

## **MELIPONA QUADRIFASCIATA: ATIVIDADES BIOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS**

### **MELIPONA QUADRIFASCIATA: BIOLOGICAL ACTIVITIES AND CHEMICAL COMPOSITION OF GEOPROPOLIS**

BUDÓIA, Mariana<sup>1,2</sup>; SAWAYA, Alexandra C. H. F. <sup>1</sup>; TESCAROLLO, Iara L. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pós graduanda do Curso de Farmacologia Clínica – Universidade São Francisco;

<sup>1</sup>Docente do Programa de Pós-graduação BTPB – Universidade Estadual de Campinas;<sup>2</sup>Docentes da Universidade São Francisco.

**[marianabudoia@gmail.com](mailto:marianabudoia@gmail.com)**

**RESUMO.** As abelhas nativas conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão pertencem à família *Apidae* e se dividem em três gêneros diferentes *Melipona*, *Lestrimelitta* e *Trigona*. A própolis ou geopropolis dessas abelhas vem apresentando resultados bastante interessantes em relação as atividades biológicas, porém ainda são poucos os estudos relacionados a composição química dessas geoprópolis. Esse artigo de revisão tem por finalidade identificar, descrever e analisar artigos científicos encontrados na literatura sobre a composição química dos extratos de geoprópolis da espécie de abelha *Melipona quadrifasciata* e sua atividade antimicrobiana e antioxidante comparando os métodos utilizados pelos autores e os resultados encontrados. A revisão confirmou que vários estudos mostraram que a geoprópolis de *M. quadrifasciata* apresentou potencial para ação antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além da identificação de alguns compostos presentes em amostras.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão, atividade antimicrobiana, perfil químico, atividade antioxidante.

**ABSTRACT.** Native bees popularly known as stingless bees belong to the *Apidae* family and are divided into three different genera *Melipona*, *Lestrimelitta* and *Trigona*. The propolis or geopropolis of these bees has been presenting very interesting results in relation to biological activities, but there are still few studies related to the chemical composition of these geopropolis. This review article aims to identify, describe and analyze scientific articles found in the literature on the chemical composition of geopropolis extracts of the bee species *Melipona quadrifasciata* and their antimicrobial and antioxidant activity by comparing the methods used by the authors and the results found. The review confirmed that several studies showed that *M. quadrifasciata* geopropolis showed potential for antimicrobial, antifungal and antioxidant action, as well as the identification of some compounds present in samples.

**Keywords:** Stingless bees, chemical composition, antimicrobial activity, chemical profile, antioxidant activity.

## **INTRODUÇÃO**

As abelhas nativas também conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão pertencem à família *Apidae* que se divide em três gêneros diferentes *Melipona*, *Lestrimelitta* e *Trigona*. Tais abelhas são identificadas pelo ferrão atrofiado, asas geralmente pequenas e ninhos com características distintas o que diferenciam as espécies (Nogueira-Neto, 1997; Nates-Parra, 2001; Venturieri, 2008). Em geral os ninhos são construídos em partes ocas de

árvores utilizando cera, resina vegetal e terra, estes compostos juntos formam uma própolis diferenciada, denominada geoprópolis (Nogueira-Neto, 1997). As abelhas utilizam esta geoprópolis para cobrir o ninho internamente vedando pequenas fendas, e em alguns momentos é empregada na defesa da colmeia (Nogueira-Neto, 1997; Venturieri, 2008). A composição química, qualidade e quantidade de geoprópolis ou própolis, são dependentes de alguns fatores tais como, localização geográfica, bioma pertencente, espécie, plantas visitadas, variação sazonal e época de coleta, conseqüentemente esta composição influencia diretamente na atividade biológica (Nogueira-Neto, 1997; Bankova et al., 1998; Castro et al., 2007; Liberio et al., 2011; Cardozo et al., 2015).

As abelhas nativas são responsáveis por até 90 % da polinização das árvores, sendo que de 30 a 80 % de uma floresta é polinizada por uma ou mais espécies da subfamília Meliponinae (Kerr; Carvalho; Nascimento, 1996; Kerr et al., 2001). Além disso essas abelhas contribuem bastante para o sucesso de muitas culturas agrícolas (Cardozo et al., 2015).

A espécie *Melipona quadrifasciata* popularmente conhecida como Mandaçaia distribui-se entre a Mata Atlântica e Cerrado, desde o estado Rio Grande do Sul à Bahia, passando por São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Batalha-Filho et al., 2009).

Apesar de poucos estudos e conhecimento sobre a geoprópolis da espécie, pesquisas mostram informações relevantes sobre as características do material. Análises realizadas por Barth (2006) apresentam as propriedades físicas e químicas da geoprópolis, como a coloração vermelha acastanhada por conta da presença de barro, a consistência arenosa e o odor suave. Estudos sobre a atividade antimicrobiana mostram um grande potencial da geoprópolis frente a bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram-positivas *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus* (Velikova et al., 2000a; Farnesi, 2007; Manrique; Santana, 2008; De Lima, 2015).

