento, não há registros sobre a atividade antioxidante da própolis de *F. varia*. Por esse motivo, os resultados obtidos foram comparados, sempre que possível, com estudos prévios envolvendo outras espécies do gênero *Frieseomelitta spp.*, pesquisas conduzidas pelo grupo do professor Masaharu Ikegaki ou estudos com outras espécies de abelhas sem ferrão.

No Brasil, as própolis verde e vermelha são as mais estudadas (Andrade *et al.* 2017); portanto, dados sobre o potencial antioxidante dessas própolis, bem como da própolis marrom, também foram incluídos para fins de comparação.

A atividade antioxidante dos EEP de *F. varia* foi investigada por diferentes ensaios *in vitro*, avaliando tanto sua ação sobre radicais livres específicos quanto seu potencial redutor. Estes métodos representam as abordagens mais comuns para a determinação do potencial antioxidante em diversos compostos. É importante destacar que a capacidade antioxidante das amostras biológicas pode variar conforme o tipo de radical livre ou agente oxidante utilizado no ensaio.

Al-Duais *et al.* (2009) enfatizam que esses ensaios fornecem uma gama ampla de resultados, mas nunca devem ser interpretados isoladamente, devendo ser analisados com cautela. Uma abordagem multifacetada, envolvendo diversos ensaios, é essencial para compreender de forma abrangente o desempenho antioxidante de uma substância (Jeong *et al.* 2024).

Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013) reforçam que a atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único modelo de teste, sendo prática comum a realização de múltiplos ensaios *in vitro* para uma avaliação mais completa das amostras de interesse.

4.5.1 Potencial antioxidante pela eliminação de radicais livres do DPPH

A seguir (Tabela 5), estão os resultados das análises do potencial antioxidante, medido pelo método DPPH, nos EEP produzidos por *F. varia*.

Tabela 5 – Atividade antioxidante (DPPH) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia*.

Amostras	DPPH ($\mu\text{mol TEAC/g}$ de EEP \pm desvio padrão) *
A1	24,79 \pm 0,19 ^b
A2	30,72 \pm 0,74 ^d
A3	26,44 \pm 0,31 ^c
A4	21,92 \pm 0,11 ^a

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: $\mu\text{mol TEAC/g}$ (capacidade antioxidante equivalente de Trolox por grama de EEP).

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

O ensaio DPPH avalia a capacidade de um extrato em neutralizar radicais livres. Os resultados indicaram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, com valores de potencial antioxidante variando de 21,92 \pm 0,11 a 30,72 \pm 0,74 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de EEP (Tabela 5). A amostra A2 apresentou o maior potencial, com 30,72 \pm 0,74 $\mu\text{mol TEAC/g}$, evidenciando sua maior eficiência na neutralização dos radicais DPPH.

Comparativamente, os valores obtidos foram semelhantes aos relatados por Hipólito (2013) para própolis de *F. varia* coletadas em Alfenas, MG, que variaram entre $23,11 \pm 0,63$ e $37,84 \pm 4,22$ $\mu\text{mol TEAC/g}$.

Estudos em outras espécies de abelhas também apontam variações significativas no potencial antioxidante. Souza *et al.* (2018), utilizando a metodologia IC50 (que indica a concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres, sendo que um menor IC50 reflete maior eficiência antioxidante), determinaram valores de $8,47 \pm 0,00040$ a $8,81 \pm 0,00002$ $\mu\text{g/mL}$ para EEP de *F. longipes* de Belém, e $3,74 \pm 0,00020$ $\mu\text{g/mL}$ para *A. mellifera* (Belém). Nunes (2018) encontrou IC50 de $46,39$ $\mu\text{g/mL}$ para EEP de *F. doederleini* do Rio Grande do Norte, enquanto Santini *et al.* (2024) reportaram IC50 de $29,76 \pm 3,36$ $\mu\text{g/mL}$ para EEP de *M. rufiventris* de Minas Gerais.

Além disso, Torres *et al.* (2018) encontraram IC50 de $241,8$ $\mu\text{g/mL}$ para *M. quadrifasciata quadrifasciata* e $2433,0$ $\mu\text{g/mL}$ para *T. angustula*, ambas do Ceará. Andrade *et al.* (2017) relatou valores de $4554,35 \pm 80,20$, $4663,80 \pm 68,01$ e $4431,00 \pm 45,11$ $\mu\text{mol TEAC/g}$ de própolis verde, vermelha e marrom de *A. mellifera*, respectivamente, da região Nordeste.

Já Cochut (2024) observou valores de $173,89 \pm 40,25$ a $197,695 \pm 26,54$ $\mu\text{mol TEAC/g}$ em geoprópolis de *M. capixaba* do Espírito Santo, e Silva (2023) registrou $54,79 \pm 1,64$ $\mu\text{mol TEAC/g}$ para o extrato etanólico de geoprópolis (EEGP) de *M. quadrifasciata* do Paraná.

Apesar de amplamente utilizado, o método DPPH apresenta limitações, especialmente em função das variações nos protocolos, que dificultam comparações diretas entre estudos, além da baixa solubilidade do radical em meio aquoso, da sensibilidade às condições experimentais, da interferência da cor e da turbidez da amostra e da seletividade de reação e cinética variável para diferentes classes de compostos antioxidantes (Oliveira, 2015). Ainda assim, sua simplicidade, baixo custo e eficácia na avaliação do poder antioxidante por sequestro de radicais ou doação de hidrogênio tornam-no uma ferramenta relevante (Kedare; Singh, 2011).

Os resultados evidenciam a variabilidade do potencial antioxidante entre espécies de abelhas e regiões, reforçando a necessidade de estudos locais, uma vez que fatores ambientais influenciam a composição química dos extratos e,

consequentemente, sua atividade antioxidante (Calegari *et al.* 2017; Kurek-Górecka *et al.* 2022; Karlıdağ, 2025). Além disso, diferenças qualitativas e quantitativas nos compostos fenólicos, especialmente os lipofílicos, como flavonoides metoxilados e derivados prenilados, podem explicar a maior eficiência na neutralização do radical DPPH• (Santos; Silva, 2020).

Outros fatores, como a origem botânica da resina, período de coleta e eficiência da extração etanólica, também impactam o perfil químico e a atividade antioxidante dos extratos (Dawidowicz; Wianowska; Olszowy, 2012; Molole; Gure; Abdissa, 2022). Vale ressaltar que o DPPH avalia principalmente o poder redutor do antioxidante, ou seja, a capacidade de doar elétrons e se oxidar, não detectando compostos com atividade pró-oxidante (Santos; Silva, 2020).

4.5.2 Potencial antioxidante pela eliminação de radicais livres do ABTS

A Tabela 6 abaixo apresenta os valores obtidos nas análises do potencial antioxidante para o sequestro do radical ABTS nos EEP de *F. varia*.

Tabela 6 – Atividade antioxidante (ABTS) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia*.

Amostras	ABTS ($\mu\text{mol TEAC/g}$ de EEP \pm desvio padrão) *
A1	162,02 \pm 5,74 ^a
A2	212,02 \pm 8,19 ^b
A3	237,58 \pm 1,81 ^c
A4	173,00 \pm 4,39 ^a

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: $\mu\text{mol TEAC/g}$ (capacidade antioxidante equivalente de Trolox por grama de EEP).

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

O ensaio ABTS avalia a capacidade antioxidante dos compostos presentes na própolis por meio de um mecanismo predominantemente baseado na transferência de elétrons, no qual ocorre a redução do radical cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Os resultados demonstraram ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, com valores variando entre 162,02 \pm 5,74 e 237,58 \pm 1,81 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de

EEP. Entre elas, a amostra A3 apresentou o maior potencial antioxidante ($237,58 \pm 1,81 \mu\text{mol TEAC/g}$).

