

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

AMANDA TRISTÃO SANTINI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS  
PRODUZIDA POR *Melipona rufiventris***

ALFENAS/MG

2019

**AMANDA TRISTÃO SANTINI**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS  
PRODUZIDA POR *Melipona rufiventris***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

ALFENAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Santini, Amanda Tristão

S235c      Caracterização química e atividades biológicas da geoprópolis produzida  
por *Melipona rufiventris* -- Alfenas/MG, 2019.

76 f. : il. --

Orientador: Masaharu Ikegaki.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal  
de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Compostos Fenólicos. 2. Anti-Infeciosos. 3. Anti-Inflamatórios. 4.  
Abelhas. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD-638.16



AMANDA TRISTÃO SANTINI

“CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA GEOPRÓPOLIS  
PRODUZIDA POR *Melipona rufiventris*”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
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: 16 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Masaharu Ikegaki

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar  
Instituição: USP

Assinatura: Severino Matias de Alencar

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Pedro Luiz Rosalen

Dedico este trabalho à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Masaharu Ikegaki por todas as vezes que, com muita calma e paciência, me orientou e aconselhou, não medindo esforços para que este trabalho se concretizasse. Muito obrigada!

Aos meus pais, Paulo e Rosilda, e aos meus irmãos, Paula e Arthur, por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditei e estarem ao meu lado durante toda essa jornada, me apoiando e dando todo o auxílio necessário para que esse sonho se realizasse. Muito obrigada! Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu amigo Giovane José Leite por ter me ajudado em um momento tão delicado do trabalho, abrindo as portas do seu meliponário para que conseguíssemos coletar amostras sempre que necessário.

Aos meus amigos e colaboradores, a Msc. Rayra Annara, a Técnica Administrativa Dra. Patrícia Lunardelli, ao Técnico Administrativo Dr. Gustavo Silveira e ao doutorando Omar Cabrezas Gómez, que me auxiliaram nas etapas de análises químicas e atividade antimicrobiana do extrato. Muito obrigada por todos os conselhos e conversas durante esse tempo, a amizade de vocês foi de extrema importância para que eu conseguisse chegar até aqui.

Agradeço aos professores da UNIFAL-MG, em especial à Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias, Profa. Dra. Raquel Maria Lima Lemes, Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz e Profa. Dra. Marisa Ionta que disponibilizaram recursos laboratoriais e intelectuais durante a pesquisa e me permitiram concluir os ensaios.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e à doutoranda Josy Goldoni Lazarini por me receberem calorosamente na Faculdade de Odontologia de Piracicaba para a realização dos ensaios de atividade anti-inflamatória.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar e ao doutorando Daniel Vieira de Moraes por colaborar com as análises químicas e de atividade antioxidante desenvolvidas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Às minhas professoras do IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho, Profa. Dra. Ingridy Simone Ribeiro e Profa. Dra. Bianca Sarzi de Souza por me iniciarem na vida acadêmica e iluminarem meu caminho durante o ensino médio e a graduação. Obrigada por todo o carinho e zelo que sempre tiveram comigo, por cada conselho e orientação que me guiaram nessa trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas por todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro – Código de Financiamento 001.

“Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

(Albert Einstein).



## RESUMO

Os produtos naturais são utilizados pelo homem na cura e prevenção de doenças desde tempos imemoriais. Dentre os produtos naturais mais utilizados no mundo podemos citar a geoprópolis que é caracterizada por substâncias resinosas produzidas em qualquer época do ano por abelhas nativas sem ferrão a partir de uma mistura de materiais coletados de várias partes das plantas às quais esses invertebrados adicionam ceras, pólen e solo. Apesar das propriedades farmacológicas desse produto serem conhecidas desde os tempos remotos, os estudos disponíveis na literatura ainda são escassos. As abelhas nativas sem ferrão são de grande importância na manutenção de ecossistemas e fonte de renda para comunidades locais de meliponicultores. Devido à escassez de pesquisas existentes e divulgadas com a geoprópolis produzida por *Melipona rufiventris*, este trabalho justifica-se pela necessidade em se avaliar a composição química e as propriedades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória desse produto, a fim de elucidar possíveis usos futuros para o produto. Além disso, trabalhos relacionados à bioprospecção de produtos meliponícolas fortalecem a meliponicultura e manutenção das espécies de abelhas nativas. Para a avaliação da composição química e atividades biológicas da geoprópolis, a amostra foi coletada na região de Cabo Verde-MG no Meliponário Leite, e produziu-se o extrato etanólico da mesma. Foram realizadas análises químicas para investigar a composição dos extratos, empregando espectrofotometria e cromatografia em camada delgada, além da determinação quantitativa dos compostos fenólicos e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR). Para a determinação das atividades biológicas, a amostra foi submetida ao teste de toxicidade sistêmica com o modelo de *Galleria mellonella* para se avaliar as concentrações seguras a se utilizar. Posteriormente foram realizados ensaios *in vitro* para a determinação das atividades antimicrobiana e sinérgica, avaliando-se as concentrações inibitórias mínimas, concentrações microbicidas mínimas e a interação entre o extrato e o antimicrobiano comercial; antioxidante pelos métodos do sequestro de radicais livres DPPH e superóxido, bem como capacidade de absorção do radical peroxil; viabilidade celular determinada por MTS; e anti-inflamatória. Os resultados apontam a possível presença de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, e terpenos na amostra. Já a análise por CLAE-FR mostra que o extrato apresenta composição complexa, porém não foi possível identificar com exatidão as principais substâncias químicas presentes no mesmo. O teste de atividade antimicrobiana mostrou que o extrato apresenta uma maior atividade contra bactérias gram-positivas, apresentando também uma atividade considerável contra bactérias multirresistentes isoladas de feridas complexas. O EEGP apresentou também atividade sinérgica em conjunto com os antimicrobianos comerciais amoxicilina e sulfametoxazol + trimetoprima. Para as análises de atividade anti-inflamatória, o extrato inibiu a ativação de NF- $\kappa$ B e a liberação de TNF- $\alpha$  em concentrações seguras. Apesar dessas atividades biológicas, o EEGP não apresentou atividade antiproliferativa pelo método do MTS. Ainda são necessárias análises mais refinadas para esclarecer a composição química do extrato, mas conclui-se que o mesmo apresenta compostos fenólicos e terpenos que podem ser moléculas responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Atividade antimicrobiana. Atividade anti-inflamatória. Abelhas sem ferrão.

## ABSTRACT

Natural products are used by humans in cure and to prevent diseases since immemorial times. Among the natural products most used in the world, we can mention geopropolis that is characterized as resinous substances produced at any time of the year by Brazilian native bees from a mix of materials collected from various parts of the plants which they add wax, pollen and soil. Although the pharmacological properties of this product have been known since ancient times, studies available in the literature are still scarce. Native stingless bees are of great importance in the maintenance of ecosystems and source of income for local communities of stingless beekeepers. Due to the scarcity of existing and published researches with the geopropolis produced by *Melipona rufiventris*, this work is justified by the need to evaluate the chemical profile and the antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties of this product in order to elucidate possible future uses for the product. Furthermore, projects related to the bioprospecting of bees' products can reinforce the meliponiculture and maintenance of native bees. For the evaluation of the chemical composition and biological activities of the geopropolis, the sample was collected in the Cabo Verde-MG region and an ethanolic extract was produced. Chemical analysis were performed to explore the composition of the extract, using spectrophotometry and thin layer chromatography, the quantitative determination of phenolic compounds a chromatographic profile by HPLC. To determine the biological activities, the sample was submitted tested in a *Galleria mellonella* model to evaluate its systemic toxicity. Subsequently, in vitro assays were performed to determine the antimicrobial and synergic activities, evaluating the minimum inhibitory concentrations, minimum microbicidal concentrations and the interaction between the extract and the commercial antimicrobial; antioxidant by DPPH and superoxide free radical scavenging methods, as well as peroxy radical absorption capacity; cell viability determined by MTS; and anti-inflammatory. The results indicate the possible presence of phenolic compounds, including flavonoids and terpenes in the sample. The analysis by HPLC shows that the extract has a complex composition, but it was not possible to accurately identify the main chemicals present in it. The antimicrobial activity test showed that the extract has a higher activity against Gram-positive bacteria, as well as a considerable activity against multiresistant bacteria isolated from complex wounds. The EEGP also showed synergistic activity in conjunction with the commercial antimicrobials amoxicillin and sulfamethoxazole + trimethoprim. For analyzes of anti-inflammatory activity, the extract inhibited NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  release at safe concentrations. Despite these biological activities, EEGP showed no antiproliferative activity by MTS method. More refined analyzes are still needed to clarify the chemical composition of the extract, but it is concluded that it has phenolic and terpene compounds that may be molecules responsible for the biological activities.

Keywords: Phenolic compounds. Antimicrobial activity. Anti-inflammatory activity. Stingless bees.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Abelhas sem ferrão da espécie *Melipona rufiventris*. A imagem A é de uma operária e a imagem B é um macho da espécie. ....22
- Figura 2.** Amostra de geoprópolis de *M. rufiventris* coletada em Cabo Verde/MG. ...25
- Figura 3.** Estrutura básica de um flavonoide. ....30
- Figura 4.** Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com o extrato etanólico da geoprópolis da abelha *M. rufiventris* associado ao antimicrobiano comercial amoxicila e ao microrganismo *S. aureus* ATCC 6538. ....42
- Figura 5.** Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com o extrato etanólico de geoprópolis da abelha *M. rufiventris* associado ao antimicrobiano comercial Sulfametoxazol + Trimetoprima e ao microrganismo *S. aureus* PFD11. ...42
- Figura 6.** Espectro de absorção da região UV do EEGP de *M. rufiventris*. ....49
- Figura 7.** Cromatografia em camada delgada do extrato etanólico de geoprópolis produzida por *M. rufiventris*. ....51
- Figura 8.** Cromatograma do extrato etanólico da geoprópolis produzida por *M. rufiventris*. ....54
- Figura 9.** Porcentagem da viabilidade celular em macrófagos RAW 264,7 (*in vitro*). ....60
- Figura 10.** Efeito do EEGP de *M. rufiventris* na ativação do NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264,7. ....61
- Figura 11.** Efeito do EEGP de *M. rufiventris* na liberação da citocina TNF- $\alpha$  por macrófagos. ....62
- Figura 12.** Toxicidade sistêmica do EEGP em modelo de larvas de *G. mellonella*. .63
- Figura 13.** Viabilidade celular do EEGP realizada pelo teste de MTS. ....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identificação e perfil de resistência das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de feridas complexas. ....	40
<b>Tabela 2</b> - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do EEGP produzido por <i>M. rufiventris</i> . ....	52
<b>Tabela 3</b> - Atividade antimicrobiana apresentada pelo EEGP de <i>M. rufiventris</i> contra diferentes microrganismos. ....	55
<b>Tabela 4</b> - Resultados do teste de <i>checkerboard</i> apresentados pelo EEGP de <i>M. rufiventris</i> em combinação com os antimicrobianos amoxicilina e sulfametoxazol + trimetoprima. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH - Dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidino-propano)

ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA – Análise de Variância

AS – Anisaldeído sulfúrico

ATCC - *American Type Culture Collection*

AUC – Área sob a curva (do inglês *Area Under Curve*)

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDC – *Centers for Disease Control*

CIF – Concentração inibitória fracionária

CIM - Concentração inibitória mínima

CIM<sub>AM</sub> – Concentração inibitória mínima da amostra

CIM<sub>ANT</sub> – Concentração inibitória mínima do antibiótico

CLAE-FR – Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMM – Concentração microbicida mínima

CTRL - Controle

DAD – Detector de arranjo de diodos

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EEGP – Extrato etanólico de geoprópolis

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ESI – *Electrospray Ionization*

FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High performance liquid chromatography*)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (do inglês *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*)

MS – Espectrometria de massas (do inglês *Mass spectrometry*)

MTS - [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

N.D – Não detectada

NF-kB – Fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)

ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigênio (do inglês *Oxygen radical absorbance capacity*)

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SFB – Soro fetal bovino

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)

TR – Tempo de retenção

UFC - Unidade formadora de colônia

UV – Ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	18
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	18
<b>4</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>4.1</b>	<b>Produtos Naturais</b> .....	19
<b>4.2</b>	<b>Abelhas Sem Ferrão</b> .....	20
<b>4.3</b>	<b>Geoprópolis e Própolis</b> .....	23
<b>4.4</b>	<b>Composição Química</b> .....	24
<b>4.5</b>	<b>Principais Classes de Compostos Identificadas em Geoprópolis</b> ..	26
4.5.1	Compostos Fenólicos: Ácidos Fenólicos.....	26
4.5.2	Compostos Fenólicos: Flavonoides.....	29
4.5.3	Terpenos.....	30
<b>4.6</b>	<b>Atividades Biológicas</b> .....	30
4.6.1	Atividade Antimicrobiana.....	31
4.6.2	Atividade Antioxidante.....	32
4.6.3	Atividade Anti-Inflamatória.....	34
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>5.1</b>	<b>Coleta da Amostra</b> .....	36
<b>5.2</b>	<b>Obtenção do extrato etanólico concentrado da geoprópolis</b> .....	36
<b>5.3</b>	<b>Análises químicas do EEGP</b> .....	36
5.3.1	Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	36
5.3.2	Cromatografia em camada delgada.....	37
5.3.3	Determinação quantitativa de compostos fenólicos.....	37
<b>5.4</b>	<b>Determinação das atividades biológicas</b> .....	38
5.4.1	Toxicidade aguda in vivo em modelo de <i>Galleria mellonella</i> .....	38
5.4.2	Atividade antimicrobiana.....	38
5.4.2.1	<i>Determinação da CIM</i> .....	39
5.4.2.2	<i>Determinação da CMM</i> .....	41
5.4.2.3	<i>Atividade Sinérgica</i> .....	41
5.4.3	Teste de viabilidade celular.....	43

5.4.3.1	Viabilidade celular determinada por MTS.....	43
5.4.4	Atividade antioxidante.....	44
5.4.4.1	Atividade antioxidante pela desativação do radical livre DPPH.....	44
5.4.4.2	Capacidade de desativação do radical peroxila.....	44
5.4.4.3	Desativação do radical superóxido.....	45
5.4.5	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> .....	45
5.4.5.1	Cultura celular.....	45
5.4.5.2	Redução do NF-Kb.....	46
5.4.5.3	Determinação de TNF- $\alpha$ .....	47
5.5	<b>Análise Estatística.....</b>	47
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	48
6.1	<b>Caracterização química e atividade antioxidante do EEGP.....</b>	48
6.1.1	Espectrofotometria da luz UV.....	48
6.1.2	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	49
6.1.3	Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	51
6.1.4	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.....	54
6.2	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	55
6.2.1	Atividade sinérgica.....	58
6.3	<b>Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>.....</b>	60
6.4	<b>Toxicidade aguda <i>in vivo</i> em modelo de <i>G. mellonella</i>.....</b>	63
6.5	<b>Teste de viabilidade celular.....</b>	64
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	66
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	67



## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade utiliza os produtos naturais na busca por alívio e cura de doenças desde tempos remotos. As contribuições dos diferentes grupos étnicos ajudaram no desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais, contribuindo com o avanço no conhecimento íntimo entre as estruturas químicas de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/plantas (CHEN; KOPS; KIRCHMAIR, 2017). O Brasil é um país com grande potencial para a pesquisa de novos compostos de origem natural graças ao seu extenso território e biodiversidade (VALLI et al., 2013).

Dentre os principais produtos naturais utilizados pelo homem, destaca-se a própolis. Própolis é o nome genérico de substâncias resinosas produzidas em qualquer época do ano por abelhas a partir de uma mistura de substâncias coletadas de várias partes das plantas às quais esses invertebrados adicionam ceras e pólen, sendo utilizadas para preencher orifícios, proteger a entrada da colmeia contra agentes invasores e na reparação dos favos de mel. Apresenta composição química complexa e diversificada, dependente da fonte vegetal visitada pela abelha e época de coleta da resina. Possui propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, hepatoprotetiva, gastroprotetiva, anestésica, imunoestimulatória, anticancerígena, anti-inflamatória e antimutagênica (BANKOVA et al., 1998, apud SALGUEIRO; CASTRO, 2016; FRANCHIN et al., 2013; SZLISZKA et al., 2013).

No Brasil, além das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), são também encontradas as abelhas nativas sem ferrão. Os insetos da tribo Meliponinae, que conta com mais de 200 espécies conhecidas no Brasil, produzem outros tipos de própolis conhecidas também como geoprópolis. Diferentemente da própolis, para a elaboração da geoprópolis, além do material vegetal, cera e pólen, essas abelhas adicionam terra ou barro à sua composição, e esta é uma característica marcante deste produto (ARAUJO, 2013; FRANCHIN et al., 2013).

