

# 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 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA CERA DA ABELHA *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

Nicole Dionísio Costa Xenofonte<sup>1</sup>, Nair Silva Macêdo<sup>1</sup>, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa<sup>1</sup>, Ana Luiza Fernandes Romão<sup>1</sup>, Zildene de Sousa Silveira<sup>1</sup>, Tania Maria Sarmiento 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:** A abelha sem ferrão, *Tetragonisca angustula* conhecida popularmente como “Jataí” pertence à família Apidae e se destaca pela atrofia do ferrão, sendo essencial na polinização de plantas nativas e cultivadas de interesse econômico. Diversos produtos dessa espécie, como a cera, possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Este estudo teve como objetivo quantificar o teor de fenólicos e flavonoides do extrato etanólico da cera de *T. angustula* (EECTa) e avaliar o potencial antimicrobiano contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A quantificação foi realizada com o reagente Folin-Ciocalteu e quercetina como padrão. Para os ensaios microbiológicos foi utilizado o método de microdiluição em caldo, a atividade antibacteriana foi verificada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e o efeito combinado com antibióticos foi avaliado em concentrações subinibitórias. Os teores de fenólicos e flavonoides totais foram de 12,43 mg EAG/g e 5,71 mg EQ/g, respectivamente. O EECTa aumentou a eficácia da norfloxacina sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa* e da gentamicina sobre *S. aureus*. No entanto, não houve efeito significativo quando associado com gentamicina e ampicilina sobre *P. aeruginosa* e *E. coli*.

**Palavras-chave:** Meliponíneos. Potencial Antibacteriano. Metabólitos Secundários.

#### 1. Introdução

As abelhas sem ferrão (ASF) são nativas de regiões tropicais e subtropicais, e pertencem à família Apidae e à tribo Meliponini, tendo mais de 244 espécies descritas no território brasileiro, desempenhando um papel crucial na polinização de diversas plantas (Gomes *et al.*, 2024).

As espécies de ASF, como a *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), conhecida popularmente como “Jataí”, possuem características em comum como a atrofia do ferrão e se organizam de forma eusocial (Rozman *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2024).

<sup>1</sup> Universidade Regional do Cariri, e-mail: [nicole.dionisio@urca.br](mailto:nicole.dionisio@urca.br); [naiirmacedo@gmail.com](mailto:naiirmacedo@gmail.com); [crstinase75@gmail.com](mailto:crstinase75@gmail.com); [aluiza.fernandes@urca.br](mailto:aluiza.fernandes@urca.br); [zildenesousa15@gmail.com](mailto:zildenesousa15@gmail.com); [francisco.cunha@urca.br](mailto:francisco.cunha@urca.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, e-mail: [tania.sarmiento@ufrpe.br](mailto:tania.sarmiento@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”

Essa espécie produz bioprodutos como mel, cera, própolis e geoprópolis, sendo identificado nas suas composições químicas compostos da classe dos ácidos fenólicos e flavonoides. Diversas propriedades biológicas foram identificadas em produtos de *T. angustula*, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antiprotozoária (Silva Macêdo *et al.*, 2023)

Na literatura, não há estudos que investiguem a atividade antibacteriana e modificadora da cera de *T. angustula*. Diante disso, se faz necessário investigar seu potencial antimicrobiano, especialmente contra cepas bacterianas multirresistentes.

## 2. Objetivo

Quantificar o teor de fenólicos e flavonoides e verificar o potencial antimicrobiano do extrato etanólico da cera de *T. angustula* contra as cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Escherichia coli* 06.

## 3. Metodologia

### 3.1. Coleta e Preparação do extrato

As amostras de cera de *T. angustula* foram coletadas em agosto de 2022, no município de Crato, Ceará, Brasil. As amostras foram trituradas e submersas em etanol 99,5° C, em temperatura ambiente por 72 h. Após isso, a solução foi filtrada e submetida à destilação do solvente em um aparelho rotaevaporador a vácuo. O extrato etanólico de cera da *T. angustula* foi denominado EECTa. Este estudo foi registrado e autorizado pelo Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBio) sob o número 85029.

### 3.2. Determinação do Teor Fenólicos Totais do extrato de *Tetragonisca angustula*

Para quantificar o teor de fenólicos totais, foi utilizada a metodologia modificada de Slinkard e Singleton (1977). A amostra foi solubilizada em etanol (5 mg/mL), e uma alíquota de 25µL foi misturada com reagente Folin-Ciocalteu (10 µL), água destilada (435 µL) e 30 µL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%). Após 2 horas de repouso, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 760 nm. A quantidade de 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).

### 3.3. Determinação do teor de flavonoides do extrato de *Tetragonisca 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 a leitura realizada 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).

### 3.4. Avaliação da atividade antibacteriana

#### 3.4.1. Estirpes bacterianas e Meios de Cultura

As cepas multirresistentes utilizadas foram a de *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Escherichia coli* 06. Os testes microbiológicos foram realizados utilizando BHI ágar e BHI caldo (Acumedia Manufacturers, EUA), preparados conforme as instruções do fabricante na concentração de 10%.

