

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 DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONÓIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE POTES DE PÓLEN DA ABELHA *Scaptotrigona depilis*

Ana Luiza Fernandes Romão¹, Zildene de Sousa Silveira¹, Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹, Nicole Dioniso Costa Xenofonte¹, Nair Silva Macêdo¹, Tania Maria Sarmento da Silva², Amanda Lins Bispo Monteiro², Gustavo Miguel Siqueira¹, Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

Resumo: O crescente surgimento e disseminação de cepas bacterianas multirresistentes nos últimos anos se tornou um problema para a saúde pública global, demandando o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Com isso, o potencial antibacteriano de bioprodutos de abelhas sem ferrão vem sendo estudado como uma alternativa para contribuir para o controle desse problema. Esse estudo teve como objetivo quantificar o teor de fenólicos e flavonoides do extrato etanólico de potes de pólen da abelha *Scaptotrigona depilis* (EPPSd), bem como avaliar o efeito antibacteriano e sua associação com antibióticos. O extrato foi obtido através de destilação a vácuo, e os fenólicos totais foram quantificados com o reagente Folin-Ciocalteu. Os flavonoides foram medidos com cloreto de alumínio e comparados a uma curva de quercetina. Para os ensaios microbiológicos foi utilizado o método de microdiluição em caldo. O efeito combinado do extrato com os antibióticos foi avaliado em concentração subinibitória. O EPPSd apresentou teores de 3,985 mgEAG/g para fenólicos e de 1,903 mgEQ/g para flavonoides. Dentre os resultados obtidos destaca-se a atividade antibacteriana direta do EPPSd sobre a cepa de *E. coli* 06 com CIM de 128 µg/mL e a atividade indireta do extrato associado a norfloxacin com redução da CIM de 256 para 128 µg/mL.

Palavras-chave: Abelha-sem-ferrão. Saburá. Bioatividade.

1. Introdução

O gênero *Scaptotrigona* pertencente à tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae), é um dos mais amplamente distribuídos entre as abelhas sem ferrão com 51 espécies presentes na região neotropical (ENGELS *et al.*, 2023). Essas abelhas são importantes polinizadores nessa região, além de produzirem suplementos alimentares que apresentam valores econômicos, nutricionais e terapêuticos como o mel, própolis, geoprópolis e pólen fermentado ("saburá") (SILVEIRA *et al.*, 2024).

Dentre esses bioprodutos destaca-se o pólen fermentado ("saburá"), o qual é coletado pelas abelhas nas plantas e misturado ao néctar e às enzimas digestivas dessas abelhas, bem como a microrganismos que vivem como

¹ Universidade Regional do Cariri, email: aluiza.fernandes@urca.br, zildenesousa15@gmail.com, cristinase75@gmail.com, nicole.dionisio@urca.br, naiirmacedo@gmail.com, gustavo.miguelsiqueira@urca.br, cunha.urca@gmail.com

² Universidade Federal Rural do Pernambuco, email: tania.sarmiento@ufrpe.br, amanda.bispo@ufrpe.br

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"

simbiontes nas colmeias (SILVEIRA *et al.*, 2024). A composição química destes produtos pode variar dependendo da sua origem botânica, geográfica, bem como da espécie de abelha (SILVEIRA *et al.*, 2024; SOUZA *et al.*, 2021).

Embora os dados da literatura em relação as bioatividades dos potes de pólen ou saburá de *S. depilis* sejam escassos, estudos relacionados a outras abelhas do gênero, demonstraram atividades antibacterianas e antioxidantes, o que foi associado à sua composição rica em flavonoides, fenóis, lipídios, vitaminas e proteínas (DEOCARIS *et al.*, 2023; NAIBAH O *et al.*, 2023; PATRICIA *et al.*, 2016).

Desse modo, é importante a condução de estudos que investiguem o potencial antibacteriano dos potes de pólen de *S. depilis*, uma vez que este bioproduto pode conter bioativos que atuem como alternativa a agentes antibacterianos ou como adjuvantes de antibióticos já disponíveis, contribuindo assim para o controle da resistência bacteriana (ACAR OZ *et al.*, 2024; SILVEIRA *et al.*, 2024).