Estima-se que um terço da alimentação humana dependa direta ou indiretamente da polinização realizada por abelhas. Os meliponíneos constituem um grupo ecologicamente importante de abelhas pois atuam como polinizadores de plantas nativas das regiões tropicais, temperadas e subtropicais. Com a destruição da flora nativa, a redução de substrato para nidificação, a coleta predatória de ninhos e a

introdução de espécies exóticas, essas abelhas vêm sendo dizimadas, com estimativas de que, no Brasil, aproximadamente 100 espécies de meliponíneos apresentem riscos potenciais de extinção. Dentre as espécies da tribo Meliponinae, a *Melipona rufiventris*, conhecida popularmente como urucu-amarela, já foi considerada uma espécie em risco de extinção e cuja bibliografia ainda é escassa. Desta forma, o interesse pela meliponicultura, que inclui o cultivo e a exploração racional dessas abelhas, pode contribuir para a preservação de espécies vegetais, além de agregar valor aos produtos meliponícolas, como o mel, a geoprópolis, a própolis, a cera e o pólen (SILVA; LIMA; PAZ, 2012; TOBERGTE; CURTIS, 2013).

## 2 JUSTIFICATIVA

As abelhas nativas sem ferrão são as principais responsáveis pela polinização de plantas nativas das regiões tropicais, temperadas e subtropicais. As ações antrópicas que acarretam na destruição da biodiversidade nativa, culminando na consequente redução de ninhos e diminuição da polinização, dificulta a restauração, recuperação e manutenção das florestas. Dessa forma, a meliponicultura – cultivo de abelhas sem ferrão – surge como uma alternativa de uso sustentável e manutenção das espécies de meliponíneos, por ser caracterizada como uma atividade de benefício mútuo para o ambiente e as comunidades que a praticam. Essa prática além de contribuir para a manutenção de ecossistemas, tem um papel socioeconômico importante ao contribuir para a geração de renda em comunidades de meliponicultores e fortalecer os costumes locais. Além disso, a meliponicultura auxilia a agricultura ao manter vivos os polinizadores naturais daquele ambiente. Sendo assim, projetos envolvendo a bioprospecção de produtos meliponícolas visam identificar novas moléculas com atividades biológicas e potencial terapêutico que podem agregar valores a esses produtos, despertando um maior interesse no cultivo e manutenção desses insetos.

Trabalhos com a geoprópolis produzida por diferentes espécies de meliponíneos têm demonstrado o potencial biológico dessas substâncias, que diferem dependendo da espécie e local onde o produto é elaborado. Neste contexto, o presente trabalho justifica-se pela necessidade em se caracterizar quimicamente estes extratos etanólicos de geoprópolis produzida por *Melipona rufiventris* no município de Cabo Verde – MG e verificar as atividades biológicas dessa geoprópolis, já que é uma espécie de abelha sem ferrão pouco estudada e cuja literatura é escassa.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil químico e avaliar as atividades biológicas do extrato etanólico de geoprópolis produzida por *Melipona rufiventris*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho estão listados a seguir:

- a) analisar o perfil químico do extrato etanólico de geoprópolis por meio de técnicas cromatográficas;
- b) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato contra diferentes microrganismos;
- c) avaliar a atividade sinérgica do extrato quando combinado com antimicrobianos comerciais;
- d) analisar a atividade antioxidante do extrato através da desativação de radicais livres;
- e) avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos;
- f) avaliar a atividade antiproliferativa contra células cancerígenas.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Produtos Naturais

O uso de produtos naturais como medicinais tem sido descrito ao longo da história na forma de medicina popular, remédios, poções e óleos. A humanidade utiliza os produtos naturais na busca por alívio e cura de doenças desde tempos imemoriais. Talvez a ingestão de ervas e folhas tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. O vasto conhecimento sobre a natureza pelos povos primitivos pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. As contribuições dos diferentes grupos étnicos ajudaram no desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais, contribuindo com o avanço no conhecimento íntimo entre as estruturas químicas de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/plantas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

As primeiras descrições sobre produtos naturais com potencial medicinal feitas pelo homem foram registradas em tábuas de argila em escrita cuneiforme da Mesopotâmia (2600 a.C) que documentou o uso de óleos de *Cupressus sempervirens* e *Commiphora* para o tratamento de tosse, febre e inflamações. Esses óleos são usados também nos dias atuais com as mesmas finalidades. O Papiro de Ebers (2900 a. C.) é um registro farmacêutico que documenta mais de 700 medicamentos à base de plantas. A Matéria Médica Chinesa (1100 a.C.) reúne registros de usos de produtos naturais. Os gregos Dioscorides e Thofrastus (100 d.C. e 300 a. C.) registraram o uso, coleção e armazenamento de ervas medicinais (BERNARDINI et al., 2018; CRAGG; NEWMAN, 2005, apud DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Os produtos naturais possibilitaram à indústria farmacêutica desenhar drogas mais eficazes contra várias enfermidades, além de serem utilizados como matéria-prima na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico. Drogas como ácido acetilsalicílico (Aspirina), derivada da salicina (isolada de *Salix alba* L.), o alcaloide morfina isolado de *Papaverum sonniferum* L. e a penicilina produzida por *Penicillium notatum* são alguns exemplos de moléculas de origem natural que foram usadas para a produção sintética de medicamentos (BERNARDINI et al., 2018).

A pesquisa nesta área no Brasil é uma das mais tradicionais para a química e biologia, devido a fatores históricos e à grande biodiversidade do país. O país possui

uma biodiversidade extremamente rica, abrangendo cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Essa grande variedade de espécies tem valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, inclusive no desenvolvimento de novos medicamentos. O número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais tem um impacto grande no cenário econômico mundial. Estima-se que 64% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais (VALLI et al., 2013).

#### **4.2 Abelhas sem Ferrão**

Os insetos são considerados uns dos mais diversos e bem-sucedidos animais do planeta, ocorrendo em praticamente todos os tipos de ambientes. A Ordem Hymenoptera, que reúne as formigas, vespas e abelhas, é considerada a mais útil de todas as ordens de insetos do ponto de vista humano haja vista a sua capacidade de geração de renda e extrema importância para a conservação ambiental. Dentre os insetos da Ordem Hymenoptera, as abelhas são o grupo de maior destaque por sua grande diversidade. Estima-se que cerca de 3000 espécies diferentes de abelhas ocorram no Brasil (OLIVEIRA et al., 2013).

As abelhas nativas sem ferrão são mais comuns em áreas tropicais; pertencem à família Apidae e subfamília Meliponinae, que é subdividida em duas tribos: Meliponini e Trigonini. Essas abelhas apresentam ferrão atrofiado (vestigial), porém possuem mecanismos de defesa variados como enrolar-se nos cabelos e pelos, beliscar a pele do agressor ou invasor com as mandíbulas e depositar resinas vegetais ou substâncias cáusticas sobre os pelos. Algumas espécies procuram construir seus ninhos em locais de difícil acesso ou próximo a ninhos de abelhas mais ofensivas, obtendo assim a proteção necessária para a sua colmeia (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013).

As abelhas do gênero *Melipona* são pertencentes a tribo Meliponini e apresentam cerca de 55 espécies, das quais 36 podem ser encontradas no Brasil em todo o território nacional, podendo ocorrer variação de espécies em cada região (SILVA; LIMA; PAZ, 2012). São abelhas médias a grandes (7 – 15 mm) e caracterizam-se por construírem a entrada dos ninhos em uma estrutura crateriforme e raiada feita de geoprópolis. A espécie *Melipona rufiventris* Lepelletier 1836,

conhecida popularmente como uruçú-amarela ou tujuba, típica de cerrado, ocorre principalmente no Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Goiás. As populações de *M. rufiventris* encontradas no sudeste brasileiro (desde a Bahia até Santa Catarina) foram consideradas durante muitos anos como pertencentes a uma única espécie. Porém, variações morfológicas foram relatadas em relação ao padrão de coloração das cerdas corbiculares e tíbias para essa espécie entre as abelhas existentes no cerrado e as abelhas existentes em regiões de mata atlântica, o suficiente para dividi-las em *M. rufiventris* (encontrada no cerrado) e *M. mondury* (encontrada na Mata Atlântica) (MELO, 2003, apud LOPES, 2008).

*M. rufiventris* (Figura 1) é uma espécie de abelha social, que vive em colônias grandes. São pouco agressivas e seu principal comportamento defensivo é beliscar a pele. Na natureza os ninhos são encontrados em ocos de árvores e suas entradas são localizadas no centro de raias convergentes de barro que permite que apenas uma abelha entre ou saia de cada vez. Essa espécie possui corpo robusto recoberto de pelos amarelados (NOGUEIRA-NETO, 1997). É uma espécie reconhecida como ameaçada de extinção porque suas áreas naturais de distribuição vêm sendo devastadas por ações antrópicas (ECOIA, 2017).



Figura 1 - Abelhas sem ferrão da espécie *Melipona rufiventris*.

Fonte: Sylvia Maria Matsuda – Laboratório de Abelhas. Disponível em: <[http://www.ib.usp.br/beesp/melipona\\_rufiventris.htm](http://www.ib.usp.br/beesp/melipona_rufiventris.htm)>. Acesso em janeiro de 2019.

Nota: A imagem A é de uma operária e a imagem B é um macho da espécie.

As abelhas sem ferrão apresentam hábitos de nidificação com grande complexidade estrutural. Os sítios de nidificação dos meliponíneos mais frequentes são cavidades pré-existentes, tais como ocos de árvores, fendas de rochas, cavidades nos solos e interiores de cupinzeiros. Os ninhos são constituídos de cera e cerume

(cera com adição de própolis), com algumas espécies de abelhas fazendo uso da geoprópolis para a impermeabilização do ninho (SILVA; LIMA; PAZ, 2012).

Os meliponíneos constituem um grupo ecologicamente importante de abelhas pois atuam como polinizadores de plantas nativas das regiões tropicais, temperadas e subtropicais. Além de serem importantes na reconstituição de florestas tropicais e conservação dos remanescentes, estas abelhas atuam também como bioindicadores. A eficiência desses animais no processo de polinização está relacionada à dependência dos recursos florais desde a fase larval até a fase adulta, utilizando o pólen como fonte proteica e o néctar como fonte energética. Por conta da destruição da flora nativa, a redução de substrato para nidificação, coleta predatória de ninhos e a introdução de espécies exóticas, essas abelhas vêm sendo dizimadas. O desmatamento reduz os ninhos e conseqüentemente a polinização, dificultando a restauração e recuperação das florestas. Além disso, o uso de pesticidas tem sido considerado como uma possível causa de redução da diversidade e da abundância dessas espécies de abelhas. Nesse contexto, a interesse pela meliponicultura, que é caracterizado pelo cultivo e exploração racional de meliponíneos, pode contribuir para a preservação de espécies vegetais, além de caracterizar-se como fonte de renda para comunidades de meliponicultores (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; SILVA; LIMA; PAZ, 2012).

A abelha *M. rufiventris* vem sofrido grande redução populacional e foi considerada como ameaçada de extinção no estado de Minas Gerais, sendo citada na edição de 1998 do “Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais” (CAMPOS, 1998, apud SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

A meliponicultura é uma prática bastante antiga, sendo desenvolvida pelos índios no Brasil, e praticada atualmente de forma tradicional por pequenos e médios produtores. Além do mel, outros produtos meliponícolas vêm ganhando cada vez mais valor, como a própolis, a geoprópolis e o pólen. Além disso, muito se tem discutido sobre os serviços ecológicos desses insetos na polinização para a produção de alimentos, o que traz mais vantagens ainda para os meliponicultores (SILVA; LIMA; PAZ, 2012). A Iniciativa Brasileira dos Polinizadores considera o uso das abelhas sem ferrão na polinização de culturas agrícolas como altamente rentável aos produtores, além da renda gerada na produção dos produtos meliponícolas (TOBERGTE; CURTIS, 2013).



### 4.3 Geoprópolis e Própolis

Própolis é uma mistura de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas coletada pelas abelhas *Apis mellifera* a partir de brotos, botões florais e exsudados de plantas, às quais as abelhas acrescentam ceras e pólen. É utilizada para preencher pequenos buracos, selar partes da colmeia com o intuito de protegê-la contra invasão de elementos estranhos, além de atuar como um agente termorregulador, evitando a exposição da colônia a correntes de ar, embalsamar insetos mortos e reparar favos de mel (GHISALBERTI, 1979, apud FREITAS; BARTH; LUZ, 2010; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

Diferentes povos no mundo utilizam esse material resinoso pelas suas propriedades antimicrobiana, antioxidante e antiprotozoária. O emprego deste produto já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito, a própolis era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos. Já os gregos utilizavam esse produto como um cicatrizante interno e externo, para redução de inchaços e alívio de dores no geral. Na modernidade, a própolis foi amplamente utilizada na Segunda Guerra Mundial em várias clínicas soviéticas e posteriormente no tratamento da tuberculose (MOREIRA; ROGÃO; ESTEVINHO, 2011; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Atualmente a própolis é um dos produtos naturais mais consumidos no mundo. É utilizada em cosméticos ou na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. É comumente usada em formulações farmacêuticas para infecções do trato respiratório superior, preparações dermatológicas para a cura de feridas, tratamento de queimaduras, acne, herpes simplex e genital, e neurodermatite. É ainda utilizada em enxaguantes bucais e cremes dentais para a prevenção de cáries, gengivites e estomatites. Além disso, é comercializada na forma de cápsulas, cremes, pastilhas e extrato para a garganta, pó e como constituinte de bebidas e comidas (WAGH, 2013).

O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial em termos de produção de própolis, exportando cerca de 75% desse produto. A produção é favorecida pelas condições climáticas, geográficas e pela ampla e variada vegetação (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). De acordo com o Market Research Future (2017), o

mercado de própolis crescerá a uma taxa de 3,5% (2015-2021), com crescimento da produção de 2,3 toneladas em 2015 para 2,9 toneladas em 2021.

A própolis brasileira é classificada em 12 grupos distintos baseados na sua composição físico-química: cinco grupos do sul do Brasil, um grupo do sudeste do Brasil e seis grupos do nordeste do Brasil (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). O 13º grupo, a própolis vermelha, foi descoberto posteriormente (ALENCAR et al., 2007).

As abelhas nativas sem ferrão, mais especificamente os meliponíneos, produzem a geoprópolis (Figura 2). Diferentemente da própolis, para a elaboração da geoprópolis, além do material vegetal, cera e pólen, essas abelhas adicionam terra ou barro à sua composição, e esta é uma característica marcante deste produto (ARAUJO, 2013; FRANCHIN et al., 2012, 2013). A geoprópolis é utilizada por essas abelhas para a construção de tubos de entrada, favos de cria, lamelas de invólucro e potes de alimento, além de proteger a colmeia (FERREIRA et al., 2017).

Devido às suas propriedades biológicas, a geoprópolis é usada na medicina popular para o tratamento de problemas digestivos, respiratórios, dermatológicos e visuais, principalmente por comunidades indígenas na região nordeste e Amazônica do Brasil (COELHO et al., 2015; FRANCHIN et al., 2012; SANCHES, 2013).



Figura 2. Amostra de geoprópolis de *M. rufiventris* coletada em Cabo Verde/MG.  
Fonte: autora.

#### 4.4 Composição Química

A composição química da própolis é bastante variada e complexa, estando relacionada com a ecologia de cada região visitada pelas abelhas e pelo período de coleta da resina, além da variabilidade genética das abelhas rainhas. A determinação da origem vegetal da própolis se dá pela análise de sua composição química comparada com a provável fonte vegetal e determinação da origem geográfica da

mesma (BANKOVA et al., 1998; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SFORCIN et al., 2000).

Por conta da variada composição química dos tipos de própolis existentes no mundo, torna-se difícil uma padronização dos critérios de caracterização e qualidade de própolis. Uma opção para o problema seria analisar isoladamente cada própolis e propor um padrão de qualidade, levando em consideração a planta de onde as abelhas coletaram a resina, as atividades biológicas e composição química de cada tipo de própolis (BANKOVA, 2005). No Brasil, a legislação de qualidade de própolis e extrato de própolis leva em consideração a composição química (incluindo o teor de flavonoides e outros compostos fenólicos do produto) e características sensoriais e físico-químicas de uma forma geral, não levando em consideração as particularidades dos tipos de própolis produzidos em cada região do país (BRASIL, 2001). O país ainda não possui uma legislação específica para geoprópolis e outros produtos meliponícolas.

Mais de 500 compostos já foram identificados na própolis ao longo dos anos nas diferentes regiões do planeta. Estes compostos englobam flavonoides, terpenos, fenólicos e seus ésteres, açúcares, hidrocarbonetos e elementos minerais. Estes compostos estão ainda relacionados as diferentes fontes vegetais de onde as resinas são coletadas como álamos, coníferas, pinheiros, bétulas e salgueiros (HUANG et al., 2014).

