

# IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

## QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS DE *Tetragonisca angustula* (LATREILLE, 1811)

Thaís Ferreira da Silva<sup>1</sup>, Nair Silva Macêdo<sup>1</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>1</sup>, Josivânia Teixeira de Sousa<sup>1</sup>, Débora de Menezes Dantas<sup>1</sup>, Tania Maria Sarmento da Silva<sup>2</sup>, Amanda Lins Bispo Monteiro<sup>2</sup>, Camila Macaúbas da Silva<sup>2</sup>, Francisco Assis Bezerra da Cunha<sup>1</sup>

**Resumo:** O uso excessivo de antibióticos tem acelerado a resistência bacteriana, estimulando a busca por novas alternativas com potencial antibacteriano, como a própolis de abelhas sem ferrão, especialmente a de *Tetragonisca angustula*, que tem propriedades antimicrobianas. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonoides no extrato etanólico da própolis de *T. angustula* e avaliar sua atividade antibacteriana contra cepas multirresistentes. O extrato foi obtido por destilação a vácuo, com fenólicos quantificados usando o reagente Folin-Ciocalteau (mgEAG/g) e flavonoides medidos com cloreto de alumínio (mgEQ/g). A concentração inibitória mínima e a atividade modificadora dos antibióticos foram avaliadas por microdiluição em caldo. Na quantificação de compostos, o extrato etanólico da própolis (EETa) apresentou teores de compostos fenólicos e flavonoides de 11,528 mgEAG/g e 4,165 mgEQ/g, respectivamente. Quando associado a antibióticos, os melhores resultados foram obtidos com a norfloxacin, que reduziu a CIM de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e com a gentamicina, que reduziu a CIM de *S. aureus* e *E. coli*.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. Flavonoides. Efeito potencializador.

### 1. Introdução

As abelhas sem ferrão, ou meliponíneos, pertencem à família Apidae e possuem cerca de 600 espécies distribuídas em 61 gêneros, sendo predominantemente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, especialmente nos Neotrópicos (Popova; Trusheva; Bankova, 2021; Teixeira *et al.*, 2020). Uma das características que distinguem essas abelhas é a presença de um ferrão disfuncional e atrofiado (Turco; Mokochinski; Torres, 2024).

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão, a espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), popularmente conhecida como "Jataí" é uma das espécies mais criadas no Brasil (Ferrari *et al.*, 2024). Essa espécie possui tamanho pequeno, medindo entre 4 e 5 mm, com coloração amarela e marrom, apresentando hábito generalista (Silva Macêdo *et al.*, 2023).

<sup>1</sup> Universidade Regional do Cariri, email: [thais.ferreira@urca.br](mailto:thais.ferreira@urca.br); [naiirmacedo@gmail.com](mailto:naiirmacedo@gmail.com); [cristinase75@gmail.com](mailto:cristinase75@gmail.com); [josivania.sousa@urca.br](mailto:josivania.sousa@urca.br); [deboraafdj@gmail.com](mailto:deboraafdj@gmail.com); [cunha.urca@gmail.com](mailto:cunha.urca@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, email: [tania.sarmento@ufrpe.br](mailto:tania.sarmento@ufrpe.br); [amanda.bispo@ufrpe.br](mailto:amanda.bispo@ufrpe.br); [camilamacaubas@gmail.com](mailto:camilamacaubas@gmail.com)

# IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

## XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Além de mel, pólen e cera, as abelhas sem ferrão produzem própolis, um material composto por resinas vegetais, cera de abelhas, óleos voláteis e pólen. A própolis é utilizada para selar colmeias e proteger contra invasores como insetos, larvas, bactérias e fungos (Valcanaia *et al.*, 2022). Suas atividades biológicas incluem ações antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica e anticarcinogênica (Macedo *et al.*, 2023).

A importância dessas propriedades é ainda mais evidente diante do crescente desafio da resistência bacteriana, configurado como um dos maiores problemas de saúde pública global (Aguiar *et al.*, 2023). O uso excessivo e inadequado de antibióticos tem resultado no surgimento de cepas bacterianas resistentes, como de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, destacando a necessidade urgente de novas alternativas terapêuticas (Oliveira *et al.*, 2024). Nesse contexto, compostos naturais, têm se mostrado promissores no combate à resistência antimicrobiana (Braga *et al.*, 2021).

## 2. Objetivo

Avaliar o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato etanólico da própolis de *T. angustula*, bem como, verificar a sua atividade antibacteriana contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

## 3. Metodologia

### 3.1 Coleta e Preparação do extrato

As amostras de própolis de *T. angustula* foram coletadas no município de Crato, Ceará, em agosto de 2022. Elas foram trituradas e submersas em etanol 99,5% por 72 horas. Após filtração e destilação do solvente usando um rotaevaporador a vácuo, o extrato bruto foi levado ao banho-maria para evaporar o excesso de solvente, resultando no extrato etanólico da própolis (EEPTa). O estudo foi autorizado pelo Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBio), sob o número 85029.

