

Tatiane Matarazzo Cantero Campos

Avaliação de atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos extratos alcoólico e aquoso da própolis de *Scaptotrigona affinis postica*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

Tatiane Matarazzo Cantero Campos

Avaliação de atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos
extratos alcoólico e aquoso da própolis de *Scaptotrigona affinis*
postica

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia
do Instituto Butantan para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador: Ronaldo Zucatelli Mendonça

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Campos, Tatiane Matarazzo Cantero

Avaliação de atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos extratos alcoólico e aquoso da própolis de *Scaptotrigona affinis postica* / Tatiane Matarazzo Cantero Campos ; orientador Ronaldo Zucatelli Mendonça. – São Paulo, 2019.

111 f/p. : il. color.

Dissertação (Doutorado) – Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Bioprospecção de moléculas.

1. Abelhas. 2. Própolis. 3. Anti-Infeciosos. 4. Trypanosoma cruzi. 5. Doenças Parasitárias. I. Mendonça, Ronaldo Zucatelli. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

CDD 615.9

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Tatiane Matarazzo Cantero Campos, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação após a data da defesa:

- () Imediato
() 06 meses
(x) 12 meses
() Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 29 de outubro de 2019.

TM
.....
Aluna: Tatiane Matarazzo Cantero Campos

De acordo: *Ronaldo Zucateki Mendonça*
.....
Orientador: Ronaldo Zucateki Mendonça



PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
MESTRADO

NOME DA ALUNA: TATIANE MATARAZZO CANTERO CAMPOS

DATA DO EXAME: 29/10/2019

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Ronaldo Zucatelli Mendonça (Presidente)		(X)	()
Hugo Vigerelli de Barros		(X)	()
Daniela Luz Hessel da Cunha		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ()

Comentários da Banca (opcional):

Av. Vital Brasil, 1500
São Paulo, 05503-900
Tel./Fax: (11) 2627-9767
cp@butantan.gov.br
http://posgraduacao.butantan.gov.br

Dedico esse trabalho aos meus
queridos pais e irmã.
À minha amada família, Jonatan
e minha bonequinha Giovanna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e conquistas ao longo da minha vida.

Agradeço, ao Prof. Ronaldo Zucatelli Mendonça, por aceitar ser meu orientado, possibilitando a execução desse projeto e, pelos valiosos ensinamentos científicos.

Agradeço, com muito carinho, ao Prof. Pedro Ismael da Silva Junior pela acolhida no laboratório, pela paciência e conversas do dia-a-dia. Um agradecimento especial aos alunos e funcionários do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, por me receberem sempre gentis e solícitos para tirar qualquer dúvida por mais boba que fosse. Soraia, Patrícia, Débora, Thiago, Sandra, Bruna e Rosa, Laura e Andrea.

A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia Arlete, Fernando, Simone Guedes, Simone Simon, Solange, Leo, Patricia, Rafaela, Rafael, Felipe Hamilton André, Isabel e Karina e todos que de alguma forma contribuíram para desse trabalho, a Jade pela conversas e risadas entre um experimento e outro e especialmente funcionária e amiga Ms. Juliana Cuoco Badari, por todo o tempo despendido me ajudando no laboratório com meus experimentos, e auxílio na correção dos meus textos.

Aos colegas da pós-graduação, Carol, Nathália, Fabio, Juliana e Walter que durante este período tornaram-se meus amigos. Obrigada pela torcida incentivo, e convivência. Obrigada Carol pela ajuda na formatação!

A secretaria da pós-graduação, em especial a Kimie e Rosana, sempre solícitas ajudando a todos os alunos.

A querida Gina, nossa colaborada na identificação dos compostos da própolis.

Ao Roberto que trouxe a própolis para o laboratório. Sem você esse trabalho não teria sido realizado!

Ao Apicultor Wilson que gentilmente nos cedeu a própolis.

As minhas amigas Eliz, Fabi, Taina e Leticia, pelas risadas desde a faculdade e vida adentro.

Aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional em todas as horas, principalmente nessa reta final, olhando minha menina para eu terminar de escrever a dissertação, meu agradecimento mais que especial!

Aos meus sogros Maria e Vivaldo, cunhadas Bia, Nete e Lara e cunhados Eduardo e Pedro, por cuidarem da Gigi nos fins de semana durante a escrita da dissertação.

Ao meu amado marido, pela paciência e companheirismo.

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho!

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, que foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

“Um homem de moral não fica no chão

Reconhece a queda e não desanima

Levanta, sacode a poeira e dá a volta por cima!”

Paulo Vanzolini

RESUMO

CAMPOS, Tatiane Matarazzo Cantero. **Avaliação de atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos extratos alcoólico e aquoso da própolis de *Scaptotrigona affinis postica***. 2019. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) - Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

A própolis é produto natural produzido pelas abelhas. Seus componentes majoritários são as resinas, compostos químicos derivados de plantas, o que lhes confere potencial farmacológico. Já foi demonstrado que as moléculas encontradas nas própolis têm grande potencial antimicrobiano, antifúngico e antiparasitário. No Brasil, a própolis da abelha *Scaptotrigona aff. postica* (abelha indígena sem ferrão) é utilizada no interior do estado do Maranhão no tratamento de feridas pela população, mas poucos são os estudos realizados para melhor compreender suas atividades biológicas. Com o surgimento de microrganismos resistentes à ação dos antibióticos, há interesse em investigar novas substâncias que possam vir a ser novas descobertas de antimicrobianos. A doença de Chagas (doença tropical negligenciada), também necessita de medicamentos mais eficazes, pois acarretam milhares de mortes anualmente, além de redução da capacidade produtiva. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial biológico da própolis de *S. aff. postica*. Para tanto, foram realizadas duas etapas de extrações, com água e metanol. Os extratos foram testados contra cepas bacterianas, fúngicas e contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Os extratos testados não apresentaram citotoxicidade para células de mamíferos, nas concentrações em que exibiram atividade antimicrobiana. Após uma etapa de purificação, observou-se que as frações eluídas inibiram o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* e de duas cepas de *Escherichia coli*. Essas frações foram submetidas a análise por MS/MS para identificação dos compostos presentes. As principais substâncias identificadas foram: compostos polifenólicos, flavonoides e majoritariamente alcalóides. O trabalho é pioneiro no estudo e identificação de frações de extratos da própolis *S. postica*, bem como, no teste antiparasitário.