Nas geoprópolis já foram identificados compostos pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, terpenos, ácidos graxos, esteroides e saponinas. Tomás-Barberán e colaboradores (1993) analisaram a composição química de amostras de geoprópolis produzidas por *Friesiomellita varia*, *Melipona compressipes*, *Scaptotrigona depilis* e *Paratrigona anduzei* provenientes da Venezuela, evidenciando a presença de fenólicos caracterizados por benzofenonas polipreniladas. Já Abreu (2016) ao analisar extratos de geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* no estado do Maranhão, identificou 30 compostos das classes dos ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenos, açúcares e ácidos graxos, com predomínio de ácido gálico e quercetina em todos os extratos testados. Ao analisar o perfil químico de extrato etanólico de geoprópolis de *Trigona spinipes*, Freitas e colaboradores (2008) identificaram a presença de triterpenos cicloartanos, além de quercetina, sacuranetina, éter 7-metil canferol, tricetina e éter 7-metil aromadendrina.

Ainda, ao analisar o exsudato de *Eucalyptus citriodora*, os mesmos autores sugerem que esta planta pode ser a principal fonte vegetal visitada por estas abelhas no nordeste do Brasil.

Cada espécie de abelha sem ferrão produz sua própria própolis ou geoprópolis. Para a caracterização das amostras de geoprópolis, além de análises da consistência, odor, coloração e composição química, a análise do pólen constitui uma avaliação de grande importância. Em comparação à própolis produzida por abelhas africanizadas, o pólen encontrado na geoprópolis revela a vegetação regional característica, além de indicar que há uma maior variabilidade de plantas visitadas pelos meliponíneos (BARTH, 2004). Assim, Gostinski (2018) identificou espécies vegetais fornecedoras de pólen e néctar para as espécies *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata* na região da baixada maranhense e concluiu que, embora as espécies tenham hábitos generalistas para a captação de recursos, poucas espécies vegetais apresentaram frequência significativa.

## **4.5 Principais Classes de Compostos Identificadas em Geoprópolis**

### **4.5.1 Compostos Fenólicos: Ácidos Fenólicos**

Compostos fenólicos são substâncias orgânicas e aromáticas que possuem pelo menos um grupo hidroxila ligada diretamente a um anel aromático (BRAVO, 2009). Apesar de serem encontrados amplamente em vegetais e microrganismos, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese de fenólicos é feita utilizando-se o anel aromático de substâncias ingeridas na dieta. Já as plantas e microrganismos têm a capacidade de produzir diferentes tipos de compostos fenólicos por meio da síntese do anel benzênico (OLDONI, 2007).

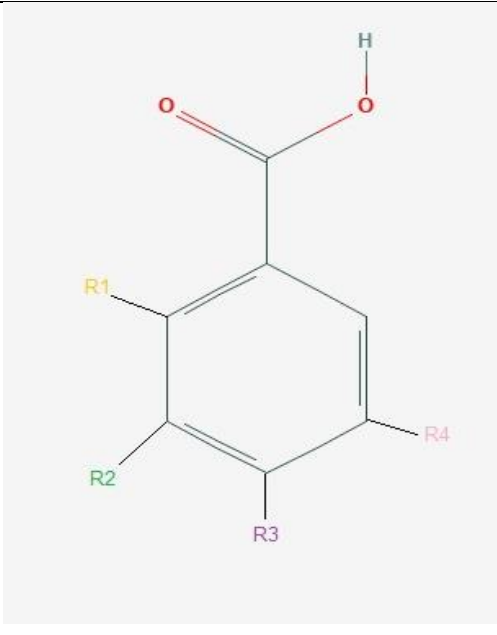
Entre os compostos fenólicos presentes na própolis pode-se destacar os ácidos fenólicos, já que a ingestão dos mesmos interfere em diversos processos fisiológicos, auxilia na absorção e na ação de vitaminas, atua nos processos de cicatrização, como antioxidantes, e apresentam atividade antimicrobiana (COELHO, 2013).

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias constituintes dos compostos fenólicos. Apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e

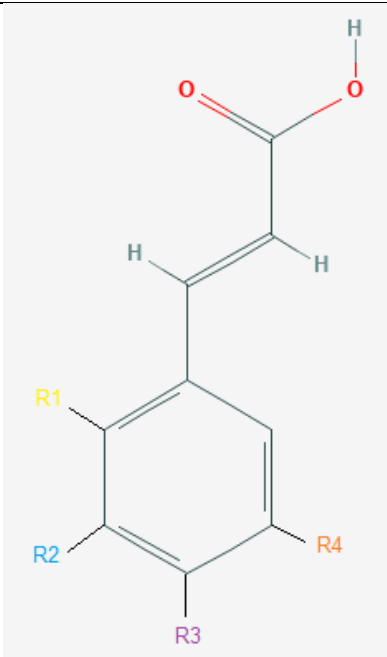
um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila, conferindo propriedades antioxidantes à estes compostos (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos apresentam um grupo funcional carboxila e são divididos em duas classes: os ácidos benzoicos (Quadro 1) e os ácidos cinâmicos (Quadro 2) (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Estes compostos consistem em um anel benzênico ligado a um grupo carboxílico (ácidos benzoicos) ou a um ácido propenoico (ácidos cinâmicos). Em muitos vegetais, os ácidos cinâmicos são encontrados na forma de derivados de ésteres que apresentam grande potencial antioxidante (OROIAN; ESCRICHE, 2015; SOARES, 2002).

Existem ainda as cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002).

Derivados do ácido benzoico	Substituintes
	R1: OH (ácido salicílico)
	R1, R4: OH (ácido gentísico)
	R3: OH (ácido p-hidroxibenzoico)
	R2, R3: OH (ácido protocatequínico)
	R2: OCH <sub>3</sub> ; R3: OH (ácido vanílico)
	R2, R3, R4: OH (ácido gálico)
	R2, R4: OCH <sub>3</sub> ; R3: OH (ácido siríngico)

Quadro 1 - Estrutura química do ácido benzoico. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/243>>. Acesso em 18 de dez. 2019.

Derivados do ácido cinâmico	Substituintes
	R1, R2, R3, R4: H (ácido cinâmico)
	R1: OH (ácido <i>o</i> -cumárico)
	R2: OH (ácido <i>m</i> -cumárico)
	R3: OH (ácido <i>p</i> -cumárico)
	R2, R3: OH (ácido cafeico)
	R2: OCH <sub>3</sub> ; R3: OH (ácido ferúlico)
	R2, R4: OCH <sub>3</sub> ; R3: OH (ácido sinápico)

Quadro 2 - Estrutura química do ácido cinâmico. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamic-acid#section=2D-Structure>>. Acesso em 18 de dez. 2019.

Dentre as propriedades biológicas já relatadas para os compostos fenólicos, é possível destacar a atividade antioxidante, apresentada principalmente pelo ácido clorogênico, pelos ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres. A atividade antioxidante destes compostos é geralmente determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula e também pela proximidade do grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$  com o grupo fenil. Quando mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (ÁSSIMOS, 2014).

A atividade antimicrobiana da própolis está relacionada aos fenilpropanoides, principalmente o ácido cinâmico, o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e seus derivados, que são encontrados em grande quantidade na própolis verde (HUANG et al., 2014).

São comumente relatados nas geoprópolis de diferentes abelhas sem ferrão compostos como ácido gálico, ácido elágico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, cinamoiloxi-mammeisina, ácido benzoico e ácido cinâmico (BONAMIGO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2017a, 2017b, 2017c; FRANCHIN et al., 2016).

#### 4.5.2 Compostos Fenólicos: Flavonoides

Os flavonoides correspondem a um grupo diversificado e amplamente distribuído na natureza, pertencente aos compostos fenólicos. Estruturalmente são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono, dispostos em uma configuração C6-C3-C6, como pode ser visto na Figura 3 (ÁSSIMOS, 2014; SOARES, 2002).

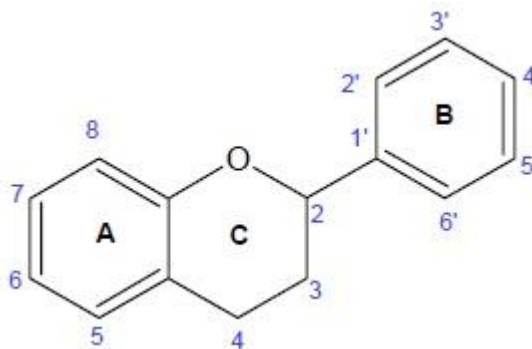


Figura 3 - Estrutura básica de um flavonoide.  
Fonte: Da Silva et al. (2015).

Grupos hidroxila, glicosil, oxigênio ou grupos metil podem estar ligados à estrutura básica do flavonoide. Dependendo do estado de oxidação do anel heterocíclico, os flavonoides podem ser separados em: flavonas, flavonóis, flavanonois e flavanonas, antocianidinas, isoflavonoides, auronas, neoflavonoides, biflavonoides, catequinas e seus precursores metabólicos (chalconas), agliconas, glicosiladas e derivados metilados (ÁSSIMOS, 2014).

Os flavonoides exercem importante papel na saúde humana, apresentando atividade antioxidante, antimicrobiana, antiprotzoários, anti-inflamatória e anticancerígena (ÁSSIMOS, 2014). Sua atividade antioxidante pode ser explicada pela atuação desses compostos na neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido, radical hidroxila ou radical peróxido, inibição das enzimas lipoxigenase, cicloxygenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, além da estimulação das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (DA SILVA et al., 2015).

Dentre os flavonoides já identificados em amostras de geoprópolis estão: aromadendrina, naringenina, metil-aromadendrina, metil-naringenina, di-O-metil-aromadendrina, O-metil-canferol, O-metil-quercetina, di-hidrocanferida, canferida,

canferol, hesperidina, miricetina, morina, luteolina, quercetina, apigenina e rutina (BONAMIGO et al., 2017; DE SOUZA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2017a, 2017c).

#### 4.5.3 Terpenos

Os terpenos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo caracterizados quimicamente como um hidrocarboneto insaturado por apresentarem uma dupla ligação carbono-carbono. Apresentam diferenças estruturais entre si, mas são estruturados por unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) ligadas entre si pela ordem “cabeça-a-cauda”. Podem ser classificados de acordo com a quantidade de isopreno na sua estrutura e sub-classificados em termo de ciclização da molécula. Possuem diversas funções químicas, entre as quais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos (FELIPE; BICAS, 2016).

Os compostos voláteis representam cerca de 10% dos constituintes da própolis, e são responsáveis pelo odor característico, contribuindo também para os efeitos farmacológicos do material (HUANG et al., 2014). Na geoprópolis, autores relatam a presença do ácido E/Z comunico, ácido agatálico, ácido cuprêssico, isocuprêssico e 15-acetoxi-cuprêssico (CARDOZO et al., 2015),  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina (BONAMIGO et al., 2017), cicloursano, cicloartenol e ácido urs-12-em-24-oico (BATISTA et al., 2016).

### 4.6 Atividades Biológicas

As atividades biológicas da própolis estão relacionadas à sua composição química e por isso variam de acordo com a época de coleta da resina, a vegetação presente na região e a variedade genética da abelha.

Dentre as propriedades biológicas das geoprópolis de espécies de abelhas sem ferrão, é possível citar: atividade antioxidante (BATISTA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2017b), antimicrobiana (DA CUNHA et al., 2013a; DOS SANTOS et al., 2017c), antiproliferativa (CINEGAGLIA et al., 2013; DA CUNHA et al., 2016a; DOS SANTOS et al., 2017c), anti-inflamatória (FRANCHIN et al., 2012, 2016), antiviral (COELHO et al., 2015), antibiofilme (DA CUNHA et al., 2013b), antinociceptiva (FRANCHIN et al., 2012), gastroprotetiva (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2015),



imunomodulatória (LIBERIO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016) e cicatrizante (SILVA et al., 2016b).

#### 4.6.1 Atividade Antimicrobiana

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou de causar morte de microrganismos. Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas). Já os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A descoberta dos antibióticos foi um marco na medicina, possibilitando o controle de várias doenças infecciosas. Porém, devido ao seu mau uso, a eficiência dos antibióticos já existentes está ameaçada, e há a possibilidade de pequenas injúrias se tornarem letais nos dias atuais (WHO, 2014).

A resistência microbiana pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta do microrganismo frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no ambiente, graças à alta capacidade de adaptação desses seres a diversos fatores, inclusive a exposição a agentes químicos potentes (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Atualmente, a questão da resistência microbiana representa um problema global de saúde pública. Mais de 70% dos microrganismos patogênicos apresentam resistência à maioria dos antimicrobianos disponíveis comercialmente, tornando as infecções bacterianas responsáveis pela morte de mais de 2 milhões de pessoas por ano em todo o mundo (BÉRDY, 2012).

Dessa forma, uma ampla diversidade de organismos tem sido explorada na busca de antibióticos naturais efetivos (BÉRDY, 2012). Para a própolis, a atividade antimicrobiana é uma das mais relatadas, já que a mesma é utilizada também pelas abelhas na proteção da colmeia contra microrganismos (FOKT et al., 2010).

Pesquisas mostram que uma das mais importantes propriedades da própolis é a antimicrobiana, especialmente contra bactérias. Muitos trabalhos demonstram que essa propriedade é mais efetiva contra bactérias Gram-positivas. Dentre as

explicações para a baixa atividade contra Gram-negativas, alguns autores sugerem que a presença de bombas de efluxo na membrana plasmática pode impedir a entrada ou expulsar os compostos da própolis do interior da célula; ainda, os constituintes da resina podem ser secretados pelas plantas de origem para a proteção da mesma apenas contra patógenos Gram-positivos (FOKT et al., 2010).

A atividade antibacteriana da própolis está comumente relacionada aos flavonoides galangina, pinocembrina e pinistrobina. Porém, Tomás-Barberán et al. (1993) analisaram amostras de própolis que continham apenas vestígios de flavonoides e apresentaram boa atividade antibacteriana. A complexa e variada composição química da própolis é responsável pela sua ação antimicrobiana e sinérgica. A própolis afeta a membrana plasmática dos microrganismos, inibe a motilidade bacteriana e atividade enzimática, exibe atividade bacteriostática e bactericida dependendo da concentração. Apresenta ainda ação múltipla contra fatores de virulência, principalmente em bactérias Gram-positivas, inibindo ainda formação de biofilmes (FOKT et al., 2010).

Estudos demonstram que as geoprópolis produzidas por cada espécie de abelha sem ferrão também apresentam atividade antimicrobiana promissora. A abelha *Melipona scutellaris* apresenta atividade contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, inclusive MRSA, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces naeslundii* (DA CUNHA et al., 2013b). Já amostras produzidas por *Melipona fasciculata* mostraram-se eficazes no combate a *S. mutans*, e amostras de geoprópolis de *Melipona mondury* demonstrou ação contra *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ARAUJO, 2013; DA CUNHA et al., 2013a; DOS SANTOS et al., 2017a). Já as geoprópolis produzidas por *Melipona quadrifasciata*, *Melipona marginata*, *Melipona fava orlinge* e *Melipona compressipes* mostraram-se eficazes na inibição de *S. aureus* (KUJUMGIEV et al., 1999).

#### 4.6.2 Atividade Antioxidante

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração comparada a substância oxidável de interesse. Para a situação *in vivo*, o conceito de antioxidante inclui enzimas antioxidantes, ligações de ferro e

proteínas transportadores e outros compostos que afetam o sinal de transdução e expressão gênica (HALLIWELL, 2012).

Os antioxidantes têm a capacidade de inibir a oxidação de diversos substratos por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais livres importantes na etapa de propagação, doando átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

De acordo com Magder (2006), as espécies reativas incluem radicais livres, bem como outras moléculas que podem participar de reações de oxidação-redução, mas não são radicais verdadeiros pois não apresentam elétrons desemparelhados, como ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Nos organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos constantemente durante o funcionamento normal da célula geralmente sob a forma de espécies reativas de oxigênio (EROs). Há situações em que o equilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes pode ser quebrado por uma produção excessiva de EROs ou pela deficiência de defesas antioxidantes na célula. Esta situação é denominada de estresse oxidativo e pode levar a geração de diversos danos aos sistemas biológicos. Frente ao estresse oxidativo ocorrem os seguintes processos: adaptação por aumento da resposta antioxidante; dano tecidual por agressão a lipídeos, carboidratos e proteínas; morte celular por necrose ou apoptose (HALLIWELL, 2012).