Ao comparar os dados obtidos com os de Hipólito (2023), que investigou amostras de *F. varia* coletadas em Alfenas (MG), observa-se que os valores deste estudo se encontram em faixa semelhante, ainda que ligeiramente superiores aos relatados pelo autor ($107,88$ a $166,22 \mu\text{mol TEAC/g}$), sugerindo diferenças moderadas no potencial antioxidante das amostras.

A literatura também evidencia ampla variação nos resultados para atividade antioxidante medida por ABTS. Nunes (2018), por exemplo, encontrou $\text{IC}_{50} = 440,44 \mu\text{g/mL}$ para própolis de *F. doederleini* (RN). Já Cochut (2024) registrou valores entre $119,15 \pm 34,74 \mu\text{mol}$ e $139,61 \pm 23,32 \mu\text{mol}$ em EEGP de *M. capixaba* (ES). Silva (2023), por sua vez, observou capacidade antioxidante significativa no EEGP de *M. quadrifasciata* (PR), embora utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), metodologia distinta da empregada aqui.

Em relação às própolis verde, vermelha e marrom de *A. mellifera* da região Nordeste, Andrade *et al.* (2017) reportaram valores muito superiores, de $2214,96 \pm 20,61$; $2913,55 \pm 95,2$; e $1868,45 \pm 131,39 \mu\text{mol TEAC/g}$, respectivamente.

Segundo Santos e Silva (2020), valores mais elevados obtidos no ensaio ABTS geralmente se relacionam à presença de compostos hidrossolúveis, como os ácidos fenólicos, capazes de transferir elétrons de maneira eficiente em meio aquoso. Assim como nos demais métodos antioxidantes, as diferenças observadas entre amostras refletem a variabilidade da composição química e dos teores de fenólicos e flavonoides, influenciados pelas fontes vegetais exploradas pelas abelhas. Esses autores destacam ainda que o ABTS apresenta maior sensibilidade para compostos polares, justificando valores mais altos quando comparado ao DPPH.

Além disso, a solubilidade do ABTS tanto em meios aquosos quanto orgânicos, e sua não interferência por variações na força iônica, permitem avaliar a atividade de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, ao contrário do DPPH, que só é solúvel em solventes orgânicos (Kuskoski *et al.* 2005).

4.5.3 Potencial antioxidante pelo poder redutor do ferro (FRAP)

A Tabela 7 apresenta os resultados do ensaio FRAP, que avalia o potencial redutor do ferro nos EEP de *F. varia*.

Tabela 7 – Atividade antioxidante (FRAP) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia*.

Amostras	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de EEP \pm desvio padrão) *
A1	52,50 \pm 13,36 ^a
A2	54,65 \pm 4,62 ^a
A3	52,47 \pm 2,42 ^a
A4	54,07 \pm 7,29 ^a

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ (equivalentes de sulfato ferroso por grama de EEP).

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

O ensaio FRAP quantifica a capacidade do extrato em reduzir íons férricos (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), indicando seu potencial antioxidante. Os resultados demonstraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre as amostras, com variação entre $52,47 \pm 2,42$ e $54,65 \pm 4,62$ $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ de EEP.

A literatura sobre o potencial antioxidante da própolis de abelhas do gênero *Frieseomelitta*, especialmente da espécie *F. varia*, ainda é limitada, principalmente em relação aos métodos mais utilizados, como DPPH e ABTS. Além disso, trabalhos que empregam o ensaio FRAP são ainda mais escassos. Hipólito (2013), ao analisar amostras da mesma espécie coletadas em Alfenas (MG), relatou valores entre 62,45 e 81,77 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$, ligeiramente superiores aos observados no presente estudo.

Resultados mais elevados também são descritos para própolis de outras espécies. Cochut (2024), por exemplo, registrou valores de $345,68 \pm 10,99$ a $435,36 \pm 54,96$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ em EEGP de *M. capixaba* (ES). De maneira similar, Silva (2023) verificou $2.467,33 \pm 223,45$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ na geoprópolis de *M. quadrifasciata* (PR). Para as própolis verde, vermelha e marrom de *A. mellifera* da região Nordeste, Andrade *et al.* (2017) relataram valores de $604,20 \pm 20,72$; $633,18 \pm 40,20$; e $471,51 \pm 37,79$ $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$, respectivamente.

O potencial redutor observado está diretamente relacionado à capacidade dos

compostos fenólicos de doar elétrons e promover a conversão de Fe^{3+} para Fe^{2+} . Essa atividade depende do perfil químico dos extratos, especialmente da presença de ácidos fenólicos (como ácido cafeico e ácido *p*-cumárico) e flavonoides com grupos hidroxila livres (Rice-Evans; Miller; Paganga, 1996; Skroza *et al.* 2022). Assim, fatores sazonais e ambientais que influenciam a disponibilidade e a composição das resinas coletadas pelas abelhas podem explicar as diferenças observadas entre estudos (Teixeira *et al.* 2010).

4.5.4 Potencial antioxidante pela capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC)

Os resultados obtidos no ensaio ORAC, que avaliou a capacidade dos extratos etanólicos de própolis de *F. varia* de absorver radicais de oxigênio estão expressos na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 – Atividade antioxidante (ORAC) em extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia*.

Amostras	ORAC ($\mu\text{mol TEAC}/\text{mg}$ de EEP \pm desvio padrão) *
A1	2,276 \pm 0,50 ^c
A2	1,287 \pm 0,65 ^a
A3	1,762 \pm 2,10 ^b
A4	1,535 \pm 1,59 ^{ab}

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: $\mu\text{mol EAC}/\text{mg}$ (capacidade antioxidante equivalente de Trolox por miligrama de EEP).

*Nota: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

A amostra com maior atividade antioxidante no ensaio ORAC foi A1 (2,276 \pm 0,50^c), seguida por A3 (1,762 \pm 2,10^b). A amostra A4 apresentou valor intermediário (1,535 \pm 1,59^{ab}), não diferindo estatisticamente de A2 (1,287 \pm 0,65^a), que registrou o menor potencial antioxidante entre os EEP avaliados.

Ao comparar esses resultados com os de Hipólito (2013), observa-se que aquela autora relatou valores entre 0,18276 e 0,44131 $\mu\text{mol TEAC}/\text{mg}$ para própolis de *F. varia* coletadas em Alfenas (MG), indicando valores inferiores aos observados

neste estudo, o que sugere maior potencial antioxidante nas amostras avaliadas. A autora levantou a hipótese de que a atividade antioxidante avaliada pelo método ORAC poderia ser mais elevada caso essas própolis apresentassem maiores concentrações de compostos fenólicos, especialmente flavonoides. A análise por CCD indicou predominantemente a presença de terpenoides, os quais, segundo a autora, não parecem contribuir de forma expressiva para a atividade antioxidante dessas amostras.

Andrade *et al.* (2017) relataram valores de $6,73487 \pm 0,12456$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$ para própolis verde, $6,66575 \pm 0,05878$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$ para própolis vermelha e $5,34384 \pm 0,11494$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$ para própolis marrom, evidenciando maior atividade antioxidante nessas matrizes. Os autores atribuíram essa diferença à maior diversidade e abundância de compostos fenólicos presentes nesses extratos.

Mais recentemente, Cochut (2024) encontrou valores de $3,432 \pm 0,212$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$ para a amostra PA, $0,295 \pm 0,025$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$ para a amostra FG e $1,202 \pm 0,130$ $\mu\text{mol TEAC/mg}$ para a amostra CAM, do Espírito Santo, demonstrando grande variação química entre amostras provenientes de diferentes fontes botânicas e regiões de coleta.

A diversidade química da própolis de *F. varia* está diretamente relacionada à coleta de resinas de múltiplas espécies vegetais, o que reflete a influência da origem botânica e de fatores ambientais sobre sua bioatividade antioxidante (Teixeira *et al.* 2010). Assim, variações como região de coleta, sazonalidade e método de extração também podem explicar as diferenças observadas entre os resultados deste estudo e aqueles descritos na literatura, uma vez que o tipo de própolis, definido pela planta de origem, determina sua composição química e, conseqüentemente, sua capacidade antioxidante (Vieira *et al.* 2023).