Sobre a composição química, Bankova et al. (1998a) identificaram a presença de ácidos de cadeia curta e longa, diterpenos, triterpenos e ausência de flavonóides, enquanto Velikova et al. (2000a) identificaram a presença de derivados do ácido benzóico, bem como o ácido gálico e ácido caurenóico. Estes trabalhos revelam a necessidade de novas pesquisas que identifiquem ou aprofundem sobre as atividades biológicas e composição química da geoprópolis de *M. quadrifasciata*.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar, descrever e analisar artigos científicos encontrados na literatura sobre a composição química dos extratos de geoprópolis da espécie *Melipona quadrifasciata* e sua atividade antimicrobiana e antioxidante comparando os métodos utilizados pelos autores e os resultados encontrados.

## METODOLOGIA

Este é um estudo de revisão desenvolvido com produção científica indexada nas seguintes bases eletrônicas de dados: CAPES, MEDLINE, PUBMED, BIREME, SCIELO e BVS que enfocam as atividades biológicas e composição química da geoprópolis de *M. quadrifasciata*.

A revisão responde aos métodos utilizados para avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e composição química dos extratos de geoprópolis da espécie *M. quadrifasciata* e os resultados encontrados pelos autores.

Diante deste contexto foram selecionados e avaliados os poucos artigos encontrados que apresentam estudos com a geoprópolis, uma vez que a maioria dos estudos relacionados com a espécie envolvem a fisiologia, ecologia e variabilidades genéticas. Foram selecionados um total de 32 artigos, cujo recorte temporal abrangeu o período compreendido entre 1997 a 2017.

Após o levantamento, procedeu-se a análise dos dados, que foram caracterizados de acordo com os testes realizados, métodos e resultados encontrados.

Outros critérios utilizados foram a seleção dos artigos a partir da análise dos resumos, sendo incluídos os que continham os descritores própolis e *Melipona quadrifasciata*, e a inserção dos artigos em roteiro preestabelecido pelas autoras contendo questões referentes à fonte, palavra-chave, área de conhecimento, data de publicação e modalidade do artigo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Metodologias utilizadas para o preparo do extrato de geoprópolis*

Alguns autores dentre os artigos selecionados, utilizaram amostras de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* coletadas em Prudentópolis no estado do Paraná, Brasil (Cardozo et al., 2015; Kujumgiev et al., 1998; Velikova et al., 2000b). Os autores realizaram estudos sobre as atividades biológicas e análises de composição química dos extratos etanólicos e metanólicos de geoprópolis de *M. quadrifasciata* (Cardozo et al., 2015; Manrique; Santana, 2008; Kujumgiev et al., 1998; Velikova et al., 2000b; Farnesi et al., 2009; Bonamigo et al., 2017; Santos et al., 2017). Para a produção dos extratos foram desenvolvidas e utilizadas diferentes metodologias.

Kujumgiev et al. (1998) prepararam os extratos por meio da trituração da própolis bruta em pequenos pedaços e colocados em contato com etanol 70 % na proporção de (1:10 m:v) durante 24 h. Após o período de extração, o etanol foi evaporado a vácuo até a secagem. As amostras de *M. quadrifasciata* obtiveram rendimentos de 20 % (Kujumgiev et al., 1998).

Velikova et al. (2000b) estudaram a presença de atividade antibacteriana do extrato total de geoprópolis *M. quadrifasciata* e de 3 componentes isolados frente a dois tipos de bactérias. Foi produzido um extrato metanólico de própolis na proporção de (1:10 m:v) obtendo-se um rendimento de 18,5 % (Velikova et al., 2000b).

Cardozo et al. (2015) estudaram amostras de três espécies de abelhas nativas, dentre elas a *M. quadrifasciata* (Mandaçaia). O trabalho teve por objetivo estudar a composição química qualitativa e quantitativa, os teores de fenóis totais, teores de flavonoides e a atividade antirradicalar da geoprópolis de cada espécie (Cardozo et al., 2015). Foram coletadas ao longo de um ano 16 amostras de geoprópolis e na sequência realizado o preparo dos extratos. A obtenção do extrato se deu a partir de 5 g da amostra bruta triturada em forma de pó e macerada exaustivamente em contato com etanol P.A incubado a 160 rpm durante 24 h em temperatura ambiente. Para obtenção do extrato seco se fez necessária a filtração em pressão reduzida e secagem do etanol a vácuo (Cardozo et al., 2015).

Farnesi et al., (2009) utilizaram amostras coletadas no Estado de São Paulo. Os extratos foram preparados utilizando 30 g de própolis em 100 ml de etanol 70 % durante 20 dias em temperatura ambiente e agitando uma vez por dia. Após esse período o conteúdo foi filtrado e o solvente foi evaporado a 50 °C (Farnesi et al., 2009).

No estudo realizado por Bonamigo et al. (2017) as amostras da geoprópolis de *M. quadrifasciata* foram obtidas do Estado de Mato Grosso do Sul, na região Centro-Oeste, Brasil. Para a preparação dos extratos os autores acrescentaram 1 g de própolis bruta em 4,5 ml de etanol a 80 %. Na sequência o conteúdo foi incubado em banho-maria a 70 °C até a dissolução. O conteúdo foi então filtrado e armazenado em temperatura de 20 °C (Bonamigo et al., 2017).