Os mecanismos pelos quais os antioxidantes exercem seus efeitos podem variar dependendo da característica de cada alimento, inclusive da presença de compostos minoritários. Eles podem agir por diferentes mecanismos: a) captação das espécies que iniciam a peroxidação; b) quelatação de metais, impossibilitando que os mesmos gerem espécies reativas ou decomponham peróxidos; c) eliminando O<sub>2</sub><sup>-</sup> e prevenindo a formação de peróxidos; d) quebrando a reação em cadeia oxidativa; e) reduzindo concentrações localizadas de O<sub>2</sub> (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

Para Coelho (2013) a própolis possui uma elevada atividade antioxidante já que ela apresenta elevada quantidade de compostos fenólicos, o que ajuda no combate aos radicais livres. Da mesma forma, vários estudos detectaram atividade antioxidante relevante para as geoprópolis de diferentes espécies (DOS SANTOS et al., 2017a, 2017c; FERREIRA et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

#### 4.6.3 Atividade Anti-inflamatória

Inflamação é uma resposta protetiva normal induzida por injúrias teciduais ou infecções cuja função é combater antígenos e remover células mortas. Na resposta inflamatória há um aumento na permeabilidade das células endoteliais e influxo dos leucócitos sanguíneos para o interstício, liberação de citocinas, indução na atividade de várias enzimas e expressão de moléculas de adesão celular (MIGUEL, 2010). Se por um lado a inflamação ajuda o organismo, por outro a inflamação descontrolada pode ser prejudicial, causando condições patológicas como distúrbios auto inflamatórios, doenças degenerativas e câncer. A cura para doenças inflamatórias é difícil e vem sendo um grande desafio para pesquisadores (DAR et al., 2016).

Atualmente os estudos na busca por drogas com potencial anti-inflamatório tem crescido principalmente para o controle de condições crônicas. Dessa forma, alguns compostos já foram descritos em própolis com potencial anti-inflamatório. A apigenina foi identificada em própolis de álamo e é capaz de diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos THP-1 enquanto inibem ERK1/2 e a ativação de NF-kB. Já a pinocembrina foi identificada na mesma própolis e apresenta atividade inibitória na síntese de citocinas em macrófagos (incluindo TNF- $\alpha$ ) e atenuou uma injúria pulmonar ao diminuir o influxo de neutrófilos para o foco da inflamação. A artepilina C, composto comumente encontrado em própolis verde, aparenta inibir diferentes vias dos processos inflamatórios, além de bloquear a ativação de NF-kB. A própolis vermelha apresenta diversos compostos como formononetina, vesitol e neovesitol, isoliquitigenina (ISQ) e daidzeina que apresentam ação anti-inflamatória tanto em modelos agudos quanto crônicos (FRANCHIN et al., 2018; SILVA et al., 2016a; SOROMOU et al., 2012; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

A atividade anti-inflamatória vem sendo descrita para diferentes geoprópolis. No trabalho de Dos Santos et al. (2017a), a geoprópolis de *M. quadrifasciata* foi capaz de inibir a atividade da enzima hialuronidase dependendo da concentração utilizada. Dos Santos et al. (2017b) concluíram que a geoprópolis de *M. orbigny* também apresenta a capacidade de inibição da enzima hialuronidase. Já a geoprópolis de *M. scutellaris* é capaz de inibir a inflamação pela inibição da produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (FRANCHIN et al., 2012).

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Coleta da amostra**

A amostra de geoprópolis produzida por *Melipona rufiventris* foi coletada no Meliponário Leite, sob as coordenadas geográficas 21°25'14.9"S 46°25'17.7"W, em agosto de 2018. O projeto está cadastrado na plataforma SisGen sob o número A5F3CCB (Anexo), para a regularização junto ao MMA (Ministério do Meio Ambiente) como atividade de acesso ao patrimônio genético.

A coleta da amostra foi realizada raspando-se a geoprópolis produzida nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colmeia. Após a raspagem, o material foi devidamente embalado, etiquetado e armazenado em freezer (-8°C) até o preparo dos extratos e ensaios químicos e biológicos.

### **5.2 Obtenção do extrato etanólico concentrado da geoprópolis**

Para a obtenção do extrato etanólico de geoprópolis (EEGP) adaptou-se a metodologia descrita por Ikegaki (2001). A amostra foi pulverizada com o auxílio de gral e pistilo e posteriormente peneirada, retirando-se eventuais impurezas como pedaços de madeira e insetos mortos. Foram pesados 60 g de amostra em um béquer e adicionados 420 mL de etanol absoluto. A suspensão foi aquecida em banho de água termostaticado a 70°C durante 30 minutos sob agitação constante. Após o aquecimento, a solução foi submetida à filtração a vácuo, obtendo-se o extrato etanólico de geoprópolis. Alíquotas de 500 µL foram separadas para a análise de cromatografia em camada delgada. Posteriormente, a solução foi concentrada em rotaevaporador a 40°C para a obtenção do extrato concentrado de geoprópolis.

### **5.3 Análises químicas do EEGP**

#### **5.3.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível**

A solução etanólica da amostra preparada na concentração de 80 µg mL<sup>-1</sup> foi submetida à avaliação da absorção da luz UV-visível nos comprimentos de onda entre

200 a 800 nm (LIBRA S22 UV/VIS – Biochrom LKB) para a identificação dos seus principais compostos orgânicos e inorgânicos.

### 5.3.2 Cromatografia em camada delgada

Em placas cromatográficas de alumínio pré-revestidas com sílica gel 60 F254 (Macherev-Nagel GmbH & Co, Dueren, Alemanha) foram aplicadas alíquotas de 5  $\mu$ L do extrato. Os sistemas testados foram água e etanol (45:55), água e metanol (45:55) e, por fim, água e acetona (20:80) com uma gota de ácido acético. As placas foram reveladas com luz UV no comprimento de onda de 254 nm e posteriormente foram utilizados os reveladores químicos cloreto férrico, o anisaldeído sulfúrico, DPPH, vanilina e ácido fosfomolibdico.

### 5.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

A análise por CLAE em fase reversa foi realizada de acordo com o método descrito por Alencar (2002) e Park et al. (2004). Vinte microlitros do extrato na concentração de 1% foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 280 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5  $\mu$ m. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) solução de água e ácido acético (0,05%) e (B) metanol. Vazão da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>: o gradiente iniciou em 30% do solvente B, passando a 60% de B em 45 minutos, 75% de B aos 85 minutos, 90% de B aos 95 minutos, retomando novamente a 30% de B aos 105 minutos e finalizando a corrida em 115 minutos.

### 5.3.4 Determinação quantitativa de compostos fenólicos

A análise de compostos fenólicos totais do extrato foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1998), com modificações, utilizando ácido gálico como padrão. Foram preparados pontos da curva analítica do padrão ácido gálico em diferentes concentrações. A amostra foi solubilizada em metanol e posteriormente diluída em água (50:50)

partindo-se de uma concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Para o controle negativo, a amostra foi substituída pelo solvente metanol submetido às mesmas diluições. Para o branco será utilizado uma solução de metanol e água destilada. Em cada poço da microplaca incolor de 96 poços foram adicionados 20 µL da amostra, do padrão ou do controle, 100 µL da solução de Folin-Ciocalteu (diluído anteriormente em água 1:10) e, após 5 minutos, 75 µL de uma solução de carbonato de sódio a 7,5%. A placa ficou em repouso e ao abrigo da luz por 40 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 740 nm em espectrofotômetro Spectra Max – M3 (Molecular Devices). Os resultados dos teores de compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG), com base na curva de calibração de ácido gálico com concentrações que variaram de 20 a 120 µg mL<sup>-1</sup>.

#### **5.4 Determinação das atividades biológicas**

##### **5.4.1 Toxicidade aguda *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella***

O modelo de *G. mellonella* foi utilizado para determinar a toxicidade aguda do extrato de acordo com a metodologia descrita por Sardi et al. (2017). A análise foi realizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. As larvas foram criadas em BOD a 37°C até o seu uso. Larvas sem sinais de melanização foram selecionadas (0,2 – 0,3 g) aleatoriamente para cada grupo (n=8) e alíquotas de 10 µL do extrato ou veículo foram injetadas na hemocele de cada larva através da última pró-pata esquerda utilizando uma seringa de Hamilton (Hamilton, Reno, NV). Todas as larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram movimentos ao toque nos tempos de 8 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas. Foram escolhidas as doses de 32 mg kg<sup>-1</sup> de larva, 16 mg kg<sup>-1</sup> de larva, 4 mg kg<sup>-1</sup> de larva para este ensaio, sendo equivalentes às soluções de 800 µg mL<sup>-1</sup>, 400 µg mL<sup>-1</sup> e 100 µg mL<sup>-1</sup> de extrato usadas no teste de atividade antimicrobiana.

##### **5.4.2 Atividade antimicrobiana**

Para os testes de determinação da atividade antimicrobiana foram utilizados microrganismos cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e CDC (*Centers for Disease Control*) que foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Microbiologia Básica da Unifal-MG, além de isolados clínicos provenientes do “Projeto Feridas” (PFD) cedidos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica da Unifal-MG. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 5.4.2.1 Determinação da CIM

Conforme o protocolo M07-A11 desenvolvido pelo *Clinical Laboratories Standardization Institute* (CLSI, 2018) para bactérias e protocolo M27 (CLSI, 2017) para leveduras, com modificações, a concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada com o auxílio de microplacas de 96 poços pelo método de microdiluição em caldo.

Para a determinação da concentração inibitória mínima, o extrato foi testado nas concentrações de 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 25,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 12,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , preparado em etanol absoluto. Como controle positivo foram utilizados os antimicrobianos: Fluconazol (leveduras) nas concentrações de 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Amoxicilina (bactérias Gram-positivas) e Estreptomicina (bactérias Gram-negativas) nas concentrações de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,312  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,156  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,078  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para as cepas Gram-positivas isoladas de feridas multirresistentes, utilizou-se Sulfametoxazol + Trimetoprima nas concentrações de 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os experimentos foram realizados com cepas Gram-positivas provenientes de isolados clínicos de feridas complexas multirresistentes a antimicrobianos (Tabela 1) e cepas Gram-positivas padrão ATCC e CDC (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* CDC F4561, *Streptococcus mutans* ATCC 25175); cepas Gram-negativas padrão ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella typhimurium* ATCC 6017) e cepas de leveduras padrão



ATCC (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida parapsilosis* ATCC 2209).

Tabela 1 - Identificação e perfil de resistência das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de feridas complexas.

Identificação	Espécie	Resistência				
		Clindamicina	Eritromicina	Penicilina	Cefoxitina	Oxacilia
PFD 4	<i>S. epidermidis</i>	S	R	R	R	S
PFD11	<i>S. aureus</i>	R	R	R	R	R
PFD14	<i>S. aureus</i>	R	R	S	R	R
PFD18	<i>S. warneri</i>	R	R	R	R	R

Fonte: autora.

Nota: R – resistente. S – sensível.

Para as análises de CIM, em microplacas de 96 poços foram aplicados 160 µL de meio de cultura estéril (Mueller Hinton para bactérias; RPMI para leveduras), 20 µL de extrato nas concentrações citadas e 20 µL da suspensão microbiana em todos os poços das colunas de 1 a 6. Como controle de cor, foram adicionados 180 µL de meio de cultura e 20 µL de extrato na maior concentração testada nos poços das colunas 1 a 6 linha A. Para a avaliação do antimicrobiano foram aplicados 160 µL do meio de cultura e 20 µL do antimicrobiano nas concentrações citadas e 20 µL da suspensão microbiana em todos os poços das colunas 7 a 9. O controle negativo do solvente foi realizado substituindo-se o extrato por etanol absoluto na coluna 10. O controle do microrganismo foi realizado adicionando-se 180 µL do meio de cultura e 20 µL da suspensão microbiana nos poços da coluna 11. Já o controle de esterilidade do meio foi realizado adicionando-se apenas 200 µL do meio de cultura nos poços da coluna 12. A suspensão microbiana foi feita em solução salina a partir de cultura de 24 horas. A turbidez desta suspensão foi avaliada mensurando-se a suspensão em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660 nm, 75% de transmitância, correspondendo a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

As microplacas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. A leitura foi realizada a olho nu e posteriormente adicionando-se 20 µL de uma solução do indicador resazurina (Sigma Aldrich®) a 0,02% em cada poço da microplaca.

#### 5.4.2.2 Determinação da CMM

A partir dos resultados obtidos no experimento para determinação da CIM, as suspensões provenientes dos poços em que não houve crescimento microbiano foram utilizadas para a determinação da atividade microbicida. Desta forma, após visualização do resultado da CIM, 10 µL dessas suspensões foram inoculadas em placas de ágar (Mueller-Hinton para bactérias; Sabouraud para leveduras), em triplicata, e incubadas a 35°C por 24 horas. As concentrações microbicidas mínimas (CMM) foram consideradas como a menor concentração das amostras testadas que não permitiram crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

#### 5.4.2.3 Atividade sinérgica

A análise para determinar se o extrato produz efeito sinérgico quando combinado com o antimicrobiano amoxicilina ou sulfametoxazol + trimetoprima (utilizados na determinação da CIM) foi realizada adaptando-se o método de *checkerboard* descrito por White et al. (1996).

Após a determinação da CIM do EEGP e da CIM dos antibióticos para os microrganismos testes, foram realizadas diluições em série associando a amostra teste com o agente antimicrobiano e a suspensão microbiana. O ensaio foi realizado em triplicada, conforme esquema metodológico apresentado nas Figuras 4 e 5.

O efeito das combinações foi obtido a partir do cálculo da concentração inibitória fracionária (CIF) de cada extrato e do antimicrobiano nas concentrações utilizadas de acordo com os cálculos 1, 2 e 3 a seguir:

$$ICIF \text{ (índice da concentração inibitória fracionária)} = CIF_{AM} + CIF_{ANT} \text{ (Cálculo 1).}$$

$CIF_{AM}$  (concentração inibitória fracionária da amostra) = CIM da amostra com o antimicrobiano/CIM da amostra sozinha (Cálculo 2).

$CIF_{ANT}$  (concentração inibitória fracionária do antimicrobiano) = CIM do antimicrobiano com a amostra/CIM do antimicrobiano sozinha (Cálculo 3).

	Amostra + Antimicrobiano			Amostra + Antimicrobiano			Amostra + Antimicrobiano			CIM AM	CIM ANT	CTRL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
A	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	10	CTRL Etanol
B	400 0,312	400 0,312	400 0,312	400 0,156	400 0,156	400 0,156	400 0,078	400 0,078	400 0,078	800	5	CTRL Etanol
C	200 0,312	200 0,312	200 0,312	200 0,156	200 0,156	200 0,156	200 0,078	200 0,078	200 0,078	400	2,5	CTRL Meio
D	100 0,312	100 0,312	100 0,312	100 0,156	100 0,156	100 0,156	100 0,078	100 0,078	100 0,078	200	1,25	CTRL Meio
E	50 0,315	50 0,315	50 0,315	50 0,156	50 0,156	50 0,156	50 0,078	50 0,078	50 0,078	100	0,625	CTRL Meio
F	25 0,312	25 0,312	25 0,312	25 0,156	25 0,156	25 0,156	25 0,078	25 0,078	25 0,078	50	0,312	CTRL MO
G	12,5 0,312	12,5 0,312	12,5 0,312	12,5 0,156	12,5 0,156	12,5 0,156	12,5 0,078	12,5 0,078	12,5 0,078	25	0,156	CTRL MO
H	6,25 0,312	6,25 0,312	6,25 0,312	6,25 0,156	6,25 0,156	6,25 0,156	6,25 0,078	6,25 0,078	6,25 0,078	12,5	0,078	CTRL MO

Figura 4 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com o extrato etanólico da geoprópolis da abelha *M. rufiventris* associado ao antimicrobiano comercial amoxicila e ao microrganismo *S. aureus* ATCC 6538.

Fonte: autora.

Nota: CIM AM – concentração inibitória mínima da amostra. CIM ANT – concentração inibitória mínima do antimicrobiano. CTRL Cor – controle da cor do EEGP no meio de cultura. CTRL Etanol – controle de atividade do solvente. CTRL Meio – controle de esterilidade do meio de cultura. CTRL MO – controle de crescimento do microrganismo.