No ensaio ORAC, que avalia a capacidade de absorção de radicais peroxila em meio biológico simulado, a variação entre as amostras reflete não apenas a concentração, mas também possíveis interações sinérgicas entre compostos fenólicos e flavonoides (Muñoz *et al.* 2007). Essa sinergia pode potencializar o efeito antioxidante total dos extratos. Além disso, o método ORAC pode ser aplicado tanto em sistemas hidrofílicos quanto lipofílicos, detectando radicais hidroxila e peroxila formados durante reações de oxidação lipídica e processos baseados em

transferência de átomos de hidrogênio (Santos; Silva, 2020).

Por empregar radicais peroxila, considerados biologicamente relevantes, os resultados obtidos no método ORAC podem ser relacionados à atividade antioxidante em sistemas biológicos reais (Skroza *et al.* 2022).

Com base nos resultados dos diferentes métodos aplicados, evidencia-se que a atividade antioxidante total de uma amostra não pode ser prevista apenas a partir das propriedades individuais dos seus compostos. Em geral, o efeito global resulta da combinação entre os constituintes, que podem atuar de forma sinérgica, aditiva ou antagônica (Skroza *et al.* 2022). Ademais, cada ensaio avalia mecanismos químicos específicos, de modo que os compostos fenólicos podem apresentar respostas distintas dependendo do método empregado.

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia*

A atividade antimicrobiana dos EEP de *F. varia* foi avaliada *in vitro* e a análise está detalhada na Tabela 9. Os resultados indicam que todos os quatro EEP apresentaram atividade antimicrobiana contra a cepa de *Bacillus cereus*, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando entre 500 e 1.000 µg/mL. Nenhuma atividade foi observada contra as demais cepas de microrganismos gram-positivos, gram-negativos e leveduras testadas, mesmo na concentração máxima de 4.000 µg/mL.

Tabela 9 – Atividade inibitória e microbicida *in vitro* dos extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia* contra diferentes microrganismos

Microrganismos e cepas testadas	EEP ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	
	CIM	CMM
Gram positivas		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	500 - 1.000	N.A
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2050	N.A	N.A
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2035	N.A	N.A
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	N.A	N.A
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	N.A	N.A
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	N.A	N.A
Gram negativas		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	N.A	N.A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	N.A	N.A
Leveduras		
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	N.A	N.A
<i>Candida krusei</i> ATCC 6458	N.A	N.A

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Legenda: CIM (Concentração Inibitória Mínima), CMM (Concentração Microbicida Mínima) e N.A (Não ativo nas concentrações testadas).

A diferença na eficácia dos EEP pode ser atribuída à complexidade estrutural e à composição da parede celular de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, o que contribui para uma maior resistência destes últimos à ação de agentes antimicrobianos, conforme destacado por Przybyłek e Karpiński (2019). É possível que, em concentrações mais elevadas, os EEP avaliados apresentem ação inibitória também contra outras bactérias Gram-positivas.

A atividade antimicrobiana observada contra *B. cereus* foi classificada como fraca a moderada, com valores de CIM variando entre 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com Duarte *et al.* (2007), extratos com CIM ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados fortes inibidores; entre 600 e 1.500 $\mu\text{g/mL}$, apresentam atividade moderada; e acima de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, atividade fraca. Por sua vez, Holetz *et al.* (2002) classificam como boa a atividade com CIM < 100 $\mu\text{g/mL}$, moderada entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, fraca entre 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ e inativa para valores superiores a 1.000 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar da inibição bacteriana, não houve efeito microbicida contra *B. cereus*, visto que todos os micropoços apresentaram crescimento bacteriano após repicagem em ágar Mueller-Hinton.

A espécie *B. cereus* é amplamente distribuída em ambientes naturais, especialmente no solo, sendo conhecida por causar intoxicações alimentares associadas ao consumo de alimentos contaminados (Bottone, 2010; Dietrich *et al.* 2021).

A literatura revela variações expressivas na atividade antimicrobiana da própolis de *F. varia*. Hipólito (2013) observou atividade consideravelmente superior à deste estudo, com CIM entre 15,625 e 31,25 µg/mL contra *B. cereus* em extratos secos de própolis coletadas em Alfenas. A autora ainda reportou ação contra *S. aureus* (250–500 µg/mL), não detectada no presente trabalho, além de inibição frente a *S. agalactiae* e *Enterococcus casseliflavus*, não avaliados aqui.

Santini *et al.* (2024), ao investigar EEP de *M. rufiventris*, identificaram atividade potente contra *B. cereus* (50–100 µg/mL) e *S. aureus*, além de atividade moderada frente a outras espécies, como *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *S. mutans* e *C. krusei*, as quais não foram inibidas no presente estudo. E inibição para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, que não foram testados no presente estudo.

Campos *et al.* (2011) relataram em seu estudo que, embora a maioria das própolis de abelhas sem ferrão de Minas Gerais tenha sido inativas no método de difusão em ágar, a própolis de *F. varia* inibiu *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis* e *S. aureus*. A atividade observada foi atribuída à artepilina C, composto fenólico característico da própolis verde brasileira e presente em *A. mellifera*, que apresentou CIM de 62,5 µg/mL contra *B. subtilis* e 250 µg/mL contra *S. aureus*. A autora destaca que variações sazonais e de colmeias podem influenciar a expressão da atividade antimicrobiana.

Esse comportamento sazonal é reforçado pelos achados de Castro *et al.* (2007), que verificaram diferenças significativas nos valores de CIM e CMM da própolis de *A. mellifera* ao longo do ano. A composição química da própolis se modifica conforme a estação, refletindo diretamente em sua atividade antibacteriana. Assim, a própolis de abelhas nativas, como *F. varia*, pode apresentar maior potencial antimicrobiano dependendo da época de coleta e das espécies vegetais exploradas.

Souza *et al.* (2018) investigaram a própolis de *F. longipes* e observaram que *B. cereus* foi o microrganismo mais suscetível ao extrato, com CIM de 7,8 µg/mL. Além disso, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis* também foram sensíveis ao tratamento.

Nunes (2018) analisou a própolis de *F. doederleini* e verificou atividade contra *P. aeruginosa* (CIM de 3,125 µg/mL), *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (CIM de 12,5 µg/mL). De forma complementar, Rocha *et al.* (2023) relataram ação contra *C. albicans* (CIM de 256 µg/mL), *E. coli* e *E. faecalis* (CIM de 1.024 µg/mL) para essa mesma espécie de própolis.

Torres *et al.* (2018) observaram que os EEP de abelhas sem ferrão apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas (*S. aureus*, MRSA isolado clínico, *E. faecali*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*), embora com valores de CIM considerados relativamente alto, entre 2.000 e 7.000 µg/mL, o que caracteriza uma eficácia antimicrobiana baixa a moderada. Os autores destacaram que, apesar da maior resistência das bactérias Gram-negativas, houve inibição de *E. coli* e *K. pneumoniae* com CIMs de 5.000 a 7.000 µg/mL, evidenciando que os EEP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *T. angustula* também apresentam algum potencial contra microrganismos deste grupo.

Assim como observado na atividade antioxidante, as diferenças na ação antimicrobiana da própolis refletem a influência de fatores ambientais e botânicos sobre sua composição química, a qual determina suas propriedades farmacológicas (Albanese *et al.* 2025). O papel dos compostos fenólicos na neutralização de radicais livres e prevenção de danos celulares está bem estabelecido; entretanto, seus mecanismos de ação antimicrobiana ainda não são totalmente compreendidos (Al-Hatamleh *et al.* 2020). Nesse contexto, a atividade antimicrobiana da própolis de abelhas sem ferrão também pode variar amplamente conforme sua composição química.