Santos et al. (2017) também obtiveram amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata* do estado do Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil. Os autores avaliaram as atividades biológicas e composição química dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis. O

extrato foi preparado a partir da pesagem de 80 g de geoprópolis e na sequência adicionou-se 240 ml de etanol a 70 %. A mistura foi agitada em 165 rpm durante 24 h. Após o período transcorrido o extrato foi concentrado por rotaevaporação e liofilizado para a produção do extrato seco (Santos et al., 2017).

Manrique e Santana (2008) realizaram estudos com geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* provenientes da cidade de Ribeirão Preto – SP, cedidas pela Universidade de São Paulo. Os autores avaliaram o conteúdo de flavonoides, a atividade antioxidante e a atividade antibacteriana

Os extratos etanólicos de própolis foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Park et al. (1998). Tal metodologia baseia-se na trituração de 2 g de própolis e na sequência transferência do conteúdo para tubos de ensaio. Em seguida, adiciona-se 25 ml de etanol a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95 %, respectivamente em cada tudo. A extração é realizada a 70 °C em banho de água termostaticado por 30 minutos, sob agitação constante. Após a extração, as amostras são centrifugadas a 8.800 x g por 10 minutos a 20 °C. Os sobrenadantes obtidos são armazenados em tubos de ensaio com tampa de rosca e na sequência armazenados em refrigerador (Manrique; Santana, 2008).

#### Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada por vários autores utilizando diferentes metodologias conforme mostrado no Quadro 1 (Manrique; Santana, 2008; Kujumgiev et al., 1998; Velikova et al., 2000b; Farnesi et al., 2009). Os extratos foram testados mediante as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*, (Manrique; Santana, 2008; Kujumgiev et al., 1998; Velikova et al., 2000b; Farnesi et al., 2009), já a atividade antifúngica foi avaliada utilizando *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Manrique; Santana, 2008).

**Quadro 1:** Atividades antibacteriana descritas em geoprópolis de Mandaçaia segundo a literatura.

Bactérias Testadas	Tipo de extrato utilizado	Atividade apresentada pelo extrato de <i>M. quadrifasciata</i>	Local de coleta da amostra	Método analítico	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 e <i>Escherichia coli</i> WF	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Atividade contra os dois tipos de bactérias	Prudentópolis no Estado do Paraná, Brasil	Método de difusão em ágar	Kujumgiev et al., 1998
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 e <i>Escherichia coli</i>	Extrato metanólico de geoprópolis	Atividade contra os dois tipos de bactérias	Prudentópolis no Estado do Paraná, Brasil	Método de difusão em ágar	Velikova et al., 2000b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Inibiu o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Estado de São Paulo	Cromatografia em camada fina e bioautografia - Método de difusão em ágar	Farnesi et al., 2009

Cont. **Quadro 1:** Atividades antibacteriana descritas em geoprópolis de Mandaçaia segundo a literatura.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Extrato etanólico de geoprópolis	Inibiu o crescimento de ambas bactérias testadas	Ribeirão Preto, Estado São Paulo, Brasil	Método de difusão em ágar	Manrique & Santana, 2008
Bactérias isoladas de fluídos biológicos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mostrou atividade contra todos os tipos de bactérias incluindo as cepas resistentes a antimicrobianos	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Método de diluição em caldo - Microdiluição e CIM	Santos <i>et al.</i> , 2017

Kujumgiev et al. (1998) avaliaram a atividade antibacteriana frente a dois tipos de bactérias (*Staphylococcus aureus* 209 e *Escherichia coli* WF). O método utilizado baseia-se na formação de zonas inibitórias na camada de ágar após 72 h de incubação a 37 °C. A atividade se dá pela formação de uma zona inibitória, onde um diâmetro inferior a 5 mm corresponde a falta de atividade. No ágar emprega-se 0,4 mg de extrato de cada amostra. O teste com o solvente se faz necessário para mostrar que não existe nenhuma atividade do mesmo. Os autores utilizaram o microrganismo *Candida albicans* 562 para avaliar a atividade antifúngica. Tal atividade é determinada pelo tamanho do diâmetro da zona inibitória formada, onde o diâmetro inferior a 10 mm corresponde a falta de atividade. Para a execução do teste utiliza-se 0,5 mg de extrato. Importante ressaltar a realização de testes com o solvente para mostrar que não possuem nenhuma atividade (Kujumgiev et al., 1998).

O extrato de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* mostrou uma atividade antibacteriana expressiva (diâmetro da zona inibitória igual a 11,2 mm) e atividade antifúngica (diâmetro na zona inibitória igual a 16,2 mm) (Kujumgiev et al., 1998).

A metodologia empregada para avaliar a atividade antibacteriana por Velikova et al. (2000b) foi a mesma utilizada por Kujumgiev et al. (1998). Os autores estudaram a presença de atividade antibacteriana do extrato total de geoprópolis *M. quadrifasciata* e de 3 componentes isolados frente a dois tipos de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Velikova et al., 2000b). O estudo revelou que o ácido caurenóico isolado obteve uma atividade significativa frente a espécie *Staphylococcus aureus*. Tal atividade foi de mesma grandeza quando comparada ao extrato total. Os outros dois componentes isolados não apresentaram nenhuma atividade antibacteriana. Apenas o extrato total obteve atividade significativa frente às duas espécies de bactéria, fato que confirmou mais uma vez que nenhum componente isolado tem maior atividade do que o extrato total (Velikova et al., 2000b).