Palavras-chave: *Scaptotrigona*. Própolis. Anti-Infeciosos. *Trypanosoma cruzi*. Doenças Parasitárias.

ABSTRACT

CAMPOS, Tatiane Matarazzo Cantero. **Evaluation of antimicrobial and antiparasitic activities of alcoholic and aqueous extracts from *Scaptotrigona affinis postica* propolis**. 2019 111 p. Dissertation (Master in Science – Toxicology) Instituto Butantan, São Paulo, 2019.

Propolis is a natural product made by bees and mainly composed by resins, which are chemical compounds derived from plants with pharmacological potential. Antimicrobial, antifungal and antiparasitic potential has already been demonstrated in the literature. Propolis from *Scaptotrigona aff. postica* bee (indigenous stingless bee) is traditionally used in the Brazilian State of Maranhão countryside for the treatment of wounds, but few studies were conducted to understand the biological mechanism behind this activity. Micro-organisms resistance to antibiotics is growing, arising interest in investigating new antimicrobial compounds discovery. The Chagas disease (tropical disease neglected) also demands more effective medicines, causing thousands of deaths annually, and reducing productive capacity. The objective of the present study was evaluate *S. postica* propolis potential. For this purpose, two extraction steps were held using water and methanol. The extracts were tested against bacterial strains, fungal strains, and *Trypanosoma cruzi*. The extracts did not present cytotoxicity for mammalian cells, in the concentration which showed microbial activity. One step purification was carried out, through extraction in solid phase, and the fractions eluted. Then antimicrobial activity was evaluated against bacterial strains. Inhibition in the growth of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli* strains was observed. These fractions were submitted to MS/MS analysis to identification from compounds. The substances identified were polyphenolic, flavonoids, and alkaloids. This study is a pioneer in identifying biological activities from propolis *S. postica* fractions extracts and search for antiparasitic activity.

Keywords: *Scaptotrigona*. Propolis. Anti-Infective Agents . *Trypanosoma cruzi*. Parasitic Diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Impacto da própolis na colmeia	21
Figura 2 - Tratamento de escaras com pomada produzida a partir da própolis de <i>S. aff postica</i>	28
Figura 3 - Descoberta das classes de drogas antibacterianas	30
Figura 4 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	35
Figura 5 - Município de Barra do Corda, Maranhão, Brasil	39
Figura 6 - Própolis da abelha <i>S. postica</i>	40
Figura 7 - Esquema representativo do ensaio inibição de crescimento microbiano em meio líquido.....	46
Figura 8 - Extratos da própolis	51
Figura 9 - Viabilidade celular frente a tratamento com as amostras EAP e EMP, da própolis de <i>S.postica</i>	54
Figura 10 - Extração em fase sólida.....	55
Figura 11 - Viabilidade celular de fibroblastos frente ao tratamento com as frações 40 AQ e 40 AL.....	58
Figura 12 - Cromatograma da amostra 40 AL.....	59
Figura 13 - Cromatograma da amostra 40 AQ	60
Figura 14 - Curva de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	62
Figura 15 - Curva de crescimento da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	63
Figura 16 - Viabilidade celular de LLMC-MK2 frente ao tratamento contra amostra EMP	64
Figura 17 - Viabilidade celular de LLMC-MK2 frente ao tratamento contra amostra EMP.	65
Figura 18 - Perfil cromatográfico da fração 40 AL.....	66
Figura 19 - Perfil cromatográfico da fração 40 AQ	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antibacteriana de diferentes extratos da própolis vermelha.....	26
Tabela 2 - Esquema de gradiente da cromatografia em fase reversa das frações 40 AL e 40 AQ.....	49
Tabela 3 - Teste de inibição do crescimento de microrganismos em meio líquido (screening de atividade).....	52
Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória mínima (MIC) dos extratos brutos aquoso (EAP) e metanólico (EMP).....	53
Tabela 5 - Teste de inibição do crescimento de microrganismos em meio líquido pelas frações.....	56
Tabela 6 - Determinação da Concentração Inibitória mínima (MIC) das frações 40 AL e 40 AQ.....	57
Tabela 7 - Atividade antimicrobiana das sub frações 40 AQ e 40 AL.....	61
Tabela 8 - Compostos identificados nas frações 40 AL e 40 AQ.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ATCC	Coleção Americana de tipos de Cultura Celular
CFU	Unidade Formadora de Colónias
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase reversa
CLSI/NCCLS	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMEM	<i>Dulbecco modification of Minimum Essential Media</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNTs	Doenças tropicais negligenciadas
EAP	Extrato aquoso da própolis
EMP	Extrato metanólico da própolis
ESI-Q-TOF	<i>"Electrospray ionization - Quadrupole -Time of flight"</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
L-15	Leibovitz
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-mass spectrometry</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LLC-MK2	Células renais de Macaco Rhesus
m/z	massa/carga
MALDI - TOF	<i>"Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of flight"</i>
MBC	Mínima Concentração Bactericida
MDM	Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
MIC	Mínima Concentração Inibitória
MS	Espectrometria de massas
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-1) 2,5 – difenil tetrazólio brometo]
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	<i>Poor Broth</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PDB	<i>Poor Dextrose Potato Broth</i>
<i>S. aff. postica</i>	<i>Scaptotrigna aff. postica</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
TFA	Ácido trifluoracético
VERO	Células renais de macaco verde da África