Gomes *et al.* (2024) observaram que os extratos de própolis de Borá (*Tetragona clavipes*) do Distrito Federal e de mandaçaia (*M. quadrifasciata*) de Santa Catarina apresentaram maior eficácia antimicrobiana do que as própolis verdes de *A. mellifera* avaliadas. Os autores sugerem que níveis reduzidos de compostos fenólicos e atividade antioxidante podem limitar a ação antimicrobiana, como observado para a

própolis de Tubuna (*S. bipunctata*). Além disso, verificaram que extratos alcoólicos foram mais ativos que os aquosos, indicando que o etanol é mais eficiente na extração de compostos bioativos associados à atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem uma possível correlação positiva entre teor de fenólicos, atividade antioxidante e eficácia antimicrobiana.

No entanto, essa relação não é determinística. Estudos demonstram que não apenas a quantidade total de fenólicos, mas principalmente a natureza dos compostos presentes, influencia a bioatividade, já que os metabólitos responsáveis pelas atividades antioxidante e antimicrobiana podem ser distintos (Cabral *et al.* 2012; Nina *et al.* 2015). A atividade global dos extratos depende tanto de sinergias químicas quanto da presença de compostos específicos, com mecanismos distintos avaliados em cada ensaio antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC). Assim, enquanto determinados flavonoides e ácidos fenólicos contribuem majoritariamente para a atividade antioxidante, outros metabólitos podem ser os principais responsáveis pela ação antimicrobiana (Nichitoi *et al.* 2021).

Portanto, a caracterização química detalhada da própolis é essencial, pois a simples determinação de fenólicos totais não permite prever com precisão sua eficácia terapêutica.

Com base nos resultados *in vitro*, foram conduzidos ensaios *in vivo* utilizando o modelo *G. mellonella* para avaliar a eficácia dos EEP de *F. varia* frente a *B. cereus*, o único microrganismo que apresentou sensibilidade ao extrato nas condições experimentais adotadas.

4.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS DE *Frieseomelitta varia* *in vivo* EM MODELO ALTERNATIVO DE *Galleria mellonella*

4.7.1 Avaliação da toxicidade em modelo sistêmico *in vivo* de *Galleria mellonella*

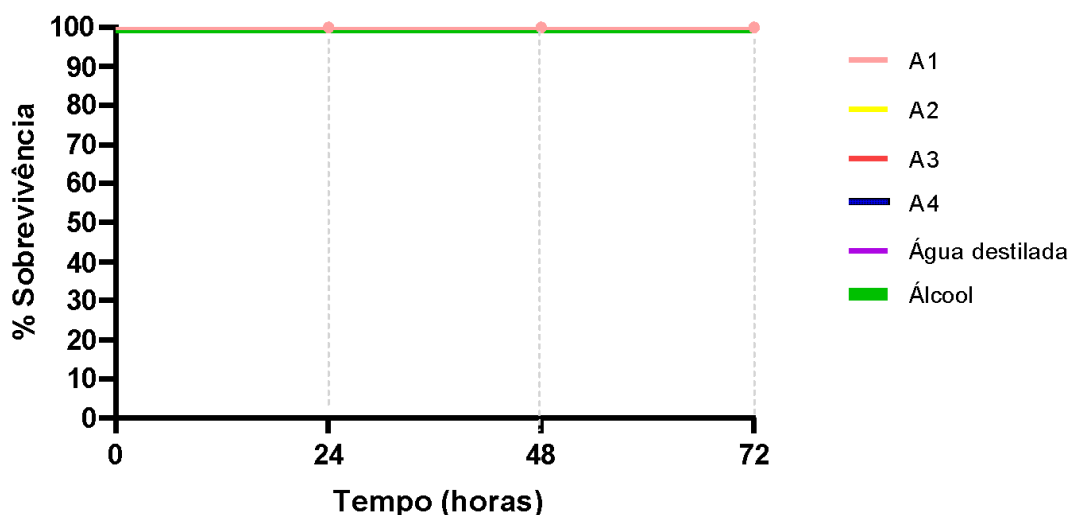
A toxicidade dos EEP de *F. varia* *in vivo* foi avaliada utilizando o modelo de larvas de *G. mellonella*, considerando a taxa de sobrevivência e o índice de saúde dos

indivíduos. Este último foi calculado com base na análise de parâmetros como melanização, formação de casulos e atividade locomotora das larvas, conforme metodologia proposta por Loh *et al.* (2013). Os resultados obtidos são apresentados nos gráficos a seguir.

Em comparação aos modelos tradicionais com mamíferos, as larvas de *G. mellonella* apresentam vantagens significativas: podem ser obtidas em grande quantidade, possuem baixo custo, são de manejo simples e não demandam infraestrutura laboratorial complexa (Pereira *et al.* 2018).

Conforme evidenciado na Figura 14, após 72 horas, todos os indivíduos dos grupos tratados com os EEP de *F. varia*, bem como os controles, sobreviveram à inoculação da dose de 1600 mg/kg (equivalente a uma concentração de 40 mg/mL). Esse resultado indica que, nas condições testadas, os extratos não apresentaram toxicidade aguda capaz de comprometer a sobrevivência das larvas, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos.

Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia* após 72 horas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

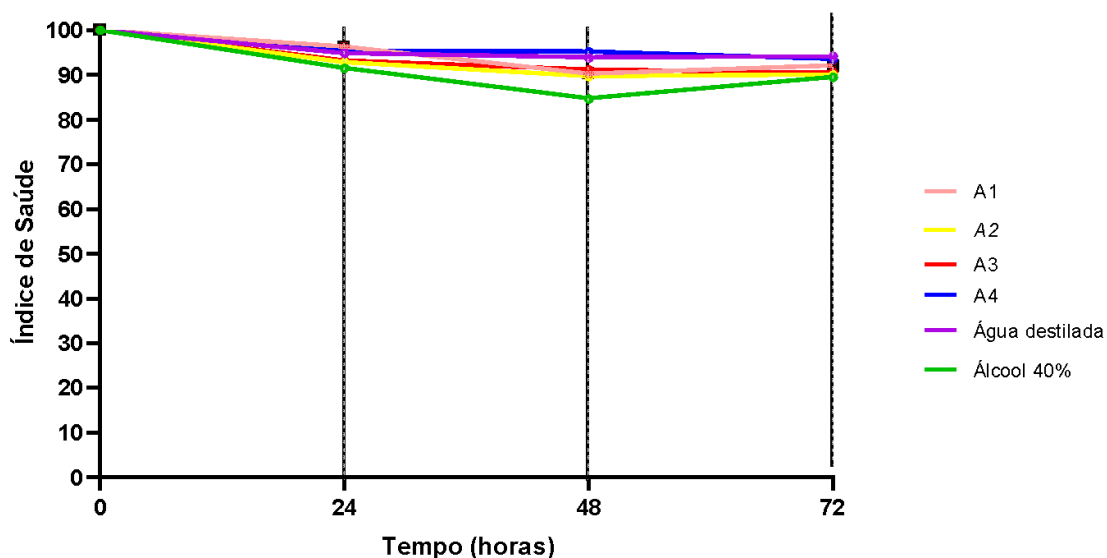
Resultados semelhantes foram reportados por Santini *et al.* (2024), que observou que o EEP de *M. ruventis* não apresentou toxicidade nas doses de 32, 16 e

4 mg/kg, mantendo a porcentagem de sobrevivência das larvas inalterada após 72 horas. No entanto, vale destacar que a maior dose testada por Santini *et al.* (2024), 32 mg/kg, é consideravelmente inferior à dose utilizada no presente estudo (1600 mg/kg). Silva (2023) também não observou efeito tóxico significativo ao avaliar o EEGP de *M. quadrifasciata* em larvas de *G. mellonella* nas concentrações de 32 mg/kg (800 µg/mL), 16 mg/kg (400 µg/mL) e 4 mg/kg (100 µg/mL), em comparação ao controle.