2. Objetivo

Quantificar o teor de fenólicos e flavonoides do extrato etanólico de potes de pólen de *S. depilis*, bem como avaliar a atividade antibacteriana direta e modificação do efeito dos antibióticos a frente a cepas bacterianas padrão e multirresistentes.

3. Metodologia

3.1 Coleta e Preparação dos extratos

As amostras de potes de pólen de *S. depilis* foram coletadas em agosto de 2022 no município de Crato, Ceará, Brasil. Após triturar manualmente cada amostra e submergi-las em solvente etanol 99,5° por 72 h, a solução obtida foi filtrada e destilada do solvente em um aparelho rotaevaporador a vácuo, onde o extrato bruto obtido foi levado ao banho-maria para evaporação do excesso de solvente. O material final do Extrato Etanólico de Potes de Pólen de *S. depilis* foi denominado EPPSd. Este estudo foi registrado e autorizado pelo Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBio) sob o número 85030-1.

3.1.1 Determinação do teor de fenólicos totais do extrato de *Scaptotrigona depilis*

Para quantificar fenólicos totais, usou-se uma metodologia de Slinkard e Singleton (1977), modificada. Amostras foram solubilizadas em etanol (5 mg/mL) e misturadas com reagente Folin-Ciocalteu, água destilada e solução de Na₂CO₃. Após 2 horas, a absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como mg equivalente a ácido gálico (EAG), comparando com uma curva de calibração.

3.1.2 Determinação do teor de flavonoides do extrato de *Scaptotrigona depilis*

Para determinar o teor de flavonoides, foi utilizada uma metodologia de Woisky e Salatino (1998) com quercetina como padrão. Amostras (50 µL a 5 mg/mL) foram misturadas com metanol e cloreto de alumínio, deixadas ao abrigo

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"

da luz por 30 minutos, e a absorvância foi medida a 425 nm. Os resultados foram expressos como mg equivalente a quercetina por grama de extrato (mg EQ/g), utilizando uma curva de calibração.

3.2. Avaliação da atividade antibacteriana

3.2.1. Estirpes bacterianas e Meios de Cultura

Utilizou-se cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Escherichia coli* 06; e cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e *E. coli* (ATCC 25922), as quais foram cultivadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Os meios de cultura utilizados foram: BHI ágar e BHI caldo preparados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.2 Substâncias

Os antibióticos gentamicina, norfloxacin e ampicilina e o EEPPSd (10 mg) foram dissolvidos em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada esterilizada até atingir a concentração de 1024 µg/mL.

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

Realizada de acordo com o método de micro diluição em caldo, com adaptações. As cepas padrão e multirresistentes utilizadas nos testes foram semeadas 24 h antes dos experimentos. Após esse período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ (UFC)/mL). Microtubos foram preenchidos com 900 µL de BHI e 100 µL de inóculo e as placas foram preenchidas com 100 µL da solução final. A micro diluição foi realizada com 100 µL em diluições seriadas foram realizadas em concentrações de EEPPSd de 512 µg/mL a 8 µg/mL. As leituras foram realizadas adicionando-se 20 µL de resazurina após 24 horas de incubação. Os testes foram realizados em triplicata.

A modificação da atividade antibiótica do extrato foi avaliada pela modificação das CIMs da gentamicina, norfloxacin e ampicilina sobre cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 e *S. aureus* 10. Os antibióticos foram combinados com EEPPSd em concentração subinibitória (CIM/8) (COUTINHO *et al.*, 2008).

3.3. Análise estatística

Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão não linear para o teor total de fenólicos e flavonoides. Os dados da atividade antibacteriana foram analisados através de ANOVA *one-way*, seguido do teste *post hoc* de Dunnett, sendo considerados significativos valores $p < 0,05$.

4. Resultados

O extrato de potes de pólen de *S. depilis* obteve um rendimento de 13,66 %.