Farnesi et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos por cromatografia em camada fina e bioautografia. As placas de cromatografia em camada fina contendo sílica gel receberam 8 µl das soluções de própolis (contendo 500 mg de extrato de própolis). Os autores utilizaram três fases móveis, duas baseadas em Moreno et al. (2000). A fase móvel foi hexano / acetato de etilo / ácido acético (60:40:1 v:v). As placas foram visualizadas utilizando vanilina sulfúrica (Farnesi et al., 2009).

A bioautografia foi realizada depois de arejar as placas por mais de 8 h. As placas foram cobertas com 20 ml de solução salina estéril, agar antibiótico, inoculadas com suspensões salinas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e incubadas durante 24 h a 37 °C. As zonas de inibição foram visualizadas como áreas claras contra um fundo vermelho.

As cepas utilizadas para o teste de suscetibilidade foram obtidas a partir de culturas de 24 h e suspensas em solução salina estéril para obter concentrações de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml, por comparação com o tubo de McFarland (Farnesi et al., 2009).

Os testes de difusão em placas utilizando discos de papéis (impregnados com as amostras) foram realizados utilizando 20 ml do meio de cultura Muller-Hinton estéril em placas de Petri onde, na superfície das mesmas, inoculou-se a suspensão salina de bactérias e na sequência foram deixadas secar. As placas foram incubadas a 37 °C e observadas após 24 h, medindo zonas de inibição claras ao redor dos discos (Farnesi et al., 2009).

Farnesi et al., (2009) concluíram em seu estudo que os extratos de própolis de *M. quadrifasciata* apresentam substâncias inibitórias com alta e média polaridade. A bioautografia mostrou que a própolis de *M. quadrifasciata* inibiu o crescimento de *S. aureus* na região que contém os componentes com alta e média polaridade. Os autores ainda revelam que a própolis de *M. quadrifasciata* obteve melhor atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* quando comparada com a própolis verde e a própolis de *Scaptotrigona sp.* Estes resultados mostraram que as resinas constituintes da própolis possuem um grande potencial para medicina humana e veterinária (Farnesi et al., 2009).

Manrique e Santana (2008) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos de geoprópolis frente a bactérias Gram-positivas, para isso utilizou-se placas de Petri com ágar Mueller-Hinton com suspensões de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e adicionaram neste meio disco de papéis com 5 mm de diâmetro com diferentes concentrações dos extratos etanólicos de própolis. Como controle os autores utilizaram álcool etílico 70 %. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A presença de halos de inibição indica sensibilidade das bactérias em relação aos extratos e a ausência de halos indica resistência das bactérias frente aos extratos. Todos os extratos etanólicos de geoprópolis de *M. quadrifasciata* estudados por Manrique e Santana (2008) apresentaram inibição do crescimento microbiano, tanto para *M. luteus* quanto para *S. aureus*.

Santos et al. (2017) utilizaram microorganismos isolados a partir de fluidos biológicos coletados em um Centro Hospitalar e foram identificados no Laboratório de Microbiologia da Escola de Ensino Superior de Bragança (Escola Superior Agrária de Bragança (ESA). Foram testadas a atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já a atividade antifúngica foi avaliada contra as leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Antes do procedimento os microorganismos isolados foram mantidos em ágar Muller-Hinton contendo 20 % de glicerol a -70 °C. O inóculo para o ensaio foi preparado pela diluição de uma massa celular em cloreto de sódio a 0,85 % e em seguida comparado a escala 0,5 de McFarland sendo confirmada por espectrofotometria a 580 e 640 nm para bactérias e leveduras respectivamente. O extrato de levedura foi utilizado em microplacas (96 poços). O extrato hidroetanólico foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e transferido para o primeiro poço da placa, na sequência as diluições em série foram realizadas. O inóculo foi adicionado a todos os poços e as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h para bactérias e durante 48 h para leveduras. Como controle positivo os autores utilizaram o antibiótico gentamicina e o antifúngico anfotericina B. Além disso, o DMSO foi utilizado sozinho como controle de

solvente em meio inoculado. A atividade antimicrobiana foi detectada pela adição de 20 µl de solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC) (5 mg/ml). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de extrato hidroetanólico de geoprópolis que inibiu o crescimento visível dos microrganismos, como indicado pela coloração TTC de células vivas (Santos et al., 2017).

De acordo com Santos et al. (2017) o extrato hidroetanólico mostrou atividade contra todos os microrganismos testados incluindo as cepas resistentes a medicamentos antimicrobianos. As bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis ao extrato quando comparadas com as Gram-negativas, sendo a *Staphylococcus aureus* a mais sensível apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) de  $5,16 \pm 0,22$  mg/ml. O extrato também apresentou atividade antifúngica contra todas as leveduras testadas, incluindo as cepas de referência de origem hospitalar.