Em contraste, Cochut (2024) relatou que os EEGP de *M. capixaba* apresentaram efeito citotóxico, com porcentagem de sobrevivência variando entre 80% e 60% nas larvas tratadas. Esses resultados sugerem que a toxicidade dos extratos de própolis pode variar dependendo da espécie.

O índice de saúde (Figura 15) demonstrou que, ao final de 72 horas, todos os indivíduos apresentaram um índice superior a 90%, sem diferença estatística significativa entre os grupos. No entanto, observou-se uma pequena oscilação nos parâmetros de saúde ao longo dos dias, como melanização, formação de casulos e movimentação das larvas. Essas variações, embora não significativas, podem estar relacionadas a variações naturais no metabolismo das larvas ou a respostas adaptativas ao tratamento.

Figura 15 – Índice de saúde das larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia* após 72 horas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Cochut (2024) observou que uma de suas amostras de *M. capixaba* reduziu o índice de saúde das larvas para menos de 40%, sugerindo que alguns extratos de própolis podem comprometer a saúde das larvas mesmo quando não afetam significativamente a sobrevivência.

Rodrigues *et al.* (2025) investigaram diferentes concentrações (0,01, 0,05, 2, 6 e 8 mg/mL) de própolis de Gêres, em Portugal, administradas por distintas vias (injeção na hemocele e aplicação tópica), e verificaram que não houve diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência entre larvas tratadas e controles. Assim, nas condições avaliadas, a própolis não apresentou sinais de toxicidade aguda.

De maneira semelhante, Pedrinha *et al.* (2024) também relataram ausência de efeitos tóxicos em *G. mellonella* quando submetida a extratos de própolis verde seca nas concentrações de 1 a 3 mg/mL, sugerindo uma boa tolerabilidade do modelo biológico a essas doses.

Da Cunha *et al.* (2020) reforçam essa tendência ao demonstrarem que uma cumarina isolada de geoprópolis de *M. Scutellaris*, a cinamoiloxi-mameisina (CNM), não provocou toxicidade significativa em larvas expostas a doses de 2, 10 e 20 mg/kg.

A segurança também tem sido observada em modelos vertebrados. Mani *et al.* (2006), ao avaliarem a administração prolongada de própolis em ratos, utilizando diferentes concentrações, solventes extratores e tempos de exposição, constataram que não ocorreram alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo lipídico e à função cardíaca. Os autores destacam que o consumo contínuo de própolis por longos períodos, especialmente em doses próximas de 1 mg/kg/dia, não parece induzir danos sistêmicos detectáveis.

Apesar disso, Dos Santos *et al.* (2017) ressaltam que o uso de própolis como agente terapêutico deve ser acompanhado de cautela. Dependendo da origem dos materiais coletados pelas abelhas, o produto pode apresentar contaminantes como metais pesados ou substâncias tóxicas incorporadas acidentalmente, além de poder desencadear reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Dessa forma, a qualidade ambiental e botânica do entorno dos apiários é determinante para a segurança e eficácia do produto final.

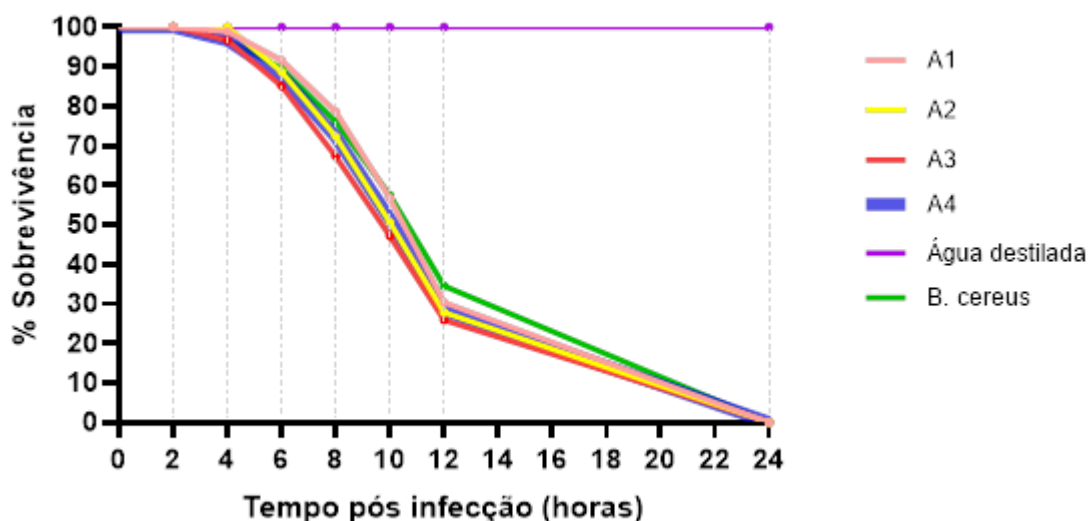
A ausência de toxicidade dos EEP de *F. varia* nas condições testadas indica um perfil de segurança preliminar *in vivo*. Esses dados sugerem que o extrato pode ser considerado seguro para aplicações biológicas ou terapêuticas, justificando sua continuidade em estudos de eficácia, inclusive em modelos vertebrados, como parte de uma triagem mais avançada do seu potencial terapêutico.

4.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana em modelo sistêmico *in vivo* de *Galleria mellonella*

A atividade antimicrobiana dos EEP de *F. varia in vivo* foi avaliada utilizando larvas de *G. mellonella*, considerando-se a porcentagem de sobrevivência e o índice de saúde. Este último foi determinado com base nos parâmetros de atividade das larvas, formação de casulo e melanização, conforme metodologia descrita por Loh *et al.* (2013).

Os resultados estão apresentados nas figuras a seguir. Como mostrado na Figura 16, após 24 h de infecção por *B. cereus*, nenhum indivíduo tratado com os EEP de *F. varia* sobreviveu, ao contrário do grupo controle negativo (água destilada), que manteve alta taxa de sobrevivência.

Figura 166 – Porcentagem de sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *B. cereus* e tratadas com os extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia* após 24 horas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

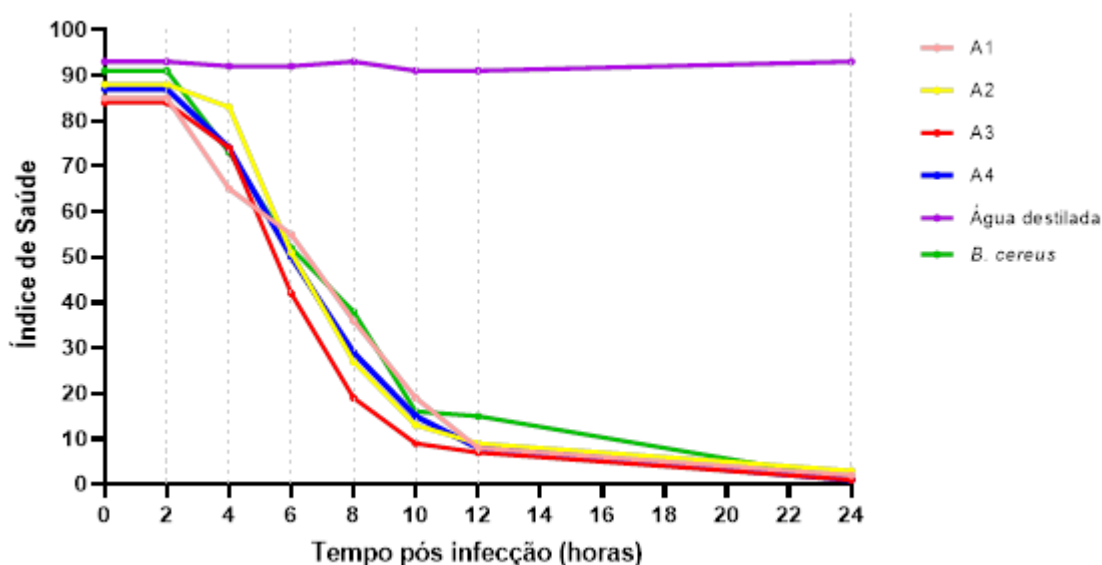
Resultados semelhantes foram observados por Silva (2023), ao avaliar a geoprópolis de *M. quadrifasciata*, que constatou que a sobrevivência das larvas frente a *S. aureus* aumenta conforme se eleva a concentração do extrato utilizado.