A quantificação dos teores de fenólicos e flavonoides resultaram em teores de 3,985 mgEAG/g e 1,903 mgEQ/g, respectivamente. Souza *et al.* (2022) verificou teores de fenólicos e flavonoides de 116,06 mgEAG/g e 20,94 mgEQ/g para o saburá de *S. xanthotricha*. Esses valores sugerem que além da origem

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"

botânica e geográfica do pólen, a espécie da abelha pode ter influenciado na composição química (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Por meio dos valores de CIM obtidos foi possível observar que o EEPPSd não apresentou um efeito inibitório direto significativo frente a cepa padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e sobre as cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* 24, *S. aureus* 10, *E. coli* 06 com valores de CIMs ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, houve efeito inibitório direto significativo sobre as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), com CIMs de 256 e 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Esse estudo foi o primeiro a avaliar o efeito antibacteriano direto do extrato etanólico dos potes de pólen de *S. depilis* e de abelhas do gênero *Scaptotrigona*. Contudo, Carneiro *et al.* (2019), obtiveram resultado semelhante para a cepa de *P. aeruginosa* obtendo-se uma CIM ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$, utilizando o extrato de pólen da abelha *Melipona compressipes manaosensis*. Resultados similares também foram descritos no estudo de Naibaho *et al.* (2023) com o extrato de pólen de abelhas da espécie *Heterotrigona itama* e do gênero *Tetragonula* com valores de CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*.

Nos ensaios de modificação da atividade antibiótica, a associação do EEPPSd com a norfloxacin reduziu a CIM do antibiótico apenas sobre *P. aeruginosa* 24 e *S. aureus* 10, com redução de 4 para 2 $\mu\text{g/mL}$ e de 256 $\mu\text{g/mL}$ para 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Houve redução da CIM da gentamicina associada ao EEPPSd somente sobre *P. aeruginosa* 24, com redução de 8 $\mu\text{g/mL}$ para 5,6 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, o efeito combinado entre EEPPSd e a ampicilina demonstrou resultados significativos apenas para *S. aureus* 10 com redução da CIM de 181 para 90,5 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto a associação com o sulbactam demonstrou uma redução de CIM de 181 para 10,07 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo que essa cepa expressa a enzima β -lactamase que conferem resistência as penicilinas, como a ampicilina.

5. Conclusão

Os resultados demonstram que o extrato de potes de pólen de *S. depilis* apresentou baixos teores de fenólicos e flavonoides. Esses resultados pode estar associados aos efeitos antibacterianos obtidos, uma vez que o extrato não apresentou efeito antibacteriano direto frente às cepas padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e às cepas multirresistentes testadas. Entretanto, ele inibiu o crescimento bacteriano das cepas padrão de *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, o extrato potencializou a atividade antibiótica da norfloxacin e da gentamicina contra *P. aeruginosa* 24 e *S. aureus* 10 e reduziu significativamente a CIM da ampicilina frente a *S. aureus* 10.

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

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"

PESQUISA, ESTÍMULO À INTERIORIZAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – BPI 04/2022.

7. Referências

ACAROZ, U. *et al.* The Role of Bee Products in the Control of Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation. **Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi/Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi**, v. 30, n. 2, p. 131-153 1 jan. 2024

CARNEIRO, A. *et al.* Antimicrobial and Larvicidal Activities of Stingless Bee Pollen from Maues, Amazonas, Brazil. **Bee World**, v. 96, n. 4, p. 98–103, 28 ago. 2019.

DEOCARIS, C. C. *et al.* Botanical Origin and Extraction Methods of Philippine Stingless Bee (*Tetragonula bioifriese*) Pollen and its Food Functionality: Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity. **Journal of Tropical Life Science**, v. 14, n. 1, p. 55–64, 25 jan. 2024.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.

NAIBAHO, N. M. *et al.* Sensory evaluation and antibacterial activity of bee pollen extracts isolated from several stingless bees in two drying methods. **Biodiversitas**, v. 24, n. 5, p. 2682–2688, 2023.

SOUZA, C. M. *et al.* Chemical and microbiological characterization of “samburá” from two stingless bee species. **Journal of Apicultural Research**, v. 61, n. 1, p. 70–78, 18 maio 2021.

SILVEIRA, Z. S. *et al.* Chemical Profile and Biological Potential of *Scaptotrigona* Bee Products (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): An Review. **Chemistry and Biodiversity**, v. 21, n. 4, 28 fev. 2024. 1 abr. 2024.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49–55, 1 jan. 1977.

VIT, P. *et al.* Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emir. J. Food Agri.**, v. 28, i. 2, 2016.

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, jan. 1998.

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"