#### *Avaliação da atividade antioxidante*

Alguns autores avaliaram a atividade antirradicalar dos extratos por um método espectrométrico utilizando como fonte radicalar o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). O método baseia-se na reação do DPPH com os antioxidantes presentes nos extratos de geoprópolis (Cardozo et al., 2015; Bonamigo et al., 2017). O método DPPH se dá por uma série de diluições diferentes obtendo-se concentrações distintas, de modo a formar um grande espectro de concentrações da amostra (Cardozo et al., 2015; Bonamigo et al., 2017).

Bonamigo et al. (2017) utilizaram 1,8 ml de solução de DPPH (DPPH 0,11 mM em etanol a 80 %) com 0,2 ml do extrato etanólico de *M. quadrifasciata* (1-300 µg/ml), seguido de homogeneização. Após 30 minutos, a quantificação dos radicais DPPH restantes foram registradas utilizando a absorvância ajustada em 517 nm. O ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado (BHT) foram utilizados como antioxidantes de referência. Os testes foram realizados em duplicata. Os autores constataram que a concentração necessária do extrato etanólico de geoprópolis para inibir 50 % do radical DPPH foi de 60,91 µg/ml, enquanto a concentração de inibição máxima (97,47 %) foi de 300 µg/ml, ou seja o extrato apresentou atividade antioxidante (Bonamigo et al., 2017).

Cardozo et al. (2015) prepararam uma solução estoque a partir da pesagem do DPPH (massa molar = 394,32 g/mol) e diluíram em metanol obtendo uma concentração final de  $1,6 \times 10^{-3}$  mol/L. Na sequência foram realizadas diluições para o preparo da solução de trabalho na concentração de  $9 \times 10^{-5}$  mol/L. Para a amostra de geoprópolis foi preparada uma solução em etanol P.A na concentração de 1.000 µg/ml. As diluições foram preparadas diretamente nas cubetas utilizando um volume fixo de solução de trabalho (2,5 ml) e volumes variados da solução de geoprópolis. Foi adicionado metanol em todas as cubetas a fim de obter um volume final de 3 ml. Foi utilizado como controle positivo a quercetina.

O estudo constatou atividade antioxidante em três amostras de *M. quadrifasciata* dentre as cinco testadas. A amostra de concentração igual 21,70 µg/ml apresentou melhor atividade diminuindo em 50 % a absorvância inicial do radical de DPPH (Cardozo et al., 2015). (Quadro 2).

Bonamigo et al. (2017) além do método DPPH utilizaram também o ABTS para avaliar a atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis. O método baseia-se na captura do radical ABTS (2,2'- azinobis (3 - etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfônico)) por agentes antioxidantes presentes na amostra por reações químicas, eletroquímicas ou enzimáticas.

**Quadro 2:** Atividades antioxidante de geoprópolis de *M. quadrifasciata* segundo a literatura.

Atividade apresentada pelo extrato de <i>M. quadrifasciata</i> CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Controle positivo utilizado CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Tipo de extrato utilizado	Local de coleta da amostra	Referência
21,70	Quercetina 1,77	Extrato etanólico de geoprópolis	Prudentópolis - Paraná, Brasil.	Cardozo <i>et al.</i> , 2015
60,91	BHT 22,84	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Bonamigo <i>et al.</i> , 2017
28,9	BHT 16,9	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Santos <i>et al.</i> , 2017

Método utilizado DPPH.

Para a realização do teste se faz necessário o preparo de uma solução estoque de ABTS na concentração de 7 mM, pela pesagem de 192 mg de ABTS e 50 ml de água destilada. Na sequência prepara-se a solução de persulfato de potássio utilizando 378,4 mg do mesmo e 10 ml de água destilada. Feito isso realiza-se o preparo do radical ABTS<sup>+</sup> utilizando 5 ml da solução estoque e 88 µl da solução de persulfato de potássio. Este radical é mantido em descanso ao abrigo de luz durante 16 h. Após o período dilui-se 1 ml desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm. Adiciona-se 20 µl do extrato etanólico de geoprópolis (1-300 µg/ml) em 1.980 µl de ABTS<sup>+</sup>, em seguida deve ser feita a homogeneização e leitura em espectrofotômetro a 734 nm (Bonamigo *et al.*, 2017). Santos *et al.* (2017) utilizaram o mesmo método do ABTS, porém ele solubilizou 20 µl do extrato hidroetanólico de geoprópolis em etanol 80 % (0,1-200 µg/ml) e em seguida adicionou em 1.980 µl de ABTS<sup>+</sup>.

Bonamigo *et al.* (2017) constataram uma concentração de 13,35 µg/ml do extrato de geoprópolis *M. quadrifasciata* para inibir 50 % do radical ABTS e uma concentração de 100 µg/ml para inibição máxima (99,31 %), enquanto que Santos *et al.*, (2017) obtiveram uma inibição de 50 % do radical ABTS utilizando uma concentração de 9,5 µg/ml do extrato hidroetanólico. Essa concentração foi bem semelhante a apresentada pelo antioxidante BHT (IC<sub>50</sub> = 8,1 µg/ml) (Santos *et al.*, 2017). (Quadro 3).