### 3.1.2 Determinação do teor de fenólicos totais do extrato de *T. angustula*

Para quantificar o teor de fenólicos totais, foi utilizada uma metodologia modificada de Slinkard e Singleton (1977). As amostras foram solubilizadas em etanol (5 mg/mL) e uma alíquota de 25  $\mu$ L foi misturada com reagente Folin-Ciocalteu (10  $\mu$ L), água destilada (435  $\mu$ L) e 30  $\mu$ L da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15%). Após 2 horas de repouso, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 760 nm. A quantidade de compostos fenólicos foi determinada comparando a absorbância das amostras com uma curva de calibração de ácido gálico, expressando os resultados como mg equivalente a ácido gálico (EAG).

### 3.1.3 Determinação do teor de flavonoides do extrato de *T. angustula*

Para determinar o teor de flavonoides, foi utilizada uma metodologia modificada de Woisky e Salatino, (1998), usando quercetina como padrão.

# IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra (5 mg/mL) em eppendorfs de 1,0 mL. Após adicionar 200  $\mu\text{L}$  de metanol e 250  $\mu\text{L}$  cloreto de alumínio 5%, as amostras foram deixadas ao abrigo da luz por 30 minutos e lidas em espectrofotômetro a 425 nm. As análises foram feitas em triplicata, e o teor de flavonoides foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração de quercetina, expressando os resultados como mg equivalente a quercetina por grama de extrato (mg EQ/g).

## 3.2. Avaliação da atividade antibacteriana

### 3.2.1. Estirpes bacterianas, Meios de Cultura e Substâncias

As cepas utilizadas foram *S. aureus* 10, *P. aeruginosa* 24 e *E. coli* 06. Para os testes microbiológicos, foram usados meios de cultura BHI ágar e BHI caldo, preparados conforme as instruções do fabricante.

Os antibióticos gentamicina, norfloxacina e ampicilina, assim como o extrato EEPTa (10 mg), foram dissolvidos em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada esterilizada para atingir a concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.2.2. Avaliação da Atividade de Modificação do Efeito dos Antibióticos

A determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do extrato foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, adaptado de Javadpour *et al.*, (1996). Cepas multirresistentes foram semeadas 24 horas antes dos experimentos. O inóculo bacteriano foi ajustado para 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Microtubos foram preenchidos com BHI (900  $\mu\text{L}$ ) e inóculo (100  $\mu\text{L}$ ), e as placas foram preenchidas com a solução final em diluições seriadas (512  $\mu\text{g/mL}$  a 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Para o controle negativo utilizou-se apenas meio de cultura e inóculo bacteriano. Após 24 horas de incubação, 20  $\mu\text{L}$  de resazurina foram adicionados para leitura. A CIM foi definida como a menor concentração sem crescimento observado (Andrews, 2001). Os testes foram realizados em triplicata.

O aumento da atividade antibiótica do extrato foi avaliado pela modificação das CIMs de gentamicina, norfloxacina e ampicilina contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 e *S. aureus* 10. Os antibióticos foram combinados com EEPTa em concentração subinibitória (CIM/8) (Coutinho *et al.*, 2008).

## 4. Resultados

O EEPTa apresentou teores de compostos fenólicos e flavonoides de 11,528 mgEAG/g e 4,165 mgEQ/g, respectivamente. No estudo de Torres *et al.* (2018) foram encontrados teores de flavonoides significativamente menores, de 0,15 mg QE/g no extrato etanólico da própolis de *T. angustula*.

Os resultados da atividade direta do EEPTa frente as cepas testadas mostraram que não houve uma atividade antibacteriana, com valores de CIM de  $\geq 1024$   $\mu\text{g/mL}$  para todas as cepas avaliadas. Já a associação dos antibióticos com o extrato (Tabela 1) mostraram que o EEPTa apresentou efeito significativo com a norfloxacina contra *S. aureus* 10 e *P. aeruginosa* 24, reduzindo a CIM de

# IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

256 µg/mL para 64 µg/mL e de 2,82 µg/mL para 1 µg/mL, respectivamente. A gentamicina, quando combinada com o extrato, também reduziu a CIM para *S. aureus* 10 e *E. coli* 06, de 17,95 µg/mL para 10,07 µg/mL e de 64 µg/mL para 40,31 µg/mL, respectivamente.