	Amostra + Antimicrobiano			Amostra + Antimicrobiano			Amostra + Antimicrobiano			CIM AM	CIM ANT	CTRL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
A	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	CTRL COR	5	CTRL Etanol
B	800 0,156	800 0,156	800 0,156	800 0,078	800 0,078	800 0,078	800 0,039	800 0,039	800 0,039	800	2,5	CTRL Etanol
C	400 0,156	400 0,156	400 0,156	400 0,078	400 0,078	400 0,078	400 0,039	400 0,039	400 0,039	400	1,25	CTRL Meio
D	200 0,156	200 0,156	200 0,156	200 0,078	200 0,078	200 0,078	200 0,039	200 0,039	200 0,039	200	0,625	CTRL Meio
E	100 0,156	100 0,156	100 0,156	100 0,078	100 0,078	100 0,078	100 0,039	100 0,039	100 0,039	100	0,312	CTRL Meio
F	50 0,156	50 0,156	50 0,156	50 0,078	50 0,078	50 0,078	50 0,039	50 0,039	50 0,039	50	0,156	CTRL MO
G	25 0,156	25 0,156	25 0,156	25 0,078	25 0,078	25 0,078	25 0,039	25 0,039	25 0,039	25	0,078	CTRL MO
H	12,5 0,156	12,5 0,156	12,5 0,156	12,5 0,078	12,5 0,078	12,5 0,078	12,5 0,039	12,5 0,039	12,5 0,039	12,5	0,039	CTRL MO

Figura 5 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com o extrato etanólico de geoprópolis da abelha *M. rufiventris* associado ao antimicrobiano comercial Sulfametoxazol + Trimetoprima e ao microrganismo *S. aureus* PFD11.

Fonte: autora.

Nota: CIM AM – concentração inibitória mínima da amostra. CIM ANT – concentração inibitória mínima do antimicrobiano. CTRL Cor – controle da cor do EEGP no meio de cultura. CTRL Etanol – controle de atividade do solvente. CTRL Meio – controle de esterilidade do meio de cultura. CTRL MO – controle de crescimento do microrganismo.

Os índices obtidos foram interpretados como sinérgico quando  $ICIF \leq 0,5$ ; parcialmente sinérgico quando  $0,5 < ICIF < 1$ ; aditivo quando  $ICIF = 1,0$ ; e indiferente quando  $1,0 < ICIF < 4,0$ , de acordo com Timurkaynak e colaboradores (2006).

#### 5.4.3 Teste de Viabilidade Celular

A avaliação da viabilidade celular *in vitro* foi realizada empregando-se a metodologia do MTS, no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG).

##### 5.4.3.1 Viabilidade celular determinada por MTS

Os testes foram realizados em linhagem celular derivada de adenocarcinoma de mama (MCF 7), carcinoma hepatocelular (HepG2), carcinoma pulmonar (A549) e queranócito (HaCat). As células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>). Cisplatina foi utilizada como controle positivo.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade (células/poço) de  $1,0 \times 10^4$ . Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48 h com o extrato etanólico de geoprópolis em diferentes concentrações. O extrato foi solubilizado em DMSO e a partir da solução-estoque, as novas diluições foram realizadas em meio de cultura DMEM.

Após o tempo de tratamento, 15 µL de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C por 4 horas. As absorbâncias foram registradas em espectrofotômetro em 490 nm.

Os valores de absorvância são diretamente proporcionais ao número de células vivas nas amostras e, portanto, a viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorvância entre culturas tratadas e não tratadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de viabilidade celular.

#### 5.4.4 Atividade antioxidante

Dada a variada diversidade química dos compostos presentes na geoprópolis, um único ensaio para determinar a atividade antioxidante não é suficiente já que pode subestimar essa capacidade (TAN; LIM, 2015). Para que a atividade antioxidante fosse determinada com maior acurácia, métodos baseados em diferentes mecanismos de ação foram utilizados e estão descritos a seguir.

##### *5.4.4.1 Atividade antioxidante pela desativação do radical livre DPPH*

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Na reação foram adicionados 2,0 mL de uma solução de EEGP em diferentes concentrações em etanol e 0,5 mL de uma solução de DPPH a 0,5 mMol. A absorvância foi medida a 517 nm após 45 minutos de incubação da mistura de reação ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), calculada por meio da taxa de declínio da absorvância da solução de DPPH após 45 minutos de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol). A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso como IC<sub>50</sub>.

##### *5.4.4.2 Capacidade de desativação do radical peroxila*

O teste foi realizado a partir da metodologia descrita por Chisté et al. (2011), com modificações. Foram preparados os pontos da curva analítica do padrão Trolox em diferentes concentrações para gerar uma equação de reta. A amostra foi solubilizada em metanol e posteriormente diluída em tampão fosfato de potássio partindo da concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Para o controle negativo, a amostra foi

substituída pelo solvente metanol nas mesmas diluições. Para o branco foi utilizado o tampão fosfato de potássio. Em cada poço da microplaca preta de 96 poços foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  da amostra, do padrão ou do controle, 60  $\mu\text{L}$  da solução de fluoresceína 508,25 nM e 110  $\mu\text{L}$  da solução de AAPH (dicloridrato de 2,2-azobis-2-amidino-propano) a 76 mM. A placa foi agitada e incubada a 37°C na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices) que foi programada para leitura a cada minuto durante duas horas, no comprimento de onda de emissão de 528 nm e excitação de 485 nm. O resultado foi calculado usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC amostra) e na sua ausência (AUC branco). Os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica e os resultados da atividade antioxidante está expressa como equivalente Trolox ( $\mu\text{mol}$  de Trolox  $\text{g}^{-1}$  de extrato).

#### 5.4.4.3 Desativação do radical superóxido

A análise foi realizada a partir da metodologia descrita por Chisté et al. (2011), com modificações. O radical superóxido foi gerado pelo sistema NADH/PMS ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo/ fenazina metossulfato) e a capacidade do sequestro do radical foi determinada monitorando-se o efeito do EEGP sobre a redução de NBT (tetrazólio nitroazul) induzido pelo radical superóxido a 560 nm durante 10 minutos, à temperatura ambiente, em leitora de microplacas SpectraMax-M3 (Molecular Devices).

Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de amostra foi adicionada em cada poço da microplaca e os seguintes reagentes foram acrescentados: 100  $\mu\text{L}$  de NADH (498  $\mu\text{M}$ ), 100  $\mu\text{L}$  de NBT (129  $\mu\text{M}$ ) e 50  $\mu\text{L}$  de PMS (16,2  $\mu\text{M}$ ). Os reagentes PMS, NADH e NBT foram dissolvidos em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4. Os resultados foram expressos como  $\text{IC}_{50}$ .

#### 5.4.5 Atividade Anti-inflamatória *in vitro*

##### 5.4.5.1 Cultura Celular

Para os ensaios de viabilidade celular por MTT, redução do fator nuclear –  $\kappa$ B e liberação do fator de necrose tumoral –  $\alpha$ , foram utilizadas culturas de células de macrófagos RAW 264,7 transfectados com o gene NF- $\kappa$ B-pLUC cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e L-glutamina em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os testes foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP).

A viabilidade celular foi analisada utilizando-se o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em macrófagos RAW 264,7 (2 x 10<sup>5</sup> células/poço) como descrito por Franchin e colaboradores (2016). Após 24 horas de plaqueamento, as células foram tratadas com o extrato nas concentrações de 1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 3,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> por um período de 4 horas. Após esse período, foi adicionada uma solução de MTT (0,3 mg mL<sup>-1</sup>) em cada poço por aproximadamente 3 horas, e as células foram lisadas com etanol 100%. A absorbância foi medida a 570 nm com uma leitora de microplacas (ASYS, UVM340, Biochrom, UK). Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis. O grupo controle é considerado com crescimento de 100% e como controle negativo foi usado uma solução de DMSO a 0,01%. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n = 4. Todos os valores foram normalizados para 100% baseado no grupo controle M.

#### 5.4.5.2 Redução do NF- $\kappa$ B

Para a ativação de NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B), os macrófagos RAW 265,7 foram plaqueados e cultivados por 24 horas. Os mesmos foram tratados com extrato etanólico de geoprópolis em concentrações consideradas não tóxicas pelo ensaio de MTT (10, 30 e 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) 30 minutos antes do estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) a 100 ng mL<sup>-1</sup>, exceto para o grupo com meio de cultura. A estimulação por LPS permaneceu por 4 horas. Após este período, foi adicionado o reagente de ensaio de luciferase e a luminescência foi medida em uma leitora de microplaca (SpectraMax M3, Molecular Devices) para a quantificação de NF- $\kappa$ B. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  DP de unidades de luminescência relativa (%), n = 4. Todos os valores foram normalizados para 100% baseado no grupo

controle LPS. O grupo controle é considerado como 100% de luminescência (FRANCHIN et al., 2016).

#### 5.4.5.3 Determinação de TNF- $\alpha$

Para a determinação de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), os macrófagos RAW 264,7 foram plaqueados e cultivados sob as mesmas condições anteriores. As células foram tratadas com geoprópolis a 10, 30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  30 minutos antes do estímulo com LPS a 100  $\text{ng mL}^{-1}$ , exceto para o grupo com meio de cultura (M). A estimulação por LPS permaneceu por 4h e após esse período foi quantificado no sobrenadante celular os níveis da citocina TNF- $\alpha$  utilizando-se o teste de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 4$ .

### 5.5 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados de quantificação de compostos fenólicos, das atividades antioxidantes e anti-inflamatória foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o *software* Prism (versão 5).



## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos nos testes de caracterização química e de atividades biológicas do extrato etanólico da geoprópolis produzida por *M. rufiventris* em Cabo Verde - MG são expostos e discutidos nos itens a seguir.

### **6.1 Caracterização química e atividade antioxidante do EEGP**

#### **6.1.1 Espectrofotometria da luz UV**

A determinação do espectro de absorção com espectrofotômetro UV é utilizado como parâmetro de qualidade de extrato de própolis pela legislação de Regulamentos Técnicos para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis destinada ao comércio nacional e internacional (BRASIL, 2001). Dessa forma, como no Brasil ainda não existe um regulamento técnico específico para geoprópolis, usa-se o referido regulamento para analisar a sua qualidade.

A partir da Figura 6 é possível observar o resultado obtido pela espectrofotometria de varredura, evidenciando os picos de absorbância da amostra nos comprimentos de onda entre 200 a 800 nm. O EEGP atende aos requisitos da legislação para identificação dos grupos de flavonoides por espectro de absorção, apresentando picos entre 250 a 350 nm (BRASIL, 2001).

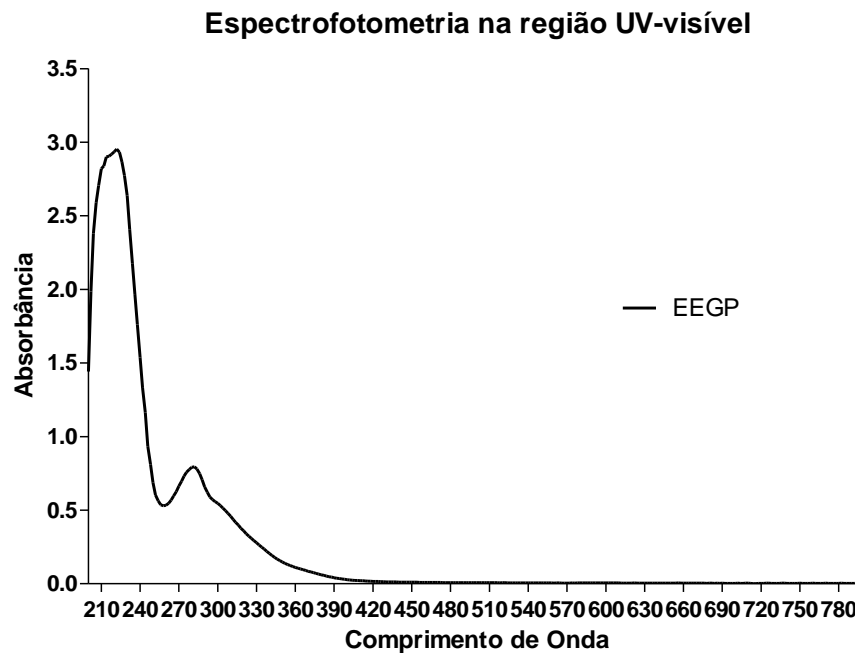


Figura 6 - Espectro de absorção da região UV do EEGP de *M. rufiventris*.  
Fonte: autora.

O extrato exibiu picos intensos na região entre 200-250 nm e 260-330 nm, indicando a possível presença de compostos fenólicos podendo ser, de acordo com Ássimos (2014), vanilina (291-309 nm), pinocebrina (299 nm), galangina (267 nm), flavonas (295 nm), ácido cafeico (325 nm), ácido gálico (273 nm), apigenina (265 nm) e ácido 3,5-diprenil-p-cumárico (310 nm).

Compostos fenólicos apresentam ligações conjugadas duplas e aromáticas, apresentando absorção na região UV-Vis. Ácidos hidroxibenzoicos têm sua absorção máxima em 200 – 290 nm, o que é atribuído ao seu grupo benzoil. Já os derivados do ácido cinâmico apresentam absorção de 270 - 360 nm, o que é atribuído à conjugação adicional no sistema cinamoil (ALBERTI-DÉR, 2013). Para Scariotto e colaboradores (2018), os triterpenoides são também identificados na região de 210 nm. Além disso, Oldoni (2007) relata que as classes de isoflavonoides, flavanonas e diidroflavonas absorvem normalmente nos comprimentos de onda de 281 a 284 nm. Dessa forma, pode-se inferir a possível presença de compostos fenólicos e triterpenoides no EEGP analisado, uma vez que é possível visualizar picos intensos na região entre 200-250 nm e 260-330 nm.

### 6.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é um tipo de cromatografia líquida onde a fase móvel é um líquido e a fase estacionária é uma camada de material em cima de uma placa. É um método cromatográfico comumente usado por ser rápido, sensível e requerer pequenas quantidades de amostra (SANTIAGO; STROBEL, 2014).

Ao desenvolver a CCD com as fases móveis testadas, verificou-se que a fase móvel água e acetona (20:80) com uma gota de ácido acético permitiu uma eluição mais adequada da amostra, com separação de alguns compostos majoritários que foram visualizados por meio da revelação com luz UV a 254 nm e também por meio de reveladores químicos (Figura 7).

Na placa revelada com cloreto férrico observaram-se manchas castanho-violáceas que sugerem a presença de compostos fenólicos na amostra (DE OLIVEIRA et al., 2010). Essas manchas também foram observadas na placa revelada com luz UV a 254 nm. As manchas apresentadas pela revelação com ácido fosfomolibdico indicam a presença de compostos aromáticos na amostra (CAI, 2014). Ao revelar as placas com anisaldeído sulfúrico (AS) e vanilina, observou-se manchas que variaram do roxo ao lilás (AS) e também manchas rosáceas (vanilina) o que indica a presença de terpenos e saponinas (MADOGLIO, 2011; RODRIGUES et al., 2017). Já a revelação com o DPPH indicou a presença de atividade antioxidante, apresentando manchas brancas marcantes sob fundo púrpura (SEVALHO; ROCHA, 2017).

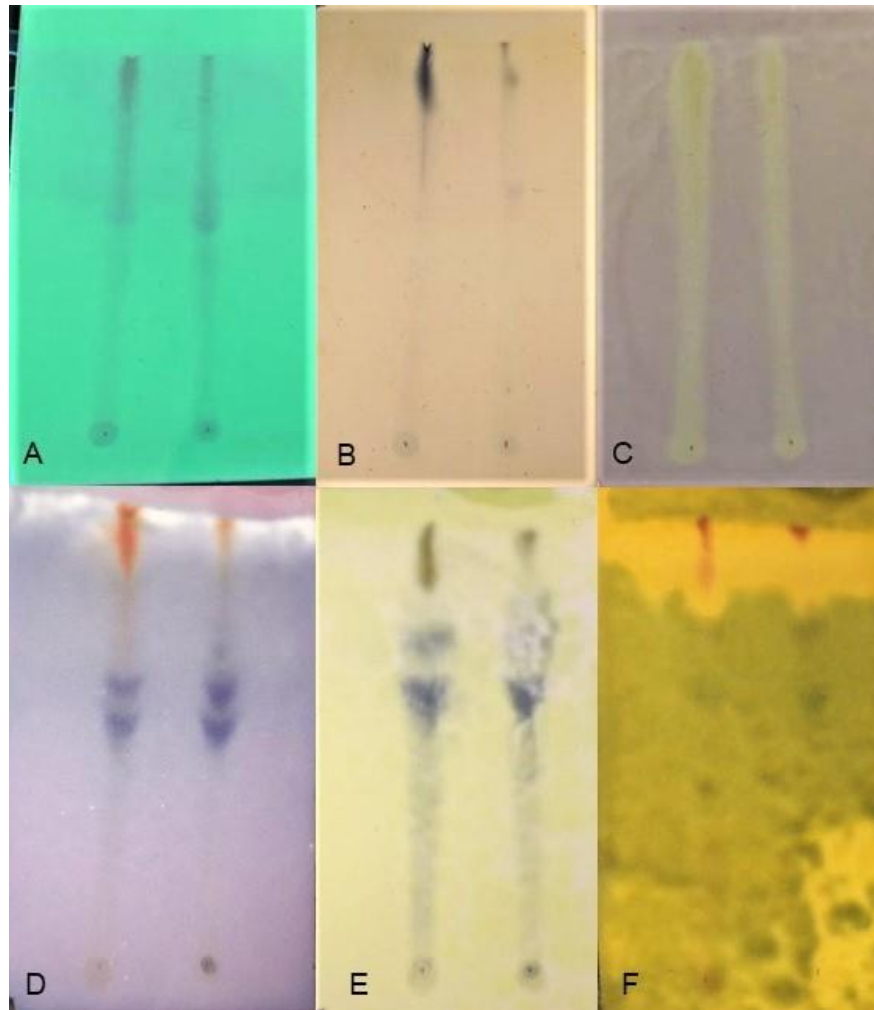


Figura 7 - Cromatografia em camada delgada do extrato etanólico de geoprópolis produzida por *M. rufiventris*.