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 As abelhas	20
1.2 Própolis	21
1.2.1 Resinas descritas na própolis.....	22
1.2.2 Atividade biológica da própolis	23
1.3 Abelhas indígenas sem ferrão	27
1.3.1 <i>Scaptotrigona aff. postica</i>	27
1.4 Resistência microbiana	29
1.5 Doença de Chagas	33
1.5.1 Manifestação clínica e tratamento.....	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Método de extração	39
3.1.1 Obtenção do extrato aquoso	39
3.1.2 Extração alcoólica	40
3.2 Ensaio de viabilidade celular	41
3.2.1 Linhagem celular e meio de cultivo	41
3.2.2 Viabilidade celular pela técnica do MTT	41
3.2.3 Viabilidade celular pela técnica do <i>AlamarBlue</i>	43
3.3 Testes biológicos	44
3.3.1 Microrganismos	44
3.3.2 Preparo do inóculo	45
3.4 Ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido	45
3.4.1 Determinação da Mínima Concentração Inibitória (MIC).....	46
3.5 Parasita	47

3.5.1 Preparo do inóculo	47
3.5.2 Ensaio de inibição de crescimento	47
3.6 Separação das moléculas.....	48
3.6.1 Preparação.....	48
3.6.2 Extração em fase sólida	48
3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).....	49
3.8 Espectrometria de massas	50
3.9 Análise Estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Extração	51
4.2 Ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido	51
4.3 Avaliação da viabilidade celular	53
4.4 Extração em fase sólida.....	54
4.5 Atividades antimicrobianas das frações	55
4.6 Viabilidade Celular	57
4.7 Fracionamento cromatográfico através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa CLAE-FR	58
4.8 Atividades antimicrobianas das sub frações.....	60
4.9 Ensaio de inibição de crescimento.....	61
4.10 Viabilidade celular (células LLC-MK2).....	63
4.11 Análise dos dados de espectrometria de massas.....	65
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82
APENDICE A	97
APENDICE B	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 As abelhas

As abelhas são classificadas como insetos de vida sociais, ou seja, vivem em colônias densamente povoadas. São insetos que vivem em comunidades, habitam ninhos que exigem estratégias de defesas, especialmente àquelas ligadas à redução do risco a infecções (Otti; Tragust; Feldhaar, 2014).

Os habitats de insetos de vida social estão mais propensos a ataques de parasitas e patógenos (Morse; Flottum, 1997), no entanto, evoluíram para combater esses desafios contando com um sistema imune social, cuja principal função é diminuir o risco da comunidade. A imunidade social é formada por defesas comportamentais entre os membros de um grupo que resultam especificamente na prevenção ou redução de doenças infecciosas, aumentando a saúde e sobrevivência da colônia (Figura 1) (Cremer; Pull; Fürst, 2017).

Nas colônias as abelhas apresentam alguns comportamentos que são tidos como formadores da imunidade social. Esses comportamentos consistem na adição de antimicrobianos ao mel, a auto e coletiva higienização, remoção de ninhadas doentes e adição da própolis nas paredes do ninho (Otti; Tragust; Feldhaar, 2014; Sforzin, 2016; Simone-Finstrom et al., 2017).

A própolis desempenha diferentes funções dentro da colmeia, como por exemplo, a aplicação em camadas na parte interna da colmeia impermeabiliza e conserva as paredes, fortalecendo e bloqueando fissuras, mantendo a temperatura e a umidade estáveis, além de reduzir e inibir invasões parasitárias. Ela também é utilizada como uma substância de "embalsamamento" de invasores ou mesmo de abelhas mortas, impedindo o crescimento de microrganismos provenientes da putrefação. (Ghisalberti, 1979; Bankova; Castro; Marcucci, 2000).

Figura 1 - Impacto da própolis na colmeia



Na figura é ilustrado o impacto benéfico da própolis na colmeia.

Fonte: Adaptado de Simone-Finstrom et al., 2017.

1.2 Própolis

A composição da palavra própolis decorre do grego “pró” que significa “em defesa” e “polis” que significa “cidade”, ou seja, “em defesa da cidade” (Ghisalberti, 1979). É uma substância com aspecto resinoso, devido à mistura de resinas das plantas, pólen, cera e enzimas (Sforcin, 2016).

As características protetivas designadas às própolis estão intrinsecamente ligadas às resinas, porque são elas que apresentam o potencial biológico (Simone-Finstrom et al., 2017). O primeiro estudo científico sobre a própolis, sua composição química e atividade biológica foi publicada em 1908 (Anjum et al., 2018). Na literatura já foram descritos mais de 300 compostos químicos associados às resinas (Sforcin; Bankova, 2011; Cornara et al., 2017). Essa complexidade de substâncias, faz da própolis um excelente produto natural para uso medicinal. A própolis é usada como medicamento desde os anos 300 (Anjum et al., 2018), onde os povos Incas e Egípcios utilizavam-na para tratamento de resfriados, feridas, úlceras e até mesmo como agente mumificador (Ghisalberti, 1979). No século XVII, a própolis foi

reconhecida como o mais eficaz tratamento de feridas (Anjum et al., 2018). Há relatos de que no século XIX o uso da própolis, durante a guerra dos “Bôeres”, era amplamente disseminado como cicatrizante e regenerador tecidual (Ghisalberti, 1979). Já no século XX, durante a Segunda Guerra Mundial, a antiga União Soviética costumava utilizá-la nos tratamentos contra tuberculose, obtendo sucesso na regressão dos problemas pulmonares (Pereira; Seixas; Aquino Neto, 2002). Na Península Balcânica ainda é amplamente usado como remédio para tratamento de feridas, queimaduras e úlceras gástricas (Bankova, 2005).