Por outro lado, a ampicilina não apresentou alteração na CIM quando combinada com o extrato, exceto quando associada ao sulbactam. Nessa combinação, a CIM foi reduzida de 71,83 µg/mL para 5,65 µg/mL contra *S. aureus*, de 1024 µg/mL para 10,07 µg/mL contra *P. aeruginosa* 24 e de 1024 µg/mL para 32 µg/mL contra *E. coli* 06, indicando a presença de β-lactamase nas cepas testadas.

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima – CIM e atividade modificadora EEPTa em associação com antibióticos sobre cepas multirresistentes expresso em valores µg/mL

Cepas bacterianas	Antibióticos	Antibiótico	Antibiótico + EEPTa	Antibiótico + Sulbactam
<i>S. aureus</i> 10	Norfloxacina	256	64	-
	Gentamicina	17,95	10,07	-
	Ampicilina	71,83	71,83	5,65
<i>P. aeruginosa</i> 24	Norfloxacina	2,82	1	-
	Gentamicina	8	20,15	-
	Ampicilina	1024	1024	10,07
<i>E. coli</i> 06	Norfloxacina	64	64	-
	Gentamicina	64	40,31	-
	Ampicilina	1024	1024	32

## 5. Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o EEPTa apresenta quantidades significativas de fenólicos (11,528 mgEAG/g) e flavonoides (4,165 mgEQ/g). O extrato também potencializou a atividade antibiótica da norfloxacina frente a *S. aureus* 10 e *P. aeruginosa* 24. Enquanto que para a gentamicina houve modificação da atividade frente a *S. aureus* 10 e *E. coli* 06. Esses achados destacam a necessidade de investigar o potencial terapêutico dos produtos de *Tetragonisca angustula*, já que não existem estudos na literatura sobre a atividade antibacteriana deste extrato em combinação com antibióticos em cepas multirresistentes.

## 6. Agradecimentos

Agradecemos o apoio concedido ao projeto PDJ 2023 - Chamada CNPq Nº 32/2023 - Pós-Doutorado Júnior, processo 172358/2023-0 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico BP5-0197-00174.01.00/22 EDITAL/CHAMADA: BOLSA DE PRODUTIVIDADE EM PESQUISA, ESTÍMULO À INTERIORIZAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – BPI 04/2022.

# IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

## XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

### 7. Referências

- AGUIAR, J. N. *et al.* Evolução das políticas brasileiras de saúde humana para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos: revisão de escopo. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s. l.], v. 47, p. 1, 2023.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. suppl\_1, p. 5–16, 2001. Disponível em: [https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl\\_1/5/2473513](https://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/5/2473513).
- BARBOSA, E. F. *et al.* Comparação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da propolis de quatro espécies de abelhas. [s. l.], v. 1, p. 27–45, 2023.
- BRAGA, A. L. *et al.* Piper regnellii (Miq.) C. DC.: Chemical composition, antimicrobial effects, and modulation of antimicrobial resistance. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 142, p. 495–501, 2021.
- COUTINHO, H. D.M. *et al.* Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008. Disponível em: <https://karger.com/CHE/article/doi/10.1159/000151267>.
- FERRARI, R. R. *et al.* The nuclear and mitochondrial genome assemblies of *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini), a tiny yet remarkable pollinator in the Neotropics. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1–15, 2024.
- JAVADPOUR, M. M. *et al.* De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm9509410>.
- MACEDO, L. P. *et al.* Agricultural fungicidal effect of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 propolis extract. **Brazilian Journal of Science**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 65–71, 2023.
- OLIVEIRA, F. S. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extratos vegetais de briófitas contra microrganismos de importância clínica. [s. l.], p. 5–5, 2024.
- POPOVA, M; TRUSHEVA, B; BANKOVA, V. Phytomedicine Propolis of stingless bees : A phytochemist ’ s guide through the jungle of tropical biodiversity. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 86, n. July 2019, p. 153098, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153098>.
- SILVA MACÊDO, N. *et al.* Floral Visitation, Phytochemical and Biological Activities of Bioproducts from *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A Review. **Chemistry and Biodiversity**, [s. l.], v. 20, n. 12, 2023.
- SLINKARD, K; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 49–55, 1977. Disponível em: <http://www.ajevonline.org/lookup/doi/10.5344/ajev.1977.28.1.49>.
- TEIXEIRA, É. W. *et al.* European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 172, n. November 2019, 2020.
- TURCO, J. F; MOKOCHINSKI, João Benhur; TORRES, Yohandra Reyes. Chemical characterization of the hydrophilic fraction of (geo)propolis from brazilian stingless bees. [s. l.], v. 61, n. April, 2024.
- VALCANAIÁ, C. P. *et al.* Antimicrobial Activity of Volatile Oils from Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* Propolis. [s. l.], 2022.
- WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.