#### 3.4.2. Substâncias

Os antibióticos utilizados foram gentamicina, norfloxacina e ampicilina (Sigma Co., St. Louis, EUA). Os antibióticos, e o EECTa (10 mg) foram dissolvidos em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada esterilizada, alcançando uma concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3.4.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Avaliação da Atividade de Modificação do Efeito dos Antibióticos

A Concentração Inibitória Mínima - CIM do EECTa foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, adaptado de Javadpour *et al.*, (1996). As cepas foram semeadas 24h 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  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24 horas de incubação, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de resazurina para leitura. A CIM foi definida como a menor concentração sem crescimento visível (Andrews, 2001). Os testes foram realizados em triplicata. A modificação da atividade antibiótica do extrato foi avaliada ao analisar as CIMs da gentamicina, norfloxacina e ampicilina contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 e *S. aureus* 10. Os antibióticos foram combinados com EECTa em concentração subinibitória (CIM/8) (Coutinho *et al.*, 2008).

### 4. Resultados

Através da quantificação do teor dos compostos fenólicos e flavonoides foram obtidos resultados de 12,43 mg EQ/g e 5,71 mg EAG/g, respectivamente. No estudo de Fianco *et al.* (2013) foi relatado que o teor 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”

polifenóis totais em amostras de própolis de *T. angustula* foram de 50 mg EAG/g.

Na avaliação da atividade antibacteriana foi verificado que o EECTa apresentou uma CIM de 1024 µg/mL para todas as cepas avaliadas. Os dados de associação do EECTa com os antibióticos avaliados sobre as cepas bacterianas estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1-** Concentração Inibitória Mínima - CIM de antibióticos e em associação com EECTa sobre *S. aureus* 10, *P. aeruginosa* 24 e *E. coli* 06

Substâncias	Cepas bacterianas		
	<i>S. aureus</i> 10	<i>P. aeruginosa</i> 24	<i>E. coli</i> 06
Norfloxacina	256	2,82	64
Gentamicina	17,95	8	64
Ampicilina	71,83	1024	1024
Norfloxacina + EECTa	128	1	64
Gentamicina + EECTa	8	16	64
Ampicilina + EECTa	128	1024	1024

Na associação do EECTa com a norfloxacina foi verificada a potencialização da atividade antibiótica, reduzindo a CIM de 256 µg/mL para 128 µg/mL contra *S. aureus*. Já na associação do EECTa com a gentamicina houve uma redução na CIM de 17,95 a 8 µg/mL. No entanto, ao associar o EECTa com a ampicilina observou-se um efeito reverso, aumentando a CIM de 71,83 para 128 µg/mL. Segundo Miorin *et al.* (2003) a própolis de *T. angustula* apresentou uma CIM entre 0,5 e 2 mg/mL para *S. aureus*, sugerindo atividade antimicrobiana da própolis isolada.

Na cepa de *P. aeruginosa*, a associação do EECTa com a norfloxacina apresentou uma redução na CIM do antibiótico de 2,82 para 1 µg/mL. Na associação com a gentamicina foi verificado um aumento da CIM de 8 para 16 µg/mL. Os dados de associação do extrato com a ampicilina sobre a cepa *P. aeruginosa* não diferiram estatisticamente do controle.

Para a cepa *E. coli*, a associação do EECTa com os antibióticos norfloxacina, gentamicina e ampicilina não apresentaram resultados estatisticamente relevantes.

### 5. Conclusão

A combinação do EECTa com os antibióticos norfloxacina e gentamicina potencializou a atividade antibiótica, reduzindo a CIM dos antibióticos sobre a cepa de *S. aureus*. No entanto, não houve efeitos significativos na combinação com gentamicina e ampicilina sobre *P. aeruginosa* e *E. coli*.

### 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

# 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"

BP5-0197-00174.01.00/22 EDITAL/CHAMADA: BOLSA DE PRODUTIVIDADE EM PESQUISA, ESTÍMULO À INTERIORIZAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – BPI 04/2022.

### 7. Referências

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. suppl\_1, p. 5–16, 2001.

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.], 2008.

SILVA MACÊDO, N. *et al.* Floral visitation, phytochemical and biological activities of bioproducts from *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 12, p. e202301451, 2023.

GOMES, K. O. *et al.* Chemical characterization and antibacterial activities of Brazilian propolis extracts from *Apis mellifera* bees and stingless bees (Meliponini). **Plos one**, v. 19, n. 7, p. e0307289, 2024.

JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], 1996.

LIMA, Â. *et al.* Ferulic acid as major antioxidant phenolic compound of the *Tetragonisca angustula* honey collected in Vera Cruz-Itaparica Island, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e253599, 2022.

FIANCO, A. L. B. *et al.* Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). **Revista Liberato**, v. 14, n. 21, p. 21-28, 2013.

MIORIN, P. L. *et al.* Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of applied microbiology**, v. 95, n. 5, p. 913-920, 2003.

ROZMAN, A. S. *et al.* A comprehensive review of stingless bee products: Phytochemical composition and beneficial properties of honey, propolis, and pollen. **Applied Sciences**, v. 12, n. 13, p. 6370, 2022.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total fenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.