O sucesso no uso da própolis em diferentes tratamentos está associado à origem geográfica das colmeias, a vegetação local, estação do ano e a espécie da abelha, pois são essas características que determinam sua composição química (Bankova; Castro; Marcucci, 2000; Oryan; Alemzadeh; Moshiri., 2018). A produção consiste na coleta da resina das plantas (broto e folhas jovens) pelas abelhas. No ninho manipulam os compostos variando a quantidade de cera, resina e secreções glandulares, essa mistura é parcialmente digerida dando origem à própolis (Ghisalberti, 1979; Zhang; Zheng; Hu, 2011). No geral, encontramos na própolis a proporção de 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, e 5% de pólen e outras substâncias (Burdock, 1998).

1.2.1 Resinas descritas na própolis

As resinas são substâncias pré-formadas produzidas por metabólitos secundários das plantas, com funções específicas como, por exemplo, pigmentação de flores para atração de insetos polinizadores, ação repelente e mecanismos de defesa contra microrganismos patógenos (Garcia; Carril, 2009).

Na própolis as resinas contêm o papel fundamental de ação microbicida, por isso é utilizada na proteção profilática de combate aos microrganismos. Esse mecanismo de defesa é fundamental para a proteção e sobrevivência das abelhas. Estudos demonstram que epidemias nos ninhos diminuem tanto a produtividade (Evans; Pettis, 2005), quanto o número de abelhas (Moret; Schmidt, 2000). Assim, a capacidade das abelhas em recolher determinada substância é considerada um mecanismo evolutivo para benefício da colônia (Simone-Finstrom *et al.*, 2017).

Alguns dos compostos mais importantes descritos na própolis são:

- Flavonoides: são os principais constituintes da própolis, contribuem para muitas atividades biológicas (antivirais, antimicrobianas e anti-inflamatórias). Podem ser classificados em flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, chalconas, diidrochalconas, isoflavonas, isoflavanas e neoflavonoides (Huang *et al.*, 2014; Zabaïou *et al.*, 2017);
- Terpenóides: são responsáveis pelo odor característico de resina na própolis e apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas (Huang *et al.*, 2014; Zabaïou *et al.*, 2017);
- Fenóis: são compostos por diferentes ácidos, como o ácido cinâmico. Demonstram especialmente atividades antimicrobianas (Huang *et al.*, 2014; Zabaïou *et al.*, 2017).

A espécie de abelha mais estudada no mundo é a *Apis melífera* (Bankova; Castro; Marcucci, 2000). No Brasil a própolis dessa espécie foi classificada em 12 grupos distintos, de acordo com suas características físico-químicas e local de origem, destacando-se a própolis vermelha, verde e marrom. Os principais compostos isolados foram o ácido cumárico, ácido ferúlico, pinobanksina, canferol, apigenina e o ácido caféico (Park; Alencar; Aguiar, 2002). Os componentes das própolis brasileira vermelha e verde são comumente extraídos das espécies *Baccharis spp*, *Dalbergia ecastaphyllum*, *Betula verrucosa*, *Betula pendula* e *Betula pubescens* e são compostos por fenilpropanoides, ácidos diterpênicos e triterpenóides (Zabaïou *et al.*, 2017).

Na Europa, América do Norte e zonas temperadas predominam na própolis os compostos flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres (Falcão *et al.*, 2010). No Mediterrâneo, prevalecem os terpenóides (Popova *et al.*, 2010; Popova *et al.*, 2011). Na África os principais compostos são os triterpenóides (Zabaïou *et al.*, 2017).

1.2.2 Atividade biológica da própolis

Por apresentar grande potencial farmacológico, a própolis passou a ser alvo de diversas pesquisas, despertando o interesse da sociedade científica, que tem se intensificado nas últimas décadas (Bankova, 2005; Araújo *et al.*, 2010).

Os solventes alcoólicos são considerados os melhores na extração das substâncias químicas da própolis, resultando em extratos com maior ação farmacológica (Mello; Hubinger, 2012). No trabalho de Sun *et al.* (2015) foi

observada a avaliação do rendimento, a concentração dos compostos e a ação antioxidante da própolis com diferentes solventes. Os solventes utilizados foram água e etanol, este último em diferentes concentrações. Os resultados obtidos por eles indicaram que o extrato proveniente da concentração de 75% de etanol destacou-se, obtendo o melhor rendimento, a maior variedade de compostos fenólicos, além de substâncias pouco polares, apolares, e com atividade antioxidante mais pronunciada que os demais extratos.

A água não é considerada um bom solvente na extração da própolis, devido as substâncias biologicamente ativas desta terem baixa solubilidade em água (Sforcin, 2016). A quantidade de compostos fenólicos em extratos aquosos é 10 vezes menor do que em extratos alcoólicos. Nesse contexto, há poucos dados sobre produções de extratos utilizando a água como solvente (Kubiliene *et al.*, 2015). Ainda assim, encontramos estudos descrevendo a ação antitumoral, efeito protetivo contra metástase e ação modulatória, de substâncias solúveis em água (Orsolich *et al.*, 2004). Também há registros na literatura em que o extrato aquoso também inativou o vírus da Herpes do tipo HVS-1 (Schnitzler *et al.*, 2010) e exibiu ação antimicrobiana contra as bactérias *Helicobacter pylori* e *Salmonella Thyphimurium* (Oliveira *et al.*, 2017).

As técnicas de extração dos compostos da própolis não seguem uma padronização na ciência (Sforcin, 2016), ou seja, diferentes técnicas obtêm compostos que potencializam diferentes atividades biológicas, como por exemplo, ações antimicrobiana, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Zabaiou *et al.*, 2017).

A origem geográfica influencia diretamente nos metabolitos secundários presentes na própolis (Oryan; Alemzadeh; Moshiri, 2018), modificando a ação do extrato de própolis, como por exemplo, a inibição de mastócitos nas reações alérgicas (Nakamura *et al.*, 2010).

A sazonalidade das estações é outro fator determinante dos efeitos terapêuticos (Galeotti *et al.*, 2018). A ação antimicrobiana da própolis colhida nas estações secas inibiu 100% o crescimento das cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em comparação ao extrato colhido nas estações chuvosas (Regueira *et al.*, 2017).