Fonte: autora.

Nota: a fase móvel utilizada foi água e acetona (20:80) e uma gota de ácido acético. As placas foram reveladas com: A) luz UV a 254 nm; B) solução de cloreto férrico; C) solução de DPPH; D) solução de anisaldeído sulfúrico; E) solução de ácido fosfomolibdico; F) solução de vanilina.

Sendo assim, pode-se inferir que o extrato apresenta compostos fenólicos e terpenos, que são classes de compostos encontrados também em extratos etanólicos de própolis e de outras geoprópolis (BONAMIGO et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2017a; RUBINHO et al., 2019).

### 6.1.3 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Com base nos resultados obtidos anteriormente nos ensaios de CCD que indicaram a presença de compostos fenólicos e a presença de compostos que reagem com o DPPH (indicando uma possível atividade antioxidante), procedeu-se novos

experimentos para a identificação da quantidade de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da amostra.

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, possuindo uma grande variedade de substâncias. Apresentam várias atividades biológicas importantes, estando relacionados à atividade antioxidante e antimicrobiana de produtos naturais (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011; OLDONI, 2007).

Nesse contexto, a capacidade de uma substância de sequestrar radicais livres pode estar relacionada à quantidade e especificidade dos compostos existentes na amostra. As espécies reativas de oxigênio são produzidas normalmente nos seres vivos e, por serem extremamente reativas, podem trazer danos às células (OLDONI, 2007). Por conta disso, há uma importância grande em se avaliar o potencial antioxidante de produtos naturais contra esses radicais.

O método do sequestro do radical livre DPPH permite detectar a capacidade de uma substância antioxidante em transferir elétrons e reduzir o radical DPPH. Por não ser um método específico, é um ensaio comumente utilizado para avaliar o potencial antioxidante total de amostras (PIRES et al., 2017).

A tabela 2 mostra os resultados das análises de teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do EEGP.

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante do EEGP produzido por *M. rufiventris*.

<b>Compostos fenólicos totais (mg EAG g<sup>-1</sup>)</b>	<b>ROO<sup>•</sup> (μmol Trolox g<sup>-1</sup>)</b>	<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup> IC<sub>50</sub> (μg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>DPPH<sup>•</sup> IC<sub>50</sub> (μg mL<sup>-1</sup>)</b>
90,14±2,55	2026,31±20,17	35,61±3,71	29,76±3,36

Fonte: autora.

Nota: os valores foram expressos como média ± desvio padrão.

Corroborando com os testes de espectrofotometria de varredura e de cromatografia em camada delgada, o EEGP apresentou uma quantidade de compostos fenólicos totais de 90,14 mg EAG g<sup>-1</sup> de amostra. O valor encontrado no presente trabalho é maior que aquele encontrado por Dutra et al. (2014) para o extrato etanólico de geoprópolis produzida por *M. fasciculata* (47,78 mg EAG g<sup>-1</sup>); encontrados por Da Silva et al. (2013) para *M. interrupta* (4,378 mg EAG g<sup>-1</sup>) e para *M. seminigra* (1,413 mg EAG g<sup>-1</sup>); por De Souza et al. (2013) para *M. subnitida* (63,9

mg EAG g<sup>-1</sup>); e por Tiveron et al. (2016) para própolis orgânica do sul do Brasil (17,59 – 79,84 mg EAG g<sup>-1</sup>). Porém, o valor foi abaixo daquele encontrado por Franchin et al. (2012) para *M. scutellaris* (127 mg EAG g<sup>-1</sup>), por Dos Santos et al. (2017b) para *M. orbignyi* (121 mg EAG g<sup>-1</sup>) e por Rubinho et al. (2019) para *M. quadrifasciata anthidioides* (238,22 mg EAG g<sup>-1</sup>). Essas diferenças são esperadas, uma vez que são espécies diferentes de abelhas coletando resinas em diferentes regiões do país.

A amostra de EEGP apresentou uma atividade relevante pelo método DPPH (IC<sub>50</sub> 29,76 µg mL<sup>-1</sup>). Essa capacidade de sequestro do radical livre DPPH é melhor do que aquela encontrada para *Scaptotrigona postica* (IC<sub>50</sub> 74,1 µg mL<sup>-1</sup>), para *M. quadrifasciata quadrifasciata* (IC<sub>50</sub> 241,8 µg mL<sup>-1</sup>) e *Tetragonisca angustula* (IC<sub>50</sub> 2433 µg mL<sup>-1</sup>) (FERREIRA et al., 2017; TORRES et al., 2018). Demonstrou ainda um resultado similar ao encontrado por Dos Santos et al. (2017a) para *M. quadrifasciata anthidioides* (IC<sub>50</sub> 28,9 µg mL<sup>-1</sup>). Essa metodologia do DPPH avalia a capacidade geral da amostra em sequestrar esses radicais livres e como o mesmo é solubilizado em solventes orgânicos, favorece a ação de compostos lipofílicos, podendo subestimar a capacidade antioxidante total da amostra (ARNAO, 2001).

Os ensaios baseados na capacidade de neutralizar os radicais de oxigênio como no caso dos radicais peroxila e superóxido, apresentam uma melhor correlação com a atividade antioxidante que ocorre *in vivo* já que analisam a atividade contra os radicais que normalmente são produzidos durante a respiração celular (TAN; LIM, 2015). A partir dos resultados obtidos pela análise do ORAC é possível verificar que o EEGP apresenta uma capacidade de desativação do radical peroxila semelhante à atividade encontrada por Tiveron et al. (2016) para própolis orgânica brasileira (1950 µmol Trolox g<sup>-1</sup>), superior a capacidade encontrada por Mourão (2013) para própolis vermelha (19,799 µmol Trolox g<sup>-1</sup>) e para a própolis da abelha sem ferrão *Friseomellita varia* (182,76 µmol Trolox g<sup>-1</sup>) encontrada por Hipólito (2013); sendo inferior à atividade encontrada por Silva et al. (2011) para a própolis uruguaia (8000 µmol Trolox g<sup>-1</sup>) e por Rubinho et al. (2019) para geoprópolis de *M. quadrifasciata anthidioides* (2625 µmol Trolox g<sup>-1</sup>). Já a capacidade antioxidante da amostra de EEGP frente ao radical superóxido foi inferior ao encontrado por Tiveron et al. (2016) (IC<sub>50</sub> 0,29 – 2,95 µg mL<sup>-1</sup>).

Compostos antioxidantes estão relacionados a diferentes classes de compostos, dentre elas os polifenóis (OROIAN; ESCRICHE, 2015). Como visto nas

análises químicas, o EEGP apresenta compostos fenólicos em sua composição, o que pode estar associado à atividade antioxidante do mesmo.

Apesar de os compostos fenólicos representarem a maior classe de antioxidantes encontrados na natureza, muitas vezes não há uma correlação direta entre a quantidade de compostos fenólicos totais de uma amostra e sua capacidade antioxidante. Isso acontece por conta das limitações apresentadas pelos ensaios de Folin-Ciocalteu e as metodologias de avaliação da capacidade antioxidante apresentadas por uma amostra. O reagente utilizado na metodologia de compostos fenólicos totais pode reagir com vários outros compostos da amostra (como aminoácidos, por exemplo), podendo expressar um resultado diferente do real (ROHR, 1999). Ainda, de acordo com Toscan (2010) alguns outros compostos presentes em amostras de produtos naturais podem apresentar atividade antioxidante, como é o caso dos terpenos.

#### 6.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

A Figura 8 apresenta a caracterização química do EEGP realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

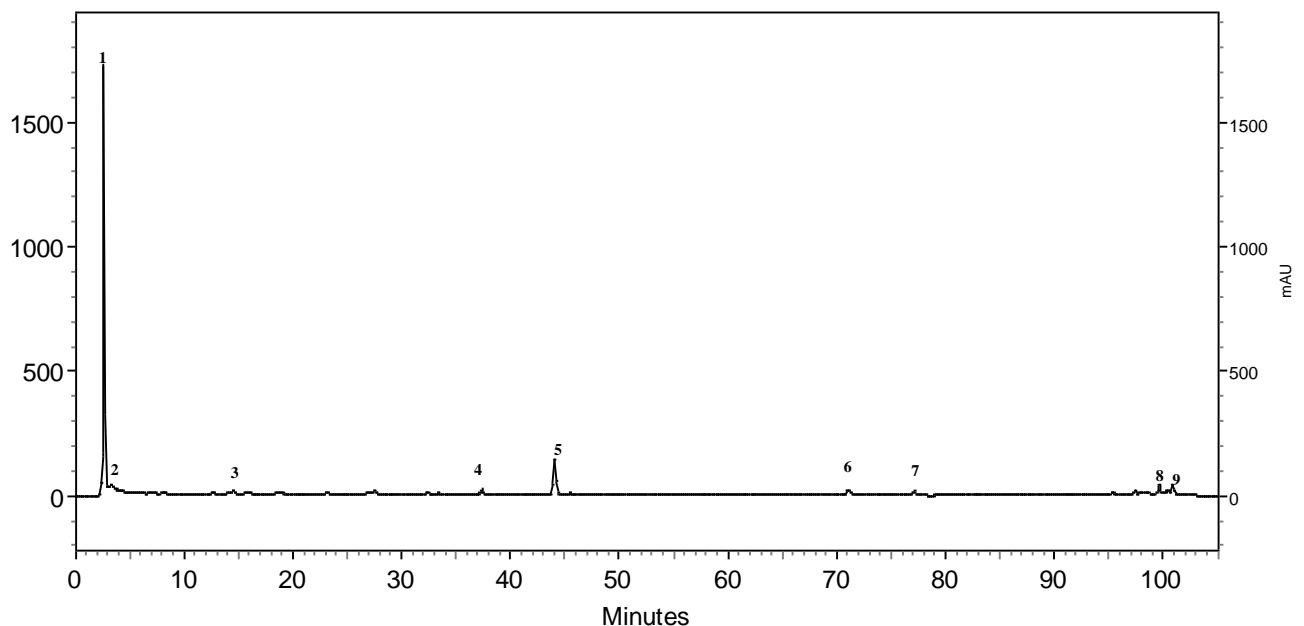


Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico da geoprópolis produzida por *M. rufiventris*.

Fonte: autora.

Nota: Detecção a 280 nm. (1)  $\lambda_{\text{máx}} = 244$  e  $274$  nm; (2)  $\lambda_{\text{máx}} = 238$  e  $276$  nm; (3)  $\lambda_{\text{máx}} = 231$  e  $282$  nm; (4)  $\lambda_{\text{máx}} = 225$  e  $289$  nm; (5)  $\lambda_{\text{máx}} = 233$  e  $277$  nm; (6)  $\lambda_{\text{máx}} = 295$  nm; (7)  $\lambda_{\text{máx}} = 293$  nm; (8)  $\lambda_{\text{máx}} = 294$  e  $249$  nm; (9)  $\lambda_{\text{máx}} = 298$  e  $250$  nm.

Como observado na Figura 8, o perfil cromatográfico da amostra de EEGP é complexo e apresenta componentes com diferentes polaridades. Tendo em vista que a detecção foi feita a 280 nm, pode-se inferir a presença de compostos que apresentam ligações duplas conjugadas e/ou a presença de anéis aromáticos. Para Farnesi (2007), possivelmente esses componentes podem ser ácidos fenólicos, fenilpropanoides ou flavonoides. Porém, não foi possível identificar com exatidão os compostos presentes na amostra, sendo necessário a aplicação futura de métodos analíticos e eletroscópicos visando atribuir nomes, classes e estruturas químicas dos compostos presentes no extrato.

## 6.2 Atividade antimicrobiana

A própolis e a geoprópolis vêm sendo utilizadas na medicina alternativa para o tratamento e/ou prevenção de diversas doenças infecciosas por apresentar atividade antimicrobiana de amplo espectro. A atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato de geoprópolis de *M. rufiventris* analisado no presente trabalho encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana apresentada pelo EEGP de *M. rufiventris* contra diferentes microrganismos. (Continua)

	Cepas	EEGP ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Antibiótico* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
		CIM	CMM	CIM	CMM
Gram-positivas	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	400-200	800-400	0,3125-0,156	2,5-1,25
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	100-50	200-100	2,5-1,25	5-2,5
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	400-200	400-200	0,3125-0,156	2,5-1,25
	<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 6538	100-50	200-100	5-2,5	N.A
	<i>L. monocytogenes</i> CDC F4561	200-100	200-100	0,3125-0,156	0,625-0,3125
	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	400-200	800-400	<0,078	<0,078
	<i>S. epidermidis</i> PFD 4	400-200	N.A	<0,625	<0,625
	<i>S. aureus</i> PFD 11	800-400	N.A	<0,625	1,25-0,625
	<i>S. aureus</i> PFD 14	800-400	N.A	<0,625	<0,625
	<i>S. warneri</i> PFD 18	N.A	N.A	80-40	N.A
Gram-negativas	<i>E. coli</i> ATCC 25922	N.A	N.A	5-2,5	N.A
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	800-400	N.A	10-5	N.A
	<i>S typhimurium</i> ATCC 6017	N.A	N.A	10-5	N.A



(Conclusão)

	Cepas	EEGP ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Antibiótico* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
		CIM	CMM	CIM	CMM
Leveduras	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	800-400	800-400	2,5-1,25	2,5-1,25
	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	200-100	N.A	20-10	20-10
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	N.A	N.A	<0,625	5-2,5
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 2209	200-100	800-400	2,5-1,25	20-10
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	200-100	N.A	40-20	40-20

Fonte: autora.

\*Nota: para bactérias Gram-positivas ATCC e CDC – Amoxicilina; para bactérias Gram-positivas multirresistentes isoladas de feridas – Sulfametoxazol + Trimetoprima; para bactérias Gram-negativas – Estreptomicina; para leveduras – Fluconazol. N.A: não ativo nas concentrações testadas.

Como observado na Tabela 3, o EEGP apresentou inibição contra todas as bactérias Gram-positivas testadas, além de inibir *P. aeruginosa* e a maioria das espécies de leveduras utilizadas no trabalho. Para Duarte et al. (2007), extratos brutos de produtos naturais com valores de CIM abaixo de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  podem ser considerados como fortes inibidores do crescimento microbiano, já entre  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a atividade é considerada moderada. Dessa forma, pode-se inferir que o extrato testado apresenta uma forte atividade bacteriostática contra *S. aureus* ( $400 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *B. cereus* ( $100 - 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *S. epidermidis* ( $400 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *L. monocytogenes* ( $200 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) *S. mutans* ( $400 - 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e fungistática contra *C. glabrata* ( $200 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C. parapsilosis* ( $200 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *C. krusei* ( $200 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já para *P. aeruginosa* ( $800 - 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C. tropicalis* ( $800 - 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as bactérias isoladas de feridas complexas, o extrato apresenta uma atividade moderada.

O extrato apresentou uma das maiores atividades contra *B. cereus*. Essa bactéria pode causar gastroenterites, infecções oculares, bacteremias persistentes e sepse, pneumonia e meningite principalmente em pacientes imunocomprometidos por conta de enterotoxinas e hemolisinas produzidas por esse microrganismo. Geralmente, o tratamento para gastroenterite é apenas sintomático, porém o tratamento para as outras infecções causadas por esse microrganismo pode ser complicado (YANG et al., 2017). Devido à dificuldade no tratamento de infecções mais graves causadas pelo *B. cereus*, a atividade inibitória do extrato é um relevante fator no auxílio da cura dessas doenças, além de ser um indicativo para a ajuda do controle de infecções no trato gastrintestinal.

Outro resultado importante apresentado pelo extrato foi a inibição de *S. aureus* e da cepa de *S. aureus* MRSA, que é um patógeno que pode colonizar a pele, narinas e faringe humanas. É um dos maiores causadores de doenças graças a sua habilidade única de escapar da resposta imune inata. É uma bactéria associada ao grande número de infecções em ambientes hospitalares e pacientes imunocomprometidos. Esse microrganismo tem adquirido a habilidade de causar uma grande diversidade de infecções, desde infecções simples na pele e nos olhos até infecções sistêmicas e pneumonia (ANSARI et al., 2019). Além disso, as cepas multirresistentes de *S. aureus* têm sido uma das maiores causas de infecções sistêmicas relacionadas a altos índices de morbidade e mortalidade no mundo (KEIHANIAN et al., 2018). De acordo com a lista de prioridades globais para guiar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos contra bactérias resistentes, *S. aureus* encontra-se como prioridade alta (WHO, 2017). Dessa forma, o resultado obtido neste trabalho pode ser considerado importante como uma alternativa de produto natural eficaz no controle de *S. aureus*.