Santos *et al.* (2017) também avaliaram a atividade antioxidante pela captura do radical DPPH. O procedimento foi realizado pela solubilização de 200 µl do extrato hidroetanólico de geoprópolis em etanol 80 % obtendo-se concentrações que variaram de 0,1 a 200 µl/ml, em seguida misturou-se com 1.800 µl de solução DPPH (0,11 mM). A mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 30 minutos. Após o período de repouso foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 517 nm. Foram utilizados como controles positivos o ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado (BHT). Os autores constataram que a concentração necessária do extrato hidroetanólico de geoprópolis para inibir 50 % do radical DPPH foi de 28,9 µg/ml enquanto o BHT obteve uma concentração de 16,9 µg/ml (Santos *et al.*, 2017).



**Quadro 3:** Atividades antioxidante de geoprópolis de *M. quadrifasciata* segundo literatura.

Atividade apresentada pelo extrato de <i>M. quadrifasciata</i> CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Controle positivo utilizado CE <sub>50</sub> (µg/mL)	Tipo de extrato utilizado	Local de coleta da amostra	Referência
21,70	Quercetina 1,77	Extrato etanólico de geoprópolis	Prudentópolis - Paraná, Brasil.	Cardozo <i>et al.</i> , 2015
60,91	BHT 22,84	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Bonamigo <i>et al.</i> , 2017
28,9	BHT 16,9	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Santos <i>et al.</i> , 2017

Método utilizado ABTS.

Manrique e Santana, (2008) avaliaram a atividade antioxidante por um método no qual é adicionado em um béquer 2 ml do extrato etanólico de própolis e 48 ml de água destilada, em seguida realizada a agitação. Feito isto adiciona-se imediatamente 0,5 ml do extrato diluído + 1,5 ml de água destilada + 1 ml de ácido clorídrico a 20 % em um tubo de ensaio e em seguida submete o tudo a uma temperatura de 18 a 20 °C durante 2 minutos. Depois adiciona-se 50 µl de permanganato de potássio 0,1 N e avalia-se o tempo de mudança da coloração, de rosa para transparente, com o auxílio de um cronômetro. O limite máximo de tolerância permitido para uma própolis de qualidade é de 22 segundos.

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão estudadas por Manrique e Santana (2008) a geoprópolis da *M. quadrifasciata* apresentou maior atividade antioxidante com valores de 2,5 segundos para as amostras dos meses de janeiro e março de 2003. Park e Alencar (2000) relacionam em seu trabalho a atividade antioxidante com o teor de flavonoides, ou seja, quanto maior o teor de flavonoides mais rápida a atividade antioxidante. Porém Salamanca et al. (2007) relatam que a atividade antioxidante pode estar relacionada com os diferentes compostos presentes nos extratos etanólicos de própolis que não necessariamente são flavonoides.

#### *Avaliação da composição química*

Os autores avaliaram a composição química dos extratos de geoprópolis de *M. quadrifasciata* por métodos espectrométricos para determinação da concentração de compostos fenólicos e flavonoides e análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) e ESI-MS para identificar os compostos presentes nesses extratos, conforme apresentado no Quadro 4 (Cardozo et al., 2015; Manrique e Santana, 2008; Bonamigo et al., 2017; Santos et al., 2017).

Os teores de fenóis totais e flavonóides foram avaliados por Cardozo et al. (2015) por medidas espectrométricas UV-Vis realizando uma varredura de 210 nm a 600 nm. Para realizar o procedimento se fez necessário a construção de curvas analíticas por meio de soluções padrão. Utilizou-se soluções padrão de ácido gálico em metanol com concentrações que variaram de 3 a 28 µg/ml na quantificação de fenóis totais e soluções padrão de quercetina em metanol com concentrações entre 0,5 a 40 µg/ml na determinação do teor de flavonóides. Para ambos os

teores foram utilizados seis níveis de concentrações conhecidas para a construção da curva sendo cada ponto em duplicata.

**Quadro 4:** Composição química dos extratos de geoprópolis de *M. quadrifasciata* segundo a literatura.

Autores	Tipo de extrato utilizado	Local de coleta da amostra	HPLC-DAD-MS/MS
Cardozo <i>et al.</i> , 2015	Extrato etanólico de geoprópolis	Prudentópolis - Paraná, Brasil.	Ácido gálico Ácidos terpênicos
Santos <i>et al.</i> , 2017	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Diterpenos Triterpenos
Bonamigo <i>et al.</i> , 2017	Extrato hidroetanólico de geoprópolis	Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil	Ácido vanílico Ácido cafeico Vanilina Ácido p-cumárico Ácido ferúlico Ácido benzóico Quercetina Luteolina Ácido cinâmico Apigenina

Método: HPLC-DAD-MS/MS.

As soluções em etanol dos extratos das amostras de geoprópolis foram preparadas na contração de 1.000 µg/ml. O procedimento para a determinação de compostos fenólicos se deu pelo uso de um balão volumétrico de 5 ml onde foi adicionado 0,5 ml de solução tampão de carbonato/tartarato, 0,1 ml de cada solução padrão e 0,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu, na sequência o volume do balão foi ajustado com água destilada. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 760 nm (Cardozo et al., 2015).