Na história, a própolis vem sendo utilizada em diversas situações e hoje em dia, a ingestão regular de própolis é indicada pela medicina tradicional como um

suplemento alimentar (Búfalo *et al.*, 2014), modulando o processo da resposta imune primária (Machado *et al.*, 2016).

Dentre os efeitos mais pronunciados, as ações antimicrobiana e antiviral ganham destaque. No tratamento de herpes genital contra o vírus HVS-1e HVS-2, o extrato da própolis atuou melhor que a droga padrão ouro indicada para o tratamento. Extratos aquoso e alcoólico impediram a entrada do vírus na célula hospedeira, bem como, inibiram a replicação viral (Cornara *et al.*, 2017; Vynograd; Vynograd; Sosnowsk, 2000; Bankova *et al.*, 2014; Schnitzler *et al.*, 2010).

A propriedade antimicrobiana é uma característica intrínseca da própolis (Sforcin; Bankova, 2011). Os flavonóides, demonstram os melhores resultados no combate aos microrganismos. Outros compostos, que não são da mesma classe, principalmente os ácidos p-cumáricos prenilados e diterpenos e triterpenos também mostram atividade antimicrobiana (Bankova, 2005). Alguns dos mecanismos de ação documentados na literatura são: danos à membrana celular (causada pela redução da fluidez ou por aumento da permeabilidade), inibição da síntese de ácidos nucleicos, danos metabólicos (ocasionado pela inibição do NADH citocromo redutase), inibição da formação de biofilme e inibição da motilidade bacteriana (Mirzoeva; Grishanin; Calder, 1997; Freires; Alencar; Rosalen, 2016a).

A própolis possui maior eficácia contra bactérias Gram-positivas e baixa ação contra bactérias Gram-negativas (Sforcin; Bankova, 2011; Sforcin, 2016; Dantas *et al.*, 2017). A própolis vermelha atraiu considerável atenção por suas propriedades antibacterianas (Neves *et al.*, 2016) (Tabela 1). A atividade antifúngica por outro lado, pode variar de acordo com a própolis estudada (Freires; Alencar; Rosalen, 2016a; Dantas *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Atividade antibacteriana de diferentes extratos da própolis vermelha.

Bactérias	Própolis	Solvente	MIC (µg/mL)	Referência
Gram-positiva				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Própolis vermelha(R01)	Etanol	125	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha(R01)	Fluido supercrítico	250	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha(S01)	Etanol	256	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Metanol	1.024	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Hexano	512	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Acetato de etila	512	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha (PED)	Etanol	101,6	Regueira <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha (PER)	Etanol	64	Regueira <i>et al.</i> , 2017
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Própolis vermelha(S01)	Etanol	256	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Metanol	1.024	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Hexano	128	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Acetato de etila	512	Neves <i>et al.</i> , 2016
<i>Enterococcus sp</i>	Própolis vermelha(R01)	Etanol	62.5	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha(R01)	Fluido supercrítico	125	Dantas <i>et al.</i> , 2017
Gram-negativa				
<i>Klebsiella sp</i>	Própolis vermelha(R01)	Etanol	62.5	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha(R01)	Fluido supercrítico	250	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha(S01)	Etanol	256	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Metanol	1.024	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Hexano	128	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha(S01)	Acetato de etila	512	Neves <i>et al.</i> , 2016
	Própolis vermelha (PED)	Etanol	512	Regueira <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha (PER)	Etanol	512	Regueira <i>et al.</i> , 2017
<i>Escherichia coli</i>	Própolis vermelha(R01)	Etanol	ND	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha(R01)	fluido supercrítico	ND	Dantas <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha (PED)	Etanol	512	Regueira <i>et al.</i> , 2017
	Própolis vermelha (PER)	Etanol	128	Regueira <i>et al.</i> , 2017

ND – não determinado

1.3 Abelhas indígenas sem ferrão

Conforme citado acima, a própolis da abelha *Apis mellífera* é a mais estudada (Bankova, 2000; Cunha *et al.*, 2015), contudo estudos sobre as demais própolis produzidas por diferentes espécies de abelhas requerem maior atenção (Cunha *et al.*, 2015).

Na América do Sul, existem as abelhas da subfamília *Meliponinae* (Velikova *et al.*, 2000), conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (Bankova; Castro; Marcucci, 2000; Nogueira-Neto, 1997; Silveira; Melo; Almeida, 2002). Pertencem à família *Apidae*, subfamília *Meliponinae* e habitam toda a área Tropical e Subtropical (Américas, África e Sudoeste da Àsia) (Nogueira-Neto, 1997). São abelhas pequenas, medindo cerca de 4mm, com ferrão atrofiado (Silveira; Melo; Almeida, 2002) e capazes de voar aproximadamente 500 metros (Velikova *et al.*, 2000). Geralmente, constroem seus ninhos em cavidades pré-existentes, como ocos de árvores e ninhos abandonados de cupins e formigas (Silveira; Melo; Almeida, 2002).

No Brasil, mais de 200 espécies de *Meliponinae* já foram descritas. A própolis dessas abelhas é usada no País como um remédio para cicatrização de feridas, gastrite e hemorroidas (Velikova *et al.*, 2000).

A meliponicultura, criação das abelhas indígenas sem ferrão (Nogueira-Neto, 1997), existia muito antes a chegada de Colombo (Velikova *et al.*, 2000). Hoje a meliponicultura é uma prática de pequenos produtores, como uma forma de fonte de renda complementar. A industrialização desse material ainda é um desafio, devido à baixa produtividade do mel e demais produtos dessa abelha (Nogueira-Neto, 1997). Além disso, a composição química e atividade biológica dessas própolis são pouco conhecidas (Velikova *et al.*, 2000).

1.3.1 *Scaptotrigona aff. postica*

Uma das espécies de abelha indígena sem ferrão é a *Scaptotrigona aff. postica* (Latreille, 1807), conhecida por “tupi” no Maranhão. Este gênero distribui-se nas regiões subtropicais do hemisfério sul (Silveira; Melo; Almeida, 2002).

A própolis dessa abelha é utilizada pela população de Barra do Corda, uma pequena cidade do Maranhão, para o tratamento de tumores e na cicatrização de feridas (Araújo *et al.*, 2010). Na Figura 2 observamos a evolução do tratamento para

escaras apenas com a utilização da pomada produzida com a própolis de *S. aff. postica*, que o grupo de pesquisa pode acompanhar.

Poucos são os estudos realizados com a própolis de *S. aff. postica*. Araújo *et al.* (2010) testou a ação da própolis contra o tumor de Ehrlich e concluiu que além da ação antitumoral, o extrato da própolis também apresentou ação imunomodulatória. O efeito terapêutico foi relacionado ao sinergismo das substâncias diterpenos e triterpenos, identificados no extrato.

O mesmo grupo avaliou o efeito citotóxico da própolis em camundongos nas doses de 1000, 2000 ou 4000 mg/kg⁻¹, num período de 14 dias, e nenhum efeito adverso foi observado (Araújo *et al.*, 2011).

Figura 2 - Tratamento de escaras com pomada produzida a partir da própolis de *S. aff postica*.



Na figura é apresentada a evolução do tratamento de escara com pomada desenvolvida a partir da própolis da abelha *S. aff postica*. O paciente foi tratado durante trinta dias, através de aplicação tópica da pomada, duas vezes ao dia. Ao final do tratamento foi observada cicatrização completa da ferida. (A) Antes do tratamento; (B) Depois do tratamento.

Fonte: Imagens cedidas por Roberto Manoel do Nascimento.

Efeitos anti-inflamatórios também foram relatados. Farias *et al.* (2014), em modelo experimental de asma, pôde observar que o tratamento com o extrato alcoólico reverteu o padrão celular inflamatório no pulmão e diminuiu o influxo de neutrófilos para a região inflamada. O resultado foi atribuído a inibição da produção do interferon-gama, em conjunto com um possível efeito antioxidante da própolis.

Alguns estudos sobre a ação antiviral dessa própolis demonstraram sua capacidade na inibição dos vírus da Herpes, Sarampo, Picornavírus e Rubéola (Coelho *et al.*, 2014; 2015).

Mesmo com escassa literatura sobre as atividades bioativas da própolis da abelha *S. aff postica* é possível afirmar o seu grande potencial, portanto, novos estudos se fazem necessários. Sabemos que os produtos naturais são fontes promissoras para descoberta de novos fármacos (Gordaliza, 2007; Zabaïou *et al.*, 2017). Cerca de 21% das drogas no mercado tiveram sua origem em produtos naturais (Newman; Cragg, 2016). Assim sendo, optamos por estudar o efeito antimicrobiano e antiparasitário dessa própolis.

1.4 Resistência microbiana

A descoberta dos antibióticos levou ao otimismo de que as infecções poderiam ser controladas e prevenidas (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017). No entanto, no final da década de 1950, foi detectada pela primeira vez a resistência a múltiplas drogas entre as bactérias entéricas (*Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*), porém a resistência aos fármacos só ganhou repercussão após os anos 70 (Levy; Marshall, 2004).

Até a década de 1970, as drogas eram desenvolvidas para os patógenos mais comuns (WHO, 2014), contudo no início da década as bactérias *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*, emergiram resistentes à ampicilina e, no caso do *Haemophilus*, com resistência ao cloranfenicol e à tetraciclina (Levy; Marshall, 2004), além do aumento na taxa de mortalidade anual por candidíase devido à resistência aos antifúngicos (Ghannoum; Rice, 1999).

Diante dessa perspectiva novos fármacos foram desenvolvidos. A última classe de antibacteriano foi descoberta na década de 80 (Figura 3) (WHO, 2014), no entanto, logo se observou a ineficácia dos medicamentos frente às novas cepas multirresistentes (Chandra *et al.*, 2017). A partir de então a resistência microbiana passou a ser uma ameaça crescente ao tratamento efetivo de uma gama cada vez maior de infecções, causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos (WHO, 2014).

Figura 3 - Descoberta das classes de drogas antibacterianas

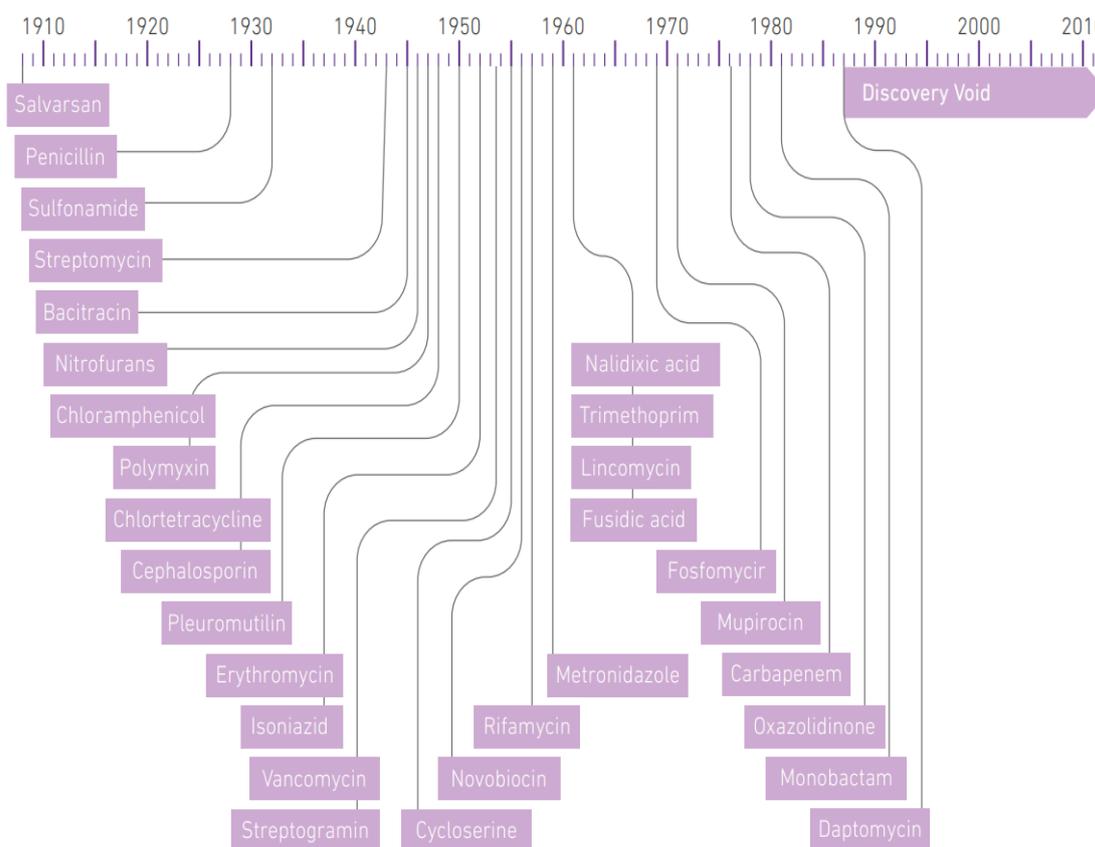


Ilustração da descoberta das classes de antimicrobianos, as datas indicadas são referentes às patentes de cada medicamento.
Adaptado de WHO, 2014.

Nesta última década houve um aumento significativo na prevalência de resistência a agentes antibacterianos e antifúngicos (Ghannoum; Rice, 1999). Essa resistência vem sendo associada ao aumento acentuado do uso de antibióticos, na atenção à saúde e na agricultura (Bradley *et al.*, 2015). As resistências tem aumentado principalmente contra as classes de antimicrobianos quinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (Roca *et al.*, 2015).

As principais patologias afetadas pela resistência aos medicamentos incluem a tuberculose, a malária, as infecções respiratórias agudas graves e as sepse causadas por bactérias Gram-negativas (Vernet *et al.*, 2014). Os recém-nascidos constituem a população mais vulnerável, estimando-se que de todas as mortes causadas por infecções no período neonatal, 56% delas foram ocasionadas por microrganismos multirresistentes. As patogêneses mais frequentes de sepse neonatal são causadas por *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas spp.*,

Acinetobacter spp. e *S. aureus*, sendo que 70% dessas infecções não seriam eliminados por um regime empírico de ampicilina e gentamicina (Vernet *et al.*, 2014).

Nos dias de hoje, as infecções são as principais responsáveis por mortes no mundo (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017), dentre elas, as infecções bacterianas são as de maior incidência em humanos (WHO, 2001), além de possuírem os exemplos mais notáveis de mecanismos de resistência e os mais caros em termos de morbidade e mortalidade (Davies; Davies, 2010).

As bactérias estão presentes no ambiente e na microbiota humana (WHO, 2014), são classificadas com Gram-positivas e Gram-negativas. Uma característica comum para ambas às classes é a parede celular (Malanovic; Lohner, 2016).

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular rígida composta por peptidoglicano, ácido teicóico e ácido lipoteicóico. Em contraste, bactérias Gram-negativas apresentam parede celular fina, cercada por membrana lipídica, chamada membrana externa, e uma membrana interna citoplasmática. O espaço entre as membranas é referido como periplasma ou espaço periplasmático. A membrana externa é uma camada protetora adicional em bactérias Gram-negativas impedindo a entrada de substâncias, estresses osmóticos e mecânicos. A membrana citoplasmática impede que os íons fluam para dentro ou para fora da célula e mantém o citoplasma e componentes bacterianos em um espaço definido (Malanovic; Lohner, 2016; Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017).

Os principais mecanismos que conferem resistência às bactérias são as enzimas que destroem ou modificam a estrutura química do agente antibacteriano; bombas de efluxo; alteração na estrutura das paredes ou membranas celulares e; mutações dos genes de resistência (Malanovic; Lohner, 2016; Chandra *et al.*, 2017; Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017).

Uma vez que as bactérias se tornam resistentes a algum fármaco, elas passam essa característica para sua progênie através de transferência horizontal ou vertical (Chandra *et al.*, 2017). Além disso, organismos comensais também são reservatórios comuns de genes de resistência, como, por exemplo, no caso do *Staphylococcus epidermidis* que serve de reservatório de genes de resistência e plasmídeos para o *S. aureus* mais patogênico (Levy; Marshall, 2004).

Conforme destacamos, a resistência bacteriana não é nova, mas o número de organismos, as localizações geográficas afetadas e a amplitude de resistência em organismos únicos, são sem precedentes (Levy; Marshall, 2004). Alguns dos fatores

que contribuem para esse quadro são: a prescrição desenfreada de antimicrobianos e o uso incorreto dos antibióticos para humanos e animais (WHO, 2014).

Os isolados clínicos resistentes à maioria das drogas já foram observados nas espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Bradley *et al.*, 2015). As bactérias *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* na Europa vem demonstrando um aumento acentuado de resistência às cefalosporinas de terceira geração e a resistência a múltiplas drogas (três ou quatro agentes antibacterianos) (Roca *et al.*, 2015).

Hoje a tuberculose é uma das patologias mais preocupantes, que emergiram resistentes aos antibióticos. A patogênese aumentou 3,6% no mundo e 20,2% dos novos casos são associados à bactéria multirresistente, com taxas muito mais altas na Europa Oriental e Ásia Central. Estima-se que entre os pacientes que iniciaram o tratamento em 2010, apenas 48% foram curado após a conclusão do tratamento (WHO, 2014).

As infecções fúngicas também têm grande ocorrência geográfica, as mais comuns são aspergilose, histoplasmoses e dermatofitose (vulgarmente conhecida como micose) (WHO, 2014). A infecção fúngica mais importante é a candidíase causada pela levedura *Candida* (Ghannoum; Rice, 1999), sendo a infecção mais comum em todo o mundo (WHO, 2014).

A candidíase pode variar de uma infecção superficial, como candidíase oral, a uma doença invasiva, como a candidemia (infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*). A candidemia é a forma mais comum de candidíase invasiva (WHO, 2014). Infecções invasivas provocadas por essa levedura estão associadas à alta morbidade e mortalidade (aproximadamente 35%). Em 2005, o Centros de Controle e Prevenção de Doenças CDC estimou que essas infecções adicionam US\$ 8 bilhões de gastos com saúde nos EUA (WHO, 2014).

Nesse contexto a resistência microbiana surge como um dos principais problemas do século XXI (WHO, 2014) e representam uma ameaça global à saúde pública (Bradley *et al.*, 2015). A busca por novas terapias provenientes de produtos naturais ou do uso de drogas associadas a substâncias naturais já vêm sendo estudadas (Newman; Cragg, 2016) e podem ser uma alternativa para novas terapias ou mesmo adjuvante potencializadores de fármacos já existentes.

1.5 Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase americana, foi descrita pelo médico Carlos Ribeiro J. Chagas, no ano de 1909 (CHAGAS, 1909), e é uma doença potencialmente fatal (WHO 2017). É uma das 17 doenças tropicais negligenciadas (DTNs) listadas pela OMS. As DNTs abrangem um grupo de patologias transmissíveis que prevalecem em 149 países, com maior incidência em países em desenvolvimento (WHO, 2015).

Esta patologia é endêmica e distribuída em 21 países, principalmente na América, desde o norte do México até o sul da Argentina e do Chile. O parasita espalhou-se pelo mundo principalmente pelo fluxo migratório de indivíduos contaminados da América Latina (Schmunis; Yadon, 2010; WHO, 2017).

A doença de Chagas afeta entre 6 e 7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2017) e o maior concentração de pessoas infectadas está distribuída em quatro países: Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186) (Antinori *et al.*, 2017), e custam às economias 627,46 milhões de assistência médica (Pérez-Molina; Molina, 2018).

Ainda de acordo com a OMS, devido ao alto número de pessoas que permanecem não diagnosticados, estima-se que 75 milhões de pessoas correm o risco de se infectarem (WHO, 2017). É a doença parasitária mais importante da América Latina e uma das mais comuns no mundo (Balouz *et al.*, 2017).

Na Europa, o influxo maciço de imigrantes latino-americanos, especialmente para Espanha, Portugal e Itália, registrados desde a década de 1990, aumentaram drasticamente os casos diagnosticados da doença. A prevalência de infecção em imigrantes latino-americanos que vivem na Europa é estimada em 4,2% com a maior prevalência entre os bolivianos (18,1%) e paraguaios (5%) (Antinori *et al.*, 2017).

Além da Europa, outras regiões não endêmicas também registram infectados. Estima-se cerca de 300.000 nos EUA; 5.500 no Canadá; 3.000 no Japão e na Austrália 1.500 casos (Schmunis; Yadon, 2010; Pérez-Molina; Molina, 2018).

O parasita *Trypanosoma cruzi* é o responsável pela doença. É um protozoário hemoflagelado, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* (WHO, 2015). É considerado um parasita promíscuo com ciclo de vida complexo, envolvendo proliferação e diferenciação extracelular em vetores de insetos

hematófagos, e proliferação e diferenciação intracelular em uma variedade de hospedeiros vertebrados (Balouz *et al.*, 2017).

O *T. cruzi* infecta mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e silvestres (WHO, 2015), e é transmitido por três gêneros de insetos triatomíneos (*Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*) distribuídos amplamente na América Latina (Antinori *et al.*, 2017; Pérez-Molina; Molina, 2018).

A transmissão ocorre primariamente quando os humanos são expostos às fezes do inseto infectado (Figura 4) (Balouz *et al.*, 2017), porém o *T. cruzi* pode ser transmitido por outras formas além da propagação vetorial (WHO, 2015). As formas alternativas de infecção se dão através de transfusão de sangue, transplantes de órgãos, transmissão vertical, transmissão oral (comidas e bebidas contaminados) e acidentes laboratoriais (Pérez-Molina; Molina, 2018). As contaminações por transplante de órgão, transmissão oral e acidentes laboratoriais são menos frequentes (Antinori *et al.*, 2017).

A transfusão de sangue já foi considerada a segunda forma de contaminação mais importante, a taxa variava entre 10 e 25% dos casos documentados (Pérez-Molina; Molina, 2018). Dados mais recentes indicam que esse percentual caiu para 1,7%, sendo que o maior risco de infectividade está associado à transfusão de plaquetas (Antinori *et al.*, 2017).

A taxa de transmissão congênita vem crescendo em países endêmicos, devido à falta de políticas públicas voltadas para gestantes (Antinori *et al.*, 2017), a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano 9.000 novos casos de transmissão congênita ainda ocorram (WHO, 2015).

1.5.1 Manifestação clínica e tratamento

A doença de Chagas manifesta-se em duas fases, a aguda e a crônica. Os sintomas da fase aguda geralmente são assintomáticos, mas em alguns casos ocasionados pela transmissão de vetores, a sintomatologia (Figura 3) inclui inflamação no local da inoculação (denominado chagoma) ou edema palpebral unilateral prolongado (denominado sinal de Romanã) (Balouz *et al.*, 2017). Essa fase da doença dura de 4 a 8 semanas e a parasitemia diminui substancialmente a partir de 90 dias. A doença aguda grave ocorre em menos de 5% dos pacientes e inclui

manifestações como miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (Pérez-Molina; Molina, 2018).

Figura 4 - Ciclo de vida do T. cruzi.