Dos Santos et al. (2017b) ao analisarem a geoprópolis de uma espécie de abelha sem ferrão, *M. orbigny*, perceberam que o extrato etanólico do mesmo também apresentou uma melhor atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Porém, no trabalho citado a menor CIM encontrada foi contra *S. aureus* (ATCC 6538) sendo de 6,13 mg mL<sup>-1</sup>, valor muito superior ao encontrado no presente trabalho para a mesma cepa de *S. aureus*. Já Rubinho et al. (2019) obtiveram resultados positivos na CIM e CMM contra *S. aureus*, *B. cereus*, *S. epidermidis* e *L. acidophilus* com extrato etanólico de geoprópolis produzida por *M. quadrifasciata*, sendo a menor inibição para *B. cereus*; os autores não obtiveram resultados contra as cepas Gram-negativas estudadas e nem contra *C. albicans*, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho. Autores que trabalharam com as geoprópolis de *Tetragonisca angustula* e *M. scutellaris* também relataram que seus extratos tiveram uma melhor atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (DA CUNHA et al., 2013a; TORRES et al., 2018). A baixa atividade contra bactérias Gram-negativas é explicada pela presença de bombas de efluxo na membrana plasmática desses microrganismos e de vesículas extracelulares derivadas da membrana externa desses microrganismos, que podem impedir a entrada ou expulsar os compostos da geoprópolis do interior da célula (BROWN et al., 2015). Outra explicação plausível é

o fato de que talvez a planta visitada pela abelha secrete uma maior quantidade de substâncias para a proteção da mesma contra patógenos Gram-positivos, e quando a abelha coleta essa resina, esses compostos vêm juntos (FOKT et al., 2010).

A resistência a antimicrobianos vem crescendo anualmente em *Candida* spp. Apesar de *C. albicans* representar mais de 80% dos isolados de candidíase humana, nos últimos 20 anos as doenças causadas por espécies não-*albicans* têm crescido significativamente (NEGRI et al., 2012). *C. parapsilosis* é um problema significativo em neonatos e pacientes transplantados e que recebem nutrição parenteral. É altamente resistente aos azóis e apresenta uma resistência intrínseca a equinocandinas. Já a *C. tropicalis* é comumente encontrada em pacientes com neutropenia, e apresenta resistência aos azóis porém baixa resistência a equinocandinas (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). A *C. glabrata* é considerada o segundo caso mais prevalente de candidíase em centros médicos dos Estados Unidos e Europa com uma incidência crescente nas clínicas brasileiras. O número de casos de *C. glabrata* resistente a fluconazol, equinocandinas e multirresistente tem crescido no mundo todo, com casos inclusive no Brasil (COLOMBO; JÚNIOR; GUINEA, 2017). Já *C. krusei* é descrita geralmente como causa de infecções fúngicas em pacientes suscetíveis e possui uma resistência intrínseca a fluconazol, sendo crescente o aumento da resistência a equinocandinas (FORASTIERO et al., 2015). Nesse sentido, os resultados encontrados no presente trabalho de inibição *Candida* spp. testadas são extremamente válidos para futuros estudos no controle desses patógenos que vêm desenvolvendo resistência aos antifúngicos existentes na atualidade.

Além disso, a presença de compostos fenólicos e terpenos na geoprópolis, como observado nos ensaios de caracterização química, é geralmente correlacionada com diversas atividades biológicas de extratos de produtos naturais, entre elas, a atividade antimicrobiana (HELENO et al., 2015; HUANG et al., 2014). Os compostos fenólicos são capazes de alterar a permeabilidade da membrana plasmática microbiana, inibir a síntese de ATP e interromper o transporte de elétrons (CUSHNIE; LAMB, 2011). Já o mecanismo antimicrobiano dos terpenos está relacionado com o seu caráter lipofílico (TOSCAN, 2010). Os monoterpenos influenciam a estrutura da membrana celular, aumentando sua permeabilidade e fluidez, alterando a disposição das proteínas da membrana, induzindo também distúrbios na cadeia respiratória (PADUCH et al., 2007).

### 6.2.3 Atividade sinérgica

A combinação de drogas é usada em tratamentos de diversas doenças tanto infecciosas quanto crônicas. Substâncias sinérgicas podem aumentar o potencial de drogas que são ineficientes sozinhas, reduzir efeitos colaterais de altas doses de antimicrobianos e pode se tornar uma boa estratégia para o controle da evolução de multirresistência em microrganismos (BOLLENBACH, 2015). Sendo assim, trabalhos avaliando o efeito sinérgico de produtos naturais são uma estratégia promissora para aumentar a eficiência de tratamentos antimicrobianos. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos no teste de *checkerboard* combinando o EEGP com amoxicilina e com sulfametoxazol + trimetoprima.

Tabela 4 - Resultados do teste de *checkerboard* apresentados pelo EEGP de *M. rufiventris* em combinação com os antimicrobianos amoxicilina e sulfametoxazol + trimetoprima.

Antimicrobiano	CIM <sub>AM</sub>	CIM <sub>CAM</sub>	CIF <sub>AM</sub>	CIM <sub>ANT</sub>	CIM <sub>CANT</sub>	CIF <sub>ANT</sub>	ICIF	Classificação
Amoxicilina	400	6,250	0,015	0,312	0,078	0,249	0,265	Sinérgico
Sulfametoxazol + Trimetoprima	800	12,500	0,015	0,156	0,039	0,250	0,265	Sinérgico

Fonte: autora.

Nota: Para teste com amoxicilina foi utilizada a bactéria *S. aureus* ATCC 6538; para o teste com sulfametoxazol + trimetoprima foi utilizada a bactéria *S. aureus* PFD 11. Para os testes foram usadas as concentrações inibitórias mínimas, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , das amostras (CIM<sub>AM</sub>), do antimicrobiano (CIM<sub>ANT</sub>), da amostra combinada com o antimicrobiano (CIM<sub>CAM</sub>) e do antimicrobiano combinado com a amostra (CIM<sub>CANT</sub>); as concentrações inibitórias fracionárias das amostras e do antimicrobiano (CIF<sub>AM</sub>/CIF<sub>CANT</sub>); o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) e a classificação da atividade.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, é possível afirmar que o extrato etanólico de geoprópolis apresentou efeito sinérgico quando associado com o antimicrobiano amoxicilina e também em associação com o antimicrobiano sulfametoxazol + trimetoprima. A associação com a geoprópolis permitiu a redução da concentração inibitória mínima da amoxicilina de  $0,3125 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $0,078 \mu\text{g mL}^{-1}$  e do sulfametoxazol + trimetoprima de  $0,156 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $0,039 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esse resultado pode estar relacionado a presença de compostos fenólicos e terpenos na geoprópolis.

Ao analisar o efeito sinérgico do extrato etanólico da geoprópolis produzida por *M. quadrifasciata* combinado com o antimicrobiano sulfametoxazol + trimetoprima,

Rubinho et al. (2019) concluíram que o efeito foi parcialmente sinérgico contra *S. aureus* ATCC 6538. Já Scazzocchio e colaboradores (2006) observaram um efeito sinérgico entre o extrato etanólico de própolis verde da Itália associado à ampicilina, gentamicina e estreptomicina contra cepas de bactérias Gram-positivas. Wojtyczka et al. (2013) também obtiveram efeito sinérgico na associação do extrato etanólico de própolis da Polônia com os antibacterianos cefoxitina, sulfametoxazol + trimetoprima, clindamicina, tobramicina, tetraciclina, linezolida, penicilina e eritromicina contra cepas de *S. aureus*. Esses trabalhos, bem como o presente trabalho, mostram o potencial das própolis e geoprópolis no controle da resistência microbiana pelo uso em conjunto com antimicrobianos disponíveis para uso clínico.

### 6.3 Atividade anti-inflamatória *in vitro*

Para verificar se o EEGP exerce efeito citotóxico em macrófagos, conduziu-se o ensaio de viabilidade celular por 4 h (MTT). Como verificado na Figura 11, as concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o veículo não afetaram a viabilidade celular comparado ao controle; apenas a maior concentração testada (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) reduziu significativamente a viabilidade celular.

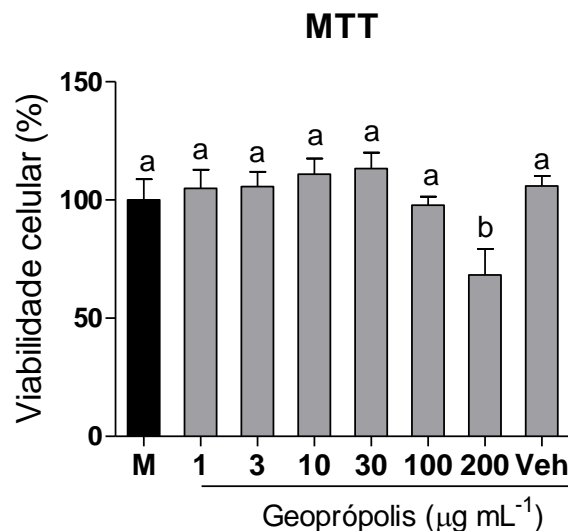


Figura 9 - Porcentagem da viabilidade celular em macrófagos RAW 264,7 (*in vitro*).

Fonte: autora.

Nota: Macrófagos tratados com meio de cultura (M); geoprópolis em 1, 3, 10, 30, 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; veículo DMSO (Veh). Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguido de pós-teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

Posteriormente ao ensaio do MTT, avaliou-se a atividade anti-inflamatória do EEGP na redução do fator nuclear - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Como visto na Figura 12, as células que receberam tratamento com a geoprópolis nas concentrações de 30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram redução da ativação do NF- $\kappa$ B em 28 e 64%, respectivamente, comparado ao controle negativo LPS ( $p < 0,05$ ). A concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentou redução significativa.

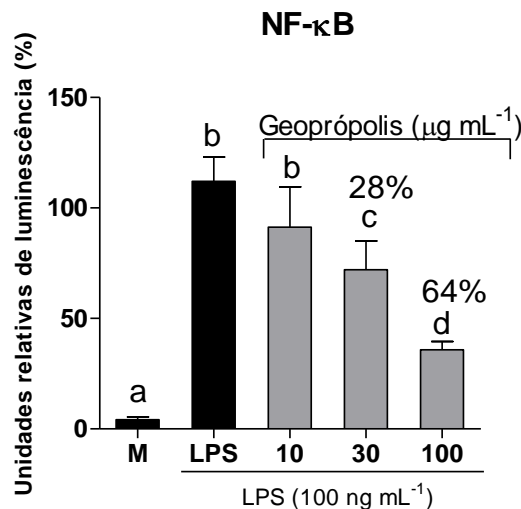


Figura 10 - Efeito do EEGP de *M. rufiventris* na ativação do NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264,7. Fonte: autora.

Nota: Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguido de pós-teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

Em condições normais, a proteína NF- $\kappa$ B está presente no citoplasma em uma forma inativa. A ativação com estímulos pró-inflamatórios inicia uma cascata intracelular de sinalização, induzindo a expressão de citocinas, quimiocinas, fatores anti-apoptóticos e fatores de crescimento celular que são essenciais na resposta imune e inflamatória (BÚFALO et al., 2013). Dessa forma, a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B tem atraído atenção de pesquisadores como uma estratégia terapêutica na intervenção de problemas imunes e de inflamação exacerbada.

Uma vez que EEGP apresentou atividade anti-inflamatória reduzindo a ativação da via NF- $\kappa$ B, verificou-se se a liberação do fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foi igualmente reduzida pelo tratamento. Conforme a Figura 13, os macrófagos que receberam tratamento com o EEGP nas concentrações de 30 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram redução na liberação do TNF- $\alpha$  quando comparado ao controle negativo LPS ( $p < 0,05$ ). A concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentou redução significativa.

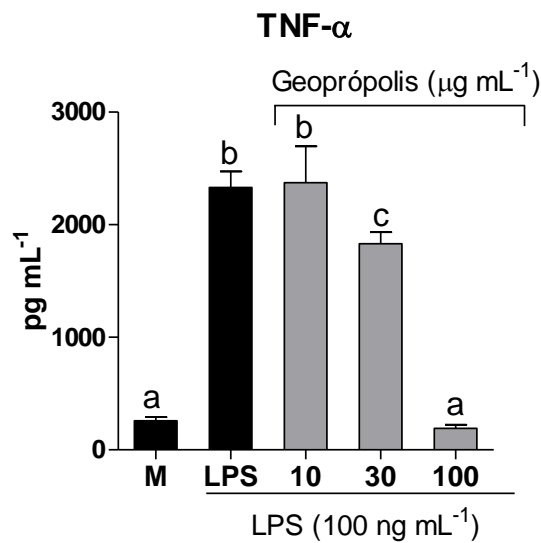


Figura 11 - Efeito do EEGP de *M. rufiventris* na liberação da citocina TNF- $\alpha$  por macrófagos.

Fonte: autora.

Nota: M = controle do meio. Todos os grupos foram comparados entre si e letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA one-way seguido de pós-teste Tukey,  $p < 0,05$ ).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos, granulócitos e células epiteliais possuindo efeito citotóxico e antiangiogênico em células tumorais, além de estimular a resposta anti-inflamatória e a produção e liberação de outras citocinas. A produção exacerbada de TNF- $\alpha$  é associada a uma alta toxicidade para o organismo, podendo causar doenças autoimunes e problemas relacionados ao sistema imune (PALATA et al., 2019).

De modo geral, o EEGP possui um potencial efeito anti-inflamatório *in vitro*, inibindo a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de TNF- $\alpha$  em concentrações não tóxicas à célula. Búfalo e colaboradores (2013) ao analisarem um tipo de própolis coletada em Botucatu – SP, viram que a mesma apresenta uma inibição na fosforilação de I $\kappa$ B e parcialmente previne a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ , indicando assim uma inibição na atividade de NF- $\kappa$ B na concentração de 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, sendo a sua toxicidade acima de 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> no modelo celular utilizado no trabalho. Szliszka et al. (2013) observaram uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$  da própolis verde brasileira nas concentrações de 25 e 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Tiveron et al. (2016) analisaram as própolis orgânicas produzidas em diferentes municípios brasileiros e observaram que apenas uma amostra apresentou diminuição na ativação de NF- $\kappa$ B, e na liberação de TNF- $\alpha$ , sendo essa atividade na concentração de 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Porém, neste estudo os autores perceberam que a concentração de 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> é tóxica às células utilizadas. Todos estes autores

citados obtiveram resultados em concentrações menores do que o resultado obtido no presente trabalho e isso pode ter acontecido pelos extratos possivelmente apresentarem diferenças na sua composição em relação à geoprópolis, uma vez que as espécies de abelhas são diferentes, bem como os locais de coleta.

Já Paulino et al. (2006) obtiveram resultados que demonstraram que a própolis verde da região de Minas Gerais diminuiu a ativação de NF-κB nas concentrações de 100 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho apesar de serem estudos com tipos de própolis diferentes.

A atividade anti-inflamatória do EEGP pode estar relacionada a possível presença de compostos fenólicos na amostra. Os flavonóis como as quercetinas e caempferol demonstram ter grande potencial na modulação da produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (HALLIWELL, 2012).

#### 6.4 Toxicidade aguda *in vivo* em modelo de *Galleria mellonella*

Como visto na Figura 9, o EEGP aplicado nas larvas de *G. mellonella* que nas concentrações de 100, 400 e 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o veículo não apresentaram efeito tóxico após um período de 72h comparado ao controle.