Já para a avaliação de flavonóides o procedimento utilizado se deu pelo uso de um balão volumétrico de 5 ml onde foi adicionado 0,5 ml de cada solução padrão com 0,25 ml da solução de cloreto de alumínio di-hidratado 5 % (m:v) em metanol. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em 425 nm.

Para cada amostra de extrato de geoprópolis foram realizados os mesmos procedimentos descritos para as soluções padrão na determinação espectrométrica de fenóis e flavonóides (Cardozo et al., 2015). Cardozo et al. (2015) constataram nos extratos de geoprópolis de *M. quadrifasciata* teores de compostos fenólicos que variaram de 0,29 % a 1,11 % e teores de flavonóides que variaram de 0,24 % a 1,73 %.

Santos et al., (2017) realizaram a avaliação dos compostos fenólicos e flavonóides dos extratos de geoprópolis por um método semelhante ao utilizado por Cardozo et al., (2015), no qual o extrato testado também foi preparado na concentração de 1.000 µg/ml, porém na construção da curva de calibração foram utilizadas concentrações dos padrões ácido gálico e quercetina com variações de 0,4 µg/ml a 11 µg/ml (Santos et al., 2017).

O procedimento para a determinação de compostos fenólicos foi realizado pela mistura de 0,5 ml do extrato de geoprópolis de *M. quadrifasciata* com 2,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu e 2 ml de solução de carbonato de sódio. Após 2 h de descanso da mistura em

temperatura ambiente e ao abrigo de luz, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 760 nm (Santos et al., 2017).

Por outro lado, os flavonóides foram analisados pela mistura de 0,5 ml do extrato de geoprópolis com 4,5 ml de solução metanólica de hexahidrato de cloreto de alumínio a 2%. Após 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a amostra foi submetida a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 415 nm (Santos et al., 2017).

Os resultados dos teores de compostos fenólicos e flavonóides foram expressos respectivamente em mg de ácido gálico por equivalente grama de extrato (mg AGE/g extrato) e mg de quercetina por equivalente grama de extrato (mg QE/g extrato) (Santos et al., 2017).

A concentração total de compostos fenólicos e flavonóides presentes no extrato de geoprópolis de *M. quadrifasciata* foram respectivamente 118,7 mg AGE/g extrato e 25,4 QE/g extrato (Santos et al., 2017).

Manrique e Santana (2008) analisaram os conteúdos de flavonóides no extrato de geoprópolis de *M. quadrifasciata* pelo seguinte procedimento: em um balão volumétrico de 25 ml foram adicionados respectivamente 0,3 e 0,4 ml do extrato etanólico de geoprópolis, na sequência adicionou 15 ml de metanol P.A, 0,5 ml de cloreto de alumínio a 5% m:v e em seguida completou-se o volume do balão com metanol. Posteriormente o conteúdo dos balões foram agitados e resguardados da luz durante 30 minutos. Em uma cubeta de quartzo foi transferido 4 ml do conteúdo e na sequência realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 425 nm. Os flavonoides presentes nas amostras reagem com o cloreto de alumínio e etanol produzindo um complexo amarelo que possui um pico de absorvância de luz a 425 nm.

Os autores constataram um teor de flavonoides baixo nos extratos etanólicos da geoprópolis de *M. quadrifasciata* onde observou-se uma variação de 0,20 a 0,32 % entre os meses de novembro de 2003 a abril de 2004. Esses valores são baixos quando comparados com as abelhas *Apis* que apresentam valores superiores a 0,75% (Manrique, 2001). Tal diferença na concentração do teor pode se dar em relação à vegetação presente nas adjacências das colônias que proporcionaram as amostras, dado que há evidências de que a composição química da própolis varia dependendo da flora disponível próximo a colmeia (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995).

Bonamigo et al. (2017) avaliaram a composição química utilizando 1 mg da amostra que foi fracionada com hexano e água na proporção (1:1 v:v), onde a fração solúvel em água foi analisada por cromatografia líquida (HPLC). Os extratos foram submetidos a um sistema analítico de HPLC com um detector de matriz de diodos (DAD) monitorado em  $\lambda = 200-600$  nm. A coluna utilizada foi uma C-18 (25 cm  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu$ m), com uma pequena pré-coluna (2,5 cm  $\times$  3 mm). Em cada análise, a taxa de fluxo e o volume injetado foram de 1 ml/min e 20  $\mu$ l, respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22° C. A eluição foi realizada utilizando uma fase móvel binária de água com 6% de ácido acético e 2 mM de acetato de sódio (eluente A) e acetonitrila (eluente B). Foram aplicados os seguintes gradientes: 5% B (0 min), 15% B (30 min), 50% B (35 min) e 100% B (45 min) (Bonamigo et al., 2017). Os autores constataram a presença dos seguintes compostos: ácido vanílico (5,9 mg/g), ácido cafeico (6,2 mg/g), vanilina (5,7 mg/g), ácido p-cumárico (6,1 mg/g), ácido ferúlico (6,1 mg/g), ácido benzóico (6,9 mg/g), quercetina (9,9 mg/g), luteolina (1,3 mg/g), ácido cinâmico (13,2 mg/g) e apigenina (15,6 mg/g) (Bonamigo et al., 2017).