De acordo com Bruzadelli (2023), o tratamento com Phtalox® em larvas de *G. mellonella* infectadas com *S. aureus* resultou em uma taxa de sobrevivência de 30% após 24 horas, desempenho semelhante ao observado no grupo tratado com Clorexidina. Outro ponto relevante é que, nos grupos tratados exclusivamente com Phtalox®, não foram observadas mortes durante o período experimental, sugerindo ausência de toxicidade aguda desses compostos para *G. mellonella*. Por outro lado, no grupo infectado apenas com o patógeno, todas as larvas morreram em até 10 horas, ressaltando a elevada virulência da bactéria quando não há intervenção terapêutica. De modo geral, Bruzadelli (2023) reforça que o Phtalox® possui atividade antimicrobiana relevante *in vivo*, embora ainda necessite de otimização de dose e validação em outros modelos experimentais para melhor compreensão do seu potencial terapêutico.

De forma complementar, a Figura 17 apresenta o índice de saúde dos grupos

analisados. O controle negativo exibiu valores superiores a 90%, enquanto os grupos infectados com *B. cereus* e tratados com os EEP apresentaram índices inferiores a 5%, em decorrência da mortalidade total dos indivíduos.

Figura 17 – Índice de saúde das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *B. cereus* e tratadas com os extratos etanólicos de própolis (EEP) de *Frieseomelitta varia* após 24 horas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2025).

Embora os EEP de *F. varia* tenham demonstrado atividade antibacteriana classificada entre fraca e moderada contra *B. cereus* em ensaios *in vitro*, essa eficácia não se traduziu em proteção *in vivo*, uma vez que não foi observado retardo ou impedimento da mortalidade das larvas.

É importante destacar que o modelo com *G. mellonella* apresenta limitações. A ausência de um sistema imunológico adaptativo restringe a extrapolação direta dos resultados para vertebrados, sendo necessária a validação em modelos adicionais (Curtis; Binder; Kavanagh, 2022). Além disso, fatores como variações no manejo, na origem e nas condições de armazenamento das larvas podem influenciar a reprodutibilidade e dificultar a comparação entre estudos (Tsai; Loh; Proft, 2016; Ménard *et al.* 2021).

5 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu caracterizar química e biologicamente os extratos etanólicos de própolis (EEP) da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia*, gerando dados inéditos e contribuindo para a compreensão do potencial desta matriz apícola.

Os resultados demonstraram que a própolis de *F. varia* apresenta um perfil químico particular, marcado pela predominância de terpenoides, com destaque para ácido corosólico, ácido desidroabiético e ácido betulínico como constituintes majoritários sugeridos. Em contrapartida, os teores de compostos fenólicos totais (21,57 a 25,65 mg EAG/g) e flavonoides totais (~0,13 mg EQ/g) foram classificados como baixos a moderados quando comparados a padrões estabelecidos para própolis de *A. mellifera* e de outras abelhas sem ferrão. Essa composição química singular parece ser determinante para as atividades biológicas observadas.

Dessa forma, estudos futuros podem ser direcionados à investigação de outras atividades biológicas associadas aos compostos identificados, especialmente àquelas previamente atribuídas a terpenoides presentes em própolis de diferentes origens.

A atividade antioxidante dos EEP, avaliada por quatro metodologias distintas (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC), foi modesta e variável, refletindo diretamente o reduzido conteúdo de fenóis. Ainda assim, os resultados estão em consonância com estudos anteriores envolvendo a mesma espécie e reforçam a importância de múltiplas abordagens analíticas, considerando que distintos mecanismos de ação antioxidante foram detectados (sequestro de radicais, poder redutor e transferência de átomos de hidrogênio).

Nos ensaios antimicrobianos *in vitro*, os EEP de *F. varia* apresentaram espectro de ação limitado e potência classificada como fraca a moderada. A inibição do crescimento foi restrita a *B. cereus* (CIM entre 500 e 1000 µg/mL), não sendo observada atividade contra outras bactérias Gram-positivas, Gram-negativas ou leveduras testadas, mesmo na maior concentração avaliada (4000 µg/mL).

O modelo alternativo *in vivo* com *G. mellonella* revelou informações relevantes e complementares. A administração de dose elevada (1600 mg/kg) demonstrou excelente segurança, sem sinais de toxicidade aguda. Entretanto, no modelo de infecção por *B. cereus*, não houve proteção das larvas, resultando em mortalidade total em 24 horas. Esses achados indicam que a atividade antimicrobiana observada

in vitro não foi suficiente para controlar uma infecção sistêmica *in vivo* nas condições analisadas.

REFERÊNCIAS

A.B.E.L.H.A. – **Associação Brasileira de Estudos das Abelhas**. Disponível em: <https://abelha.org.br/>. Acesso em: 2 dez. 2025.

AFATA, Tariku Neme; DEKEBO, Aman. Chemical Composition and Antimicrobial Effect of Western Ethiopian Propolis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 2, p. e202200922, fev. 2023.

AL-DUAIS, Mohammed *et al.* Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 1 mar. 2009.

ALAM, Md. Nur; BRISTI, Nusrat Jahan; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, abr. 2013.

ALBANESE, Gianluca *et al.* Functional and Antimicrobial Properties of Propolis from Different Areas of Romania. **Applied Sciences**, v. 15, n. 2, p. 898, 17 jan. 2025.

ALEIXO, Kátia Paula *et al.* Pollen Collected and Foraging Activities of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier) (Hymenoptera: Apidae) in an Urban Landscape. **Sociobiology**, v. 60, n. 3, p. 266–276, 6 nov. 2013.

AL-HATAMLEH, Mohammad A. I. *et al.* Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 923, 18 jun. 2020.

ALMEIDA, Eduardo A. B. *et al.* The evolutionary history of bees in time and space. **Current Biology**, v. 33, n. 16, p. 3409–3422.e6, ago. 2023.

ANDRADE, Julianna Karla Santana *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, nov. 2017.

ASSIMOS, Ariane Araujo. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis, utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ATLAS NACIONAL DE LAS ABEJAS. Capítulo 4. Disponível em: <https://atlasnacionaldelasabejasmx.github.io/atlas/cap4.html>.

BANKOVA, Vassya *et al.* Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1–49, 15 mar. 2019.

BANKOVA, Vassya; TRUSHEVA, Boryana; POPOVA, Milena. Propolis extraction

methods: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 734–743, 20 out. 2021.

BENADUCCI, Tatiane *et al.* Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 9 mar. 2016.

BENDINI, Juliana Do Nascimento *et al.* Meliponário didático: a extensão universitária como uma estratégia para a conservação das abelhas sem ferrão no semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Extensão Universitária**, v. 11, n. 3, p. 277–288, 4 set. 2020.

BERLINCK, Roberto G. S. *et al.* A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química Nova**, 3 jul. 2017.

BERTOLINI, Ana Maria *et al.* **Biodiversidade e sistemas alimentares: a contribuição (in)visível das abelhas sem ferrão**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/9786588304228>.

BOLELI, Isabel Cristina *et al.* Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. **Journal of Morphology**, v. 242, n. 3, p. 271–282, dez. 1999.

BONAMIGO, Thaliny *et al.* Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 1038153, jan. 2017.

BOTTONE, Edward J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 382–398, abr. 2010.

BRUZADELLI, Rafaela Franco Dias. **Avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade do Phtalox® em modelos in vitro e in vivo de *Galleria mellonella***. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2023.

BUSETTI, Alessandro; MAGGS, Christine A.; GILMORE, Brendan F. Marine macroalgae and their associated microbiomes as a source of antimicrobial chemical diversity. **European Journal of Phycology**, v. 52, n. 4, p. 452–465, 2 out. 2017.

CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.

CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro *et al.* The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 557–564, set. 2012.

CALEGARI, Matheus A. *et al.* Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 6 fev. 2017.

CATÁLOGO DE ABELHAS MOURE. CRIA – Centro de Referência em Informação Ambiental. Disponível em: <https://moure.cria.org.br/index>. Acesso em: 2 dez. 2025.

CAMPÊLO, Maria Carla da Silva *et al.* Propolis and wax antimicrobial potential of different species of bees stingless. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 4, 8 jan. 2016.

CAMPOS, Viviane Aparecida Costa *et al.* Antibacterial activity of propolis produced by Frieseomelitta varia. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1043–1049, dez. 2011.

CASTRO, Myrella Léssio *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

COCHUT, Sarah Valero. **Caracterização química e atividade biológica em modelos in vitro e in vivo de *Galleria mellonella* do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona capixaba***. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2024.

COX-GEORGIAN, Destinney *et al.* Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. *In*: JOSHEE, Nirmal; DHEKNEY, Sadanand A.; PARAJULI, Prahlad (Orgs.). **Medicinal Plants**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 333–359.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, jun. 2013.

CURSOS CPT. **Abelhas: anatomia**. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-anatomia>.

CURTIS, Aaron; BINDER, Ulrike; KAVANAGH, Kevin. *Galleria mellonella* Larvae as a Model for Investigating Fungal—Host Interactions. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 893494, 26 abr. 2022.

DA CUNHA, Marcos Guilherme *et al.* Antimicrobial, anti-adherence and antibiofilm activity against Staphylococcus aureus of a 4-phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian geoprópolis. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103855, fev. 2020.

DAWIDOWICZ, Andrzej L.; WIANOWSKA, Dorota; OLSZOWY, Małgorzata. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, abr. 2012.

DE PAULA FREITAS, Flávia C. *et al.* The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* – a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 386, dez. 2020.

DESAI, Ankur V.; SIDDHAPARA, Mukesh R.; PATEL, P. K.; PRAJAPATI, A. P. Biology of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. on artificial diet. **Journal of Experimental Zoology India**, v. 22, n. 2, p. 1267-1272, 2019.

DIETRICH, Richard *et al.* The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. **Toxins**, v. 13, n. 2, p. 98, 28 jan. 2021.

DINI, Irene; LANERI, Sonia. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3921, 26 jun. 2021.

DOMINGOS, Aline Thamara De Sousa; NÓBREGA, Monasses Marques Da; SILVA, Rogério Alexandrino Da. Biologia das abelhas *Apis Mellifera*: Uma revisão bibliográfica. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 08–12, 31 dez. 2016.

DOS SANTOS, Larissa *et al.* Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of propolis extracts and isolated compounds from the Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5, p. 543–558, 20 out. 2017.

DOS SANTOS, C. F. *et al.* Diversidade de abelhas sem ferrão e seu uso como recurso natural no Brasil: permissões e restrições legais consorciadas a políticas públicas. 5 out. 2021.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, maio 2007.

ESCRICHE, Isabel; JUAN-BORRÁS, Marisol. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, v. 106, p. 834–841, abr. 2018.

FEITOSA, Luís Guilherme Pereira *et al.* Characterization of Larvicidal Diterpene Resin Acids in *MELIPONA QUADRIFASCIATA* Geopropolis via LC-ESI-MS/MS, GC-MS and Computational Analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 39, n. 12, p. e10025, 30 jun. 2025.

FERREIRA, Lindalva Maria De Meneses Costa *et al.* Preliminary Study on the Chemical and Biological Properties of Propolis Extract from Stingless Bees from the Northern Region of Brazil. **Processes**, v. 12, n. 4, p. 700, 29 mar. 2024.

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

GERGINOVA, Dessislava *et al.* The Chemical Composition of *Scaptotrigona mexicana* Honey and Propolis Collected in Two Locations: Similarities and Differences. **Foods**, v. 12, n. 17, p. 3317, 3 set. 2023.

GONÇALVES, Paulo Henrique Pereira. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas**. 2010. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

HAO, Meng *et al.* Recent Advances on Biological Activities and Structural Modifications of Dehydroabietic Acid. **Toxins**, v. 14, n. 9, p. 632, 12 set. 2022.

HIPÓLITO, Taciane Maíra Magalhães. **Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*: determinação da composição química e atividades biológicas**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

HOLETZ, Fabíola Barbiéri *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, out. 2002.

HORDYJEWSKA, Anna *et al.* Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 3, p. 929–951, 1 jun. 2019.

IWANCZUK, Kimberly. ***Galleria mellonella* como modelo experimental para infecções causadas por leveduras de interesse médico: uma revisão**. 2016. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

JEONG, Soyong *et al.* From microbes to molecules: a review of microbial-driven antioxidant peptide generation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 29, jan. 2024.

JORJÃO, Adeline L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383–389, 31 dez. 2018.

KARLIDAĞ, Semiramis. Investigation of phenolic compounds and antioxidant properties in honey, pollen and propolis according to regional and *Apis mellifera* genotypes. **Food & Nutrition Research**, v. 69, 1 ago. 2025.

KASIOTIS, Konstantinos M. *et al.* Revisiting Greek Propolis: Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170077, 19 jan. 2017.

KARLIDAĀ, Semiramis. Investigation of phenolic compounds and antioxidant properties in honey, pollen and propolis according to regional and *Apis mellifera* genotypes. **Food & Nutrition Research**, v. 69, 1 ago. 2025.

KAVANAGH, Kevin; SHEEHAN, Gerard. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 19 set. 2018.

KEDARE, Sagar B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, ago. 2011.

KOLAYLI, Sevgi; BIRINCI, Ceren. A comparative study of solvent effect on propolis extraction by ultrasound-assisted extraction. **Turkish Journal of Analytical Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 11–17, 30 jun. 2024.

KUMAZAWA, Shigenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, fev. 2004.

KUREK-GÓRECKA, Anna *et al.* Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 78–101, 20 dez. 2013.

KUREK-GÓRECKA, Anna *et al.* Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1203, 29 abr. 2022.

KUSKOSKI, E. Marta *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, dez. 2005.

LAVINAS, Flavia C. *et al.* Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389–399, maio 2019.

LOH, Jacelyn Ms *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419–428, jul. 2013.

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

MANI, F. *et al.* Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 95–98, abr. 2006.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil.

PLOS ONE, v. 11, n. 1, p. e0145954, 8 jan. 2016.

MARQUES-SOUZA, Antonio Carlos. Ocorrência do pólen de *Podocarpus* sp. (Podocarpaceae) nas coletas de *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836 (Apidae: Meliponinae) em uma área de Manaus, AM, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 558–566, jun. 2010.

MELO, Priscilla Siqueira *et al.* Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, ago. 2015.

MÉNARD, Guillaume *et al.* *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 782733, 22 dez. 2021.

MOHDALY, Adel A. A. *et al.* Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities: Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 538–547, out. 2015.

MOLOLE, Guyo Jilo; GURE, Abera; ABDISSA, Negera. Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. **BMC Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 48, dez. 2022.

MUÑOZ, Orlando *et al.* Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 848–851, ago. 2007.

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

NINA, Nélide *et al.* Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18144–18167, 6 out. 2015.

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

NOGUEIRA, David Silva *et al.* As abelhas “sem-ferrão” dos biomas brasileiros: O Brasil possui a maior biodiversidade de abelhas “sem-ferrão” do planeta, essenciais para o funcionamento dos ecossistemas e com grande potencial econômico. **Ciência e Cultura**, v. 75, n. 4, p. 01–07, dez. 2023.

NUNES, Francisco Vitor Aires. **Avaliação fitoquímica e farmacológica da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* produzida no semiárido nordestino**. 2018. 85 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

OLIVEIRA, Giovanni Chiovatto Cláudio de. **Própolis: uma revisão sobre origem,**

características, composição, aplicação e perspectivas. 2023. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2023.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, mar. 2015.

OSTROSKY, Elissa A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, jun. 2008.

PATRICIO, E. F. L. R. A. *et al.* The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 2, p. 249–254, 1 fev. 2002.

PEDRINHA, Victor Feliz *et al.* Effects of natural antimicrobial compounds propolis and copaiba on periodontal ligament fibroblasts, molecular docking, and in vivo study in *Galleria mellonella*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 171, p. 116139, fev. 2024.

PEDRO, Silvia R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 29 dez. 2014.

PEREIRA, D. S. *et al.* Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semi-Árido** – ACSA, v. 11, n. 2, p. 01–21, abr.–jun. 2015.

PEREIRA, Thais Cristine *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 27 nov. 2018.

POPOVA, Milena; TRUSHEVA, Boryana; BANKOVA, Vassya. Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. **Phytomedicine**, v. 86, p. 153098, jun. 2021.

PINTO, Angelo C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45–61, maio 2002.

PORTAL, Ariane Storch; CORDOVA, Caio. Propolis from Meliponinae: a highway from ancient wisdom to the modern medicines. *In*: ASIF AZIZ, Muhammad (Org.). **Melittology - New Advances**. [S.l.]: IntechOpen, 2023.

PRZYBYŁEK, Izabela; KARPIŃSKI, Tomasz M. Antibacterial Properties of Propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 29 maio 2019.

RÊGO, Márcia Maria Corrêa; ALBUQUERQUE, Patrícia Maia Correia de. **Biodiversidade De Abelhas Em Zonas De Transição No Maranhão**. São Luís, 2007. 22 p. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69116/1/Marcia.pdf>

REMYA, R. R. *et al.* Bioactive Potential of Brown Algae. **Adsorption Science & Technology**, v. 2022, p. 9104835, jan. 2022.

RIBEIRO, Victor P. *et al.* Larvicidal Activity of Constituents from the Main Brazilian Propolis Types: Green, Red, and Brown against *Aedes aegypti*. **ACS Omega**, v. 9, n. 33, p. 35560–35566, 20 ago. 2024.

RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROCHA, Vítor Moreira *et al.* Stingless bee propolis: composition, biological activities and its applications in the food industry. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 29, 4 maio 2023.

ROCHA, Vitor Moreira *et al.* Propolis from different Brazilian stingless bee species: phenolic composition and antimicrobial activity. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 12, 2024.

RODRIGUES, Rafael *et al.* In Vitro Investigation of the Antimicrobial Properties of Gerês Propolis in Bacteria Isolated from Companion Animals and Safety Profile Characterization Using the *Galleria mellonella* Model. **Pathogens**, v. 14, n. 8, p. 826, 21 ago. 2025.

SARDI, Janaina De Cássia Orlandi *et al.* Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, abr. 2017.

SALIBA, Ana Sofia Martelli Chaib *et al.* Effects of simulated gastrointestinal digestion/epithelial transport on phenolics and bioactivities of particles of brewer's spent yeasts loaded with Brazilian red propolis. **Food Research International**, v. 173, p. 1–11, 2023.

SANCHES, Márcia Aparecida; PEREIRA, Ana Maria S.; SERRÃO, José Eduardo. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (*Meliponini*). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50–57, jan. 2017.

SANPA, Sirikarn *et al.* Antibacterial Compounds from Propolis of *Tetragonula laeviceps* and *Tetrigona melanoleuca* (Hymenoptera: Apidae) from Thailand. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126886, 18 maio 2015.

SANTINI, Amanda Tristão *et al.* Bioactives of *Melipona rufiventris* Propolis: Exploring its Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 6, p. e202302084, jun. 2024.

SANTOS, Clementina M. M.; SILVA, Artur M. S. The Antioxidant Activity of

Prenylflavonoids. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 696, 6 fev. 2020.

SANTOS, Charles Fernando dos *et al.* Diversidade de abelhas sem ferrão e seu uso como recurso natural no Brasil: permissões e restrições legais consorciadas a políticas públicas. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 9 maio 2021.

SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland. 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.

SAWAYA, Alexandra Christine Helena Franklan; BARBOSA DA SILVA CUNHA, Ildenize; MARCUCCI, Maria Cristina. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 27, dez. 2011.

SEIDL, Peter R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 145–150, mar. 2002.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso *et al.* Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669, 1 set. 2010.

SILVA, Namuhell Oliveira da. **Caracterização química e determinação da atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* por ensaios in vitro e in vivo em modelo de *Galleria mellonella***. 2023. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2023.

SILVA, Wagner Pereira; PAZ, Joicelene Regina Lima da. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza Online**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 146–152, 2012.

SKROZA, Danijela *et al.* Investigation of Antioxidant Synergisms and Antagonisms among Phenolic Acids in the Model Matrices Using FRAP and ORAC Methods. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1784, 9 set. 2022.

SMITH, Daniel; CASADEVALL, Arturo. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 3, p. ftab013, 20 mar. 2021.

SOUZA, Edineide *et al.* Chemical compositions and antioxidant and antimicrobial activities of propolis produced by Frieseomelitta longipes and Apis mellifera bees. **Química Nova**, 2018.

SOUZA, Edineide Cristina A.; MENEZES, Cristiano; FLACH, Adriana. Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, v. 52, n. 1, p. 113–132, fev. 2021.

SUCUPIRA, Natália Rocha *et al.* Métodos Para Determinação da Atividade

Antioxidante de Frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

TAIZ; Lincoln *et al.* **Fisiologia Vegetal**, 6ª Ed. by: Lincoln Taiz, Artmed ed.
Publication date: 2017; Topics: Fisiologia vegetal, Botânica.

TANDA, Amarjit. **Native Bees are Important and Need Immediate Conservation Measures: A Review**. In: Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Entomology, MDPI, Basel, Switzerland, 1 jul. 2021.

TEIXEIRA, Érica Weinstein *et al.* Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 307–315, jan. 2010.

TEIXEIRA, João Victor Lima. **Caracterização físico-química e fitoquímica da própolis de abelhas nativas sem ferrão na caatinga**. 2024. 18 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2024.

TORRES, A. R. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 6, p. e7118, 2018.

TSAI, Catherine Jia-Yun; LOH, Jacelyn Mei San; PROFT, Thomas. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2 abr. 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA. Pró-reitoria de Extensão. **Cartilha de Alimentos Funcionais: a ciência no seu prato: compostos fenólicos e flavonoides**. Volume 2. Coordenadora do Produto de Extensão: Luciana Silva Ribeiro Martins. Belém, PA: UFRA, 2024. 16 p.

VEIGA, R. S. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, abr. 2017.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan Da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, abr. 2006.

VIEIRA, Ana Luiza Santos *et al.* Evaluation of the Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Green, Brown, and Dark Propolis. **Plants**, v. 12, n. 18, p. 3204, 8 set. 2023.

WIJESINGHE, Gayan Kanchana *et al.* Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p.

e200349, 2020.

WOJDA, Iwona *et al.* The greater wax moth *Galleria mellonella* : biology and use in immune studies. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 9, p. ftaa057, 23 nov. 2020.

WOLFF, Sandra Mara; SILVEIRA, Ana Claudia Da; LAZZAROTTO, Marcelo. METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E ANTIOXIDANTES DA ERVA-MATE. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 21, n. 1, p. 45, 24 jun. 2019.

ZHAO, Jinwei *et al.* Biological effects of corosolic acid as an anti-inflammatory, anti-metabolic syndrome and anti-neoplastic natural compound (Review). **Oncology Letters**, v. 21, n. 2, p. 84, 2 dez. 2020.

ZULHENDRI, Felix *et al.* Recent Update on the Anti-Inflammatory Activities of Propolis. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8473, 2 dez. 2022.