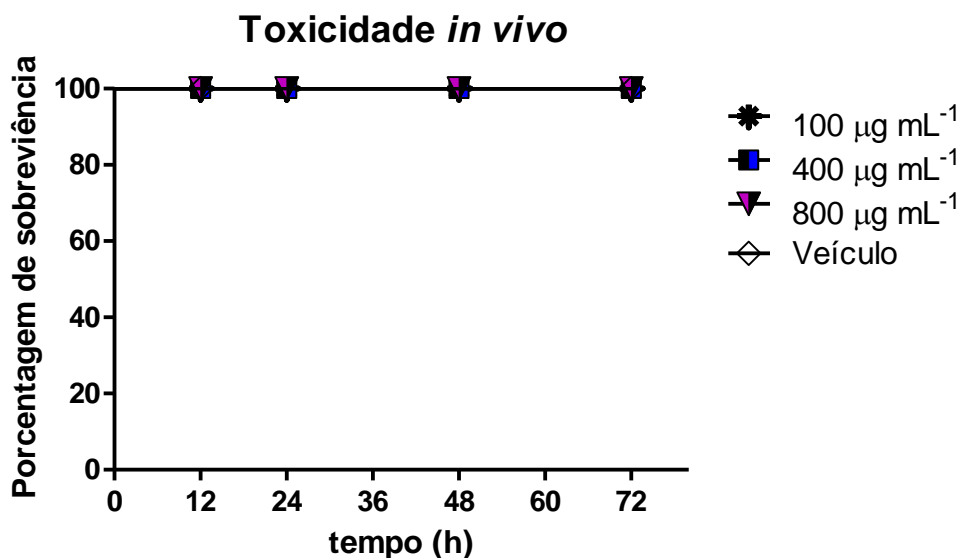


Figura 12 - Toxicidade sistêmica do EEGP em modelo de larvas de *G. mellonella*.

Fonte: autora.

Nota – doses: 32 mg  $\text{kg}^{-1}$  de larva (800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 16 mg  $\text{kg}^{-1}$  de larva (400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 4 mg  $\text{kg}^{-1}$  de larva (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



O resultado mostra que nenhuma das concentrações/doses utilizadas apresentam toxicidade *in vivo* no modelo de toxicidade estudado. Para Sardi et al. (2017), o modelo utilizando *G. mellonella* é um modelo simples, válido, de baixo custo e que vem sendo utilizado nos últimos anos como uma alternativa ao uso de mamíferos em pesquisas de base com produtos naturais. Neste trabalho não foi verificada a dose letal do EEGP, mas o ensaio mostra um potencial uso futuro do extrato em pesquisas. Dessa forma, observa-se também que as concentrações de EEGP utilizadas para o teste de CIM e CMM são aparentemente seguras às células eucarióticas.

Ao avaliar o extrato etanólico de geoprópolis de *M. subnitida*, De Sousa et al. (2015) consideraram ausência de toxicidade do extrato ao ser avaliado no modelo utilizando-se *Artemia salina*. Apesar de ser em outro modelo, este demonstrando a baixa toxicidade das geoprópolis produzidas por diferentes espécies de abelhas em modelos *in vivo*.

### 6.5 Teste de viabilidade celular

Os resultados do teste de atividade antiproliferativa do extrato etanólico da geoprópolis de *M. rufiventris* estão expostos na Figura 10.

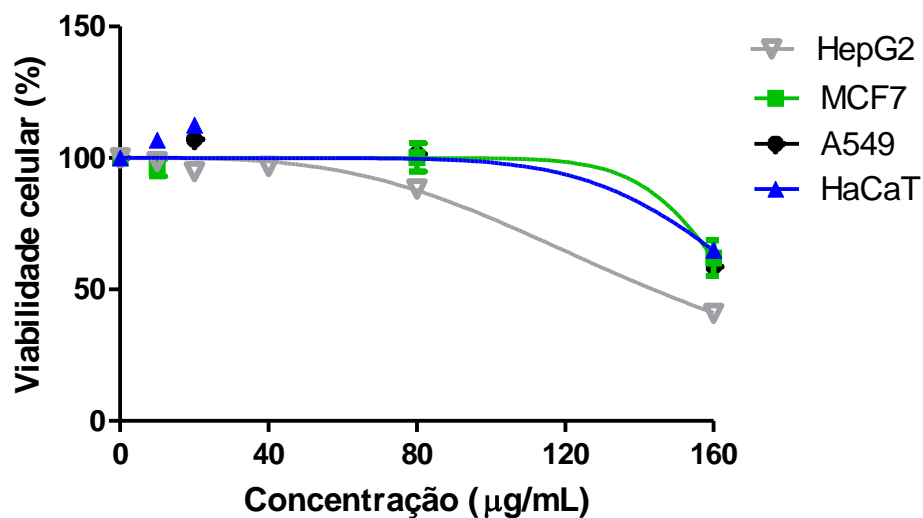


Figura 13 - Viabilidade celular do EEGP realizada pelo teste de MTS.  
Fonte: autora.

Nota: HepG2 - carcinoma hepatocelular; MCF7 - adenocarcinoma de mama; A549 - carcinoma pulmonar; HaCat – queratinócito (não tumoral).

De acordo com Fouche e colaboradores (2008), extratos de produtos naturais apresentam potente atividade antiproliferativa quando a inibição total de crescimento é  $<6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , atividade moderada pode ser considerada para a inibição total de crescimento entre  $6,25$  e  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ , fraca atividade para inibição total entre  $15$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e inativo quando a inibição total de crescimento é  $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Como observado na Figura 10, o extrato pode ser considerado inativo quanto a sua atividade antiproliferativa pois a concentração capaz de inibir significativamente a quantidade de células é acima de  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ainda, essa concentração afetou também o número de células não tumorais (HaCat), diminuindo a porcentagem de células viáveis em aproximadamente 50%, podendo-se inferir que essa concentração pode ser tóxica para as células no modelo *in vitro* utilizado. Deve-se considerar que esse modelo *in vitro* traz uma ideia da interação entre o composto e as células, mas pode não condizer totalmente com o que acontece com um organismo vivo, uma vez que no organismo há interações entre diversos tipos celulares bem como diferentes substâncias extra e intracelulares. Para Tan e Lim (2015), todos os resultados gerados em análises *in vitro* são precisos dentro das condições de reação daquele ensaio (pH, temperatura, reagentes). Seria impreciso extrapolar amplamente a atividade de uma amostra baseada puramente em ensaios *in vitro*. Esse fato pode ser percebido ao comparar-se os resultados da toxicidade *in vivo* no modelo de *G. mellonella* e a toxicidade apresentada contra o queratinócito utilizado neste teste. No caso, a *G. mellonella* suportou concentrações de até  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que são superiores às consideradas tóxicas para a célula não tumoral HaCat ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Apesar da controvérsia, os ensaios *in vitro* para atividades biológicas continuam sendo comuns em trabalhos com produtos naturais por conta da sua facilidade, rapidez e reprodutibilidade, que são características valiosas na triagem de amostras.

## 7 CONCLUSÃO

O perfil químico do extrato etanólico de geoprópolis indica a presença de compostos fenólicos, confirmada pelo método do Folin-ciocalteau. Ainda, a própolis também apresenta terpenos e saponinas, como analisado nos métodos cromatográficos e espectrofotométricos.

Esses compostos podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada no extrato, além da atividade anti-inflamatória e antioxidante.

Como o extrato não apresentou toxicidade no modelo *in vivo* utilizado, as atividades biológicas encontradas são significativas nas concentrações testadas.

O extrato não apresentou atividade antiproliferativa no modelo *in vitro* utilizado.

São necessários ainda estudos mais profundos sobre a composição química deste extrato para que se possa ter uma identificação precisa dos compostos presentes na geoprópolis de *M. rufiventris*.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, B. V. DE B. **Bioprospecção de pólen de *Melipona fasciculata* SMITH**. 2016. 87 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Maranhão, 2016.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007.
- ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- APERIS, G. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Franciella tularensis* live vaccine strain. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 6, 2007.
- ANSARI, S. et al. Recent advances in *Staphylococcus aureus* infection : focus on vaccine development. **Infection and Drug Resistance**, 2019.
- ARAUJO, M. **Geoprópolis de *Melipona fasciculata* SMITH: ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica**. 2013. 93 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, 2013.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 11, p. 419–421, 2001.
- ÁSSIMOS, A. A. **Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração**. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 361–367, 1998.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005.
- BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 3, p. 342–350, 2004.
- BATISTA, M. C. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 315–322, 2016.
- BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385–395, 2012.

- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health : an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 6419, p. 1–25, 2018.
- BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: Mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 1–9, 2015.
- BONAMIGO, T. 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, p. 1–12, 2017.
- BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n. 3 de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 2001.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, 2009.
- BROWN, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 13, n. 10, 2015.
- BÚFALO, M. C. et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, 2013.
- CAI, L. **Thin layer chromatography**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 2014
- CARDOZO, D. 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. 2457–2474, 2015.
- CARPES, S. T. **Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Pólen Apícola de *Apis mellifera* L. da Região Sul do Brasil**. 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2008.
- CHEN, Y.; KOPS, C. DE B.; KIRCHMAIR, J. Data Resources for the Computer-Guided Discovery of Bioactive Natural Products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 9, p. 2099–2111, 2017.
- CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 2011.
- CINEGAGLIA, N. C. et al. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma cells. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 11th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 4<sup>a</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COELHO, G. R. et al. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *scaptotrigona postica* against antih herpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

COELHO, J. P. M. **Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil . Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas**. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais) - Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

COLOMBO, A. L.; JÚNIOR, J. N. D. A.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 528–538, 2017.

CORTOPASSI-LAURINO, M. et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275–292, 2006.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99–107, 2011.

DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, 2013a.

DA CUNHA, M. G. et al. Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013b.

DA CUNHA, M. G. et al. Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, v. 82, n. 3, p. 190–194, 2016a.

DA CUNHA, M. G. et al. Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 27–35, 2016b.

DA SILVA, E. C. C. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova Nova**, v. 36, n. 5, p. 628–633, 2013.

DA SILVA, L. R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, p. 36–43, 2015.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

DE OLIVEIRA, F. et al. **Fundamentos de cromatografia aplicada a fitoterápicos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

DE SOUSA, D. M. N. et al. Prospecção fitoquímica, toxicidade *in vitro* e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 134–140, 2015.

- DE SOUZA, S. A. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303–336, 2012.
- DOS SANTOS, C. M. et al. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017a.
- DOS SANTOS, H. F. 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, 2017b.
- DOS SANTOS, T. L. A. et al. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2017c.
- DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197–201, 2007.
- DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 2014.
- FARNESI, A. P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneas em microorganismos**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos: compostos majoritários de óleos essenciais. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120–130, 2016.
- FERREIRA, J. M. et al. Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- 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.
- FOKT, H. et al. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. **Applied Microbiology**, n. January, p. 481–493, 2010.
- FORASTIERO, A. et al. Rapid Development of *Candida krusei* Echinocandin Resistance during Caspofungin therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 6975–6982, 2015.
- FOUCHE, G. et al. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455–461, 2008.
- FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 709–715, 2012.

- FRANCHIN, M. et al. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- FRANCHIN, M. et al. Cinnamoyloxy-mammeisin Isolated from Geopropolis Attenuates Inflammatory Process by Inhibiting Cytokine Production: Involvement of MAPK, AP-1, and NF- $\kappa$ B. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 7, p. 1828–1833, 2016.
- FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, 2018.
- FREITAS, A. D. S. DE; BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. DA. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 343–354, 2010.
- FREITAS, M. O. et al. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532–535, 2008.
- GOSTINSKI, L. F. **Recursos alimentares e forrageamento de duas espécies de abelhas sem ferrão - *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 e *Melipona (Michmelia) flavolineata* Friese, 1900 (Apidae, Meliponini) - na região da baixada maranhense, Brasil**. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão, 2018.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importânciaterapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novosagentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, 2012.
- HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.
- HIPÓLITO, T. M. M. **Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*: determinação da composição química e atividades biológicas**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, 2013.
- HUANG, S. et al. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.
- IKEGAKI, M. **Determinação da qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis**. 2001. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- KEIHANIAN, F. et al. Epidemiology of antibiotic resistance of blood culture in educational hospitals in Rasht, north of Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1723–1728, 2018.



KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, 1999.

LIBERIO, S. 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.

LOPES, D. M. **Análises moleculares em *Melipona rufiventris* E *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae)**. 2008. 160 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

MADOGLIO, F. A. **Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis**. 2011. 219 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?. **Critical Care**, v. 10, n. 208, 2006.

MARKET RESEARCH FUTURE. **US Propolis Market Research Report – Forecast 2016-2027 | MRFR**. Disponível em: <<https://www.marketresearchfuture.com/reports/propolis-market-782>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.

MOREIRA, L. L.; ROGÃO, M.; ESTEVINHO, L. O Apicultor - Revista de Apicultura. **Portuguese Beekeeping Magazine**, 2011.

MOURÃO, L. R. M. B. **Entudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2013.

NEGRI, M. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, 2012.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, 2007.

OLIVEIRA, L. P. G. et al. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1551–1558, 2016.

OLIVEIRA, L. P. G. et al. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1551–1558, 2016.

- OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 2015.
- PADUCH, R. et al. Terpenes : substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 315–327, 2007.
- PALATA, O. et al. Radiotherapy in Combination With Cytokine Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. May, p. 1–14, 2019.
- PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F. AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.
- PAULINO, N. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Planta Medica**, v. 72, n. 10, p. 899–906, 2006.
- PELEG, A. Y. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, 2009.
- PEREIRA, A. DOS S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 Anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321–326, 2002.
- PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, p. 1–6, 2017.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019.
- RIBEIRO-JUNIOR, J. A. et al. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- RODRIGUES, A. C. et al. **Estudo químico das pétalas, folhas, cálices e sementes de *Hibiscus sabdariffa* L.** 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2017.
- ROHR, G. E. **Analytical investigation on and isolation of procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers.** 1999. 388 f. Tese (Doutorado) – Swiss Federal Institute of Technology of Zurich, 1999.
- RUBINHO, M. P. et al. A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis and their antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. **Natural Product Research**, p. 1–6, 2019.
- SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v.

39, n. 10, p. 1192–1199, 2016.

SANCHES, M. A. A própolis de abelhas sem ferrão e suas propriedades terapêuticas. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

SARDI, J. DE C. O. 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, 2017.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327–333, 2006.

SEVALHO, E. DE S.; ROCHA, W. C. Potencial antioxidante dos diferentes extratos de *Morinda citrifolia* por TLC-DPPH. **Conexão Ciência (Online)**, v. 12, n. 1, p. 72–77, 2017.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1–2, p. 243–249, 2000.

SILVA, B. B. et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1583–1590, 2016a.

SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874–880, 2016b.

SILVA, V. et al. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6430–6437, 2011.

SILVA, W. P.; LIMA, J. R.; PAZ, D. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146–152, 2012.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras - Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1998.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOROMOU, L. W. et al. In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 66–74, 2012.

SZLISZKA, E. et al. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015.

TIMURKAYNAK, F. et al. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in

combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, p. 224–228, 2006.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–11, 2016.

TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. A meliponicultura e a iniciativa brasileira dos polinizadores. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191–196, 1993.

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. 1–10, 2018.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2010.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439–444, 2013.

WAGH, V. D. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, 2013.

WANG, Y. et al. Formononetin attenuates IL-1 $\beta$ -induced apoptosis and NF- $\kappa$ B activation in INS-1 cells. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10052–10064, 2012.

WHO. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. **World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–394, 2014.

WOJTYCZKA, R. D. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9623–9640, 2013.

YANG, F. et al. Genome-wide investigation of biofilm formation in *Bacillus cereus*. **American Society for Microbiology**, v. 83, n. 13, p. 1–18, 2017.

ZHANG, X. et al. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in Macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–18, 2014.

ZHAO, L. et al. Rapid determination of major compounds in the ethanol extract of geopropolis from Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017.



**Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº A5F3CCB**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A5F3CCB**  
Usuário: **UNIFAL-MG**  
CPF/CNPJ: **17.879.859/0001-15**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Melipona scutellaris**  
**Frieseomelitta varia**  
**Melipona quadrifasciata**  
**Melipona rufiventris**  
**Scaptotrigona bipunctata**  
**Nannotrigona testaceicornis**

Título da Atividade: **Determinação da composição química e atividade biológica de própolis e geoprópolis de abelhas nativas sem ferrão de diferentes localidades do Brasil.**

**Equipe**

**Masaharu Ikegaki** **UNIFAL-MG**  
**Severino Matias de Alencar** **ESALQ-USP**  
**Pedro Luiz Rosalen** **FOP-Unicamp**

<b>Marcelo Franchin</b>	<b>FOP-Unicamp</b>
<b>Marcos Guilherme da Cunha</b>	<b>FOP-Unicamp</b>
<b>Taciane Maira Magalhães Hipólito</b>	<b>UNIFAL-MG</b>
<b>Ana Lucia Tasca Gois Ruiz</b>	<b>CPQBA-UNICAMP</b>
<b>João Ernesto de Carvalho</b>	<b>CPQBA-UNICAMP</b>
<b>Mariana Bastos Bernardes de Oliveira Camilo</b>	<b>UNIFAL-MG</b>
<b>Rodrigo Teodoro Cartaxo</b>	<b>UNIFAL-MG</b>
<b>Marina Prado Rubinho</b>	<b>UNIFAL-MG</b>
<b>Amanda Tristão Santini</b>	<b>UNIFAL-MG</b>
<b>Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho</b>	<b>UNIFAL-MG</b>

Data do Cadastro: **01/11/2018 15:49:45**  
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **21:22** de **13/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**