Cardozo et al. (2015) também utilizaram a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para avaliar a composição química dos extratos de geoprópolis de *M. quadrifasciata*. A análise foi realizada por meio de injeções de 0,005 ml de solução em metanol do extrato em uma coluna C-18 (50 mm  $\times$  2,1 mm; 1,7  $\mu$ m) a 30 °C. Como fase móvel utilizou-

se acetonitrila e 0,1 % de ácido fórmico com vazão de 0,2 ml/min. A condição inicial do gradiente foi mantida em 95 % de ácido fórmico em água e 5 % de acetonitrila até 9 minutos. Na sequência, realizou-se um gradiente linear em 10 minutos até 100 % de acetonitrila. Foram encontradas as seguintes substâncias nas amostras de geoprópolis: ácido gálico, ácidos terpênicos e baixo teor de flavonoides (Cardozo et al., 2015).

Santos et al. (2017) utilizaram cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e detector e matriz de diodos monitorado em  $\lambda = 240-800$  nm (HPLC-DAD-MS/MS). A coluna utilizada foi uma C-18 (150 mm  $\times$  2,2 mm; 2,6  $\mu$ m) a 50 °C. A eluição foi realizada utilizando uma fase móvel binária de água destilada (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico. Foram realizados os seguintes gradientes: 5% B (0-8 min), 3-25 % B (8-30 min), 25-80 % B (30-60 min). Pela análise realizada, os autores encontraram os seguintes compostos: flavonoides, compostos fenólicos, diterpenos e triterpenos (Santos et al., 2017).

Alguns autores avaliaram em estudos anteriores a composição química das amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata* por meio de GC-MS, (Bankova et al., 1992; Bankova et al., 1995; Christov et al., 1998) e constataram a presença de triterpenos e ácidos diterpênicos fato confirmado por Kujumgiev et al., (1998) em seu estudos.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelos estudos mostraram que a geoprópolis da espécie de abelha *Melipona quadrifasciata* apresenta um potencial para atividade antimicrobiana, expressa frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*. A atividade antifúngica foi apresentada frente às leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. O estudo também confirmou que o extrato total obtém uma melhor atividade biológica quando comparado com compostos isolados. Além da atividade antimicrobiana o mesmo apresentou um potencial para atividade antioxidante, uma vez que esta mostrou não estar relacionada diretamente com a concentração de flavonoides. Essas atividades e a composição química da geoprópolis podem ser influenciadas pela localização geográfica, bioma que pertencem, plantas visitadas, época de coleta e a variação sazonal. A realização de mais estudos se faz necessário uma vez que a geoprópolis da espécie ainda é pouco estudada.

## REFERÊNCIAS

BANKOVA, V. et al. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, v. 23, n. 1, p. 79-85, 1992.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 50, n. 3-4, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V. et al. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 5-6, p. 402-406, 1998.

BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361-367, 1998.

BARTH, Ortrud Monika. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, v. 41, n. 2, 2006.

BATALHA-FILHO, Henrique et al. Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, v. 41, n. 5, p. 534-547, 2010.

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, 2017.

CHRISTOV, R. et al. Chemical composition of Egyptian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 53, n. 3-4, p. 197-200, 1998

CASTRO, Myrella Léssio et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, 2007.

CARDOZO, Danielle V. et al. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2456-2474, 2015.

DE LIMA, M. V. D. Geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas: atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2015.

FARNESI, A. P. et al. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee world*, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GROSSO, Guillermo Salamanca; CARVAJAL, Ivonne L. Correa; PRINCIPAL, Judith. Flavonoid profile and oxidation indexes for some Colombian propolis. 2007.

KERR, Warwick Estevam et al. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangaú, 1996.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

KERR, Warwick Estevam et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v. 6, n. 12, p. 20-41, 2010.

LIBERIO, Silvana A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

MARCUCCI, Maria Cristina. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MORENO, María I. Nieva et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, v. 71, n. 1-2, p. 109-114, 2000.

MANRIQUE, Antonio J.; SANTANA, Weyder C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Tropical*, v. 26, n. 2, p. 157-166, 2008.

MANRIQUE, A. J. **Seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis. Ribeirão Preto. UNESP, 2001, 108p.** 2001. Tese de Doutorado. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–Universidade Estadual Paulista.

NOGUEIRA NETO, Paulo. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** Nogueirapis, 1997.

NATES PARRA, Guiomar. Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana*, v. 2, n. 3, 2001.

PARK, Yong Kun et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PARK, Yong Kun; IKEGAKI, Masaharu; ALENCAR, SM de. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem doce*, v. 58, n. 9, p. 3-7, 2000.

SANTOS, Helder Freitas dos et al. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 5, p. 953, 2017.

VELIKOVA, M. et al. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, v. 71, n. 6, p. 693-696, 2000.

VELIKOVA, Milena et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 55, n. 9-10, p. 785-789, 2000.

VENTURIERI, Giorgio Cristino. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão.** Embrapa Amazônia Oriental, 2004.

Publicado em 26/11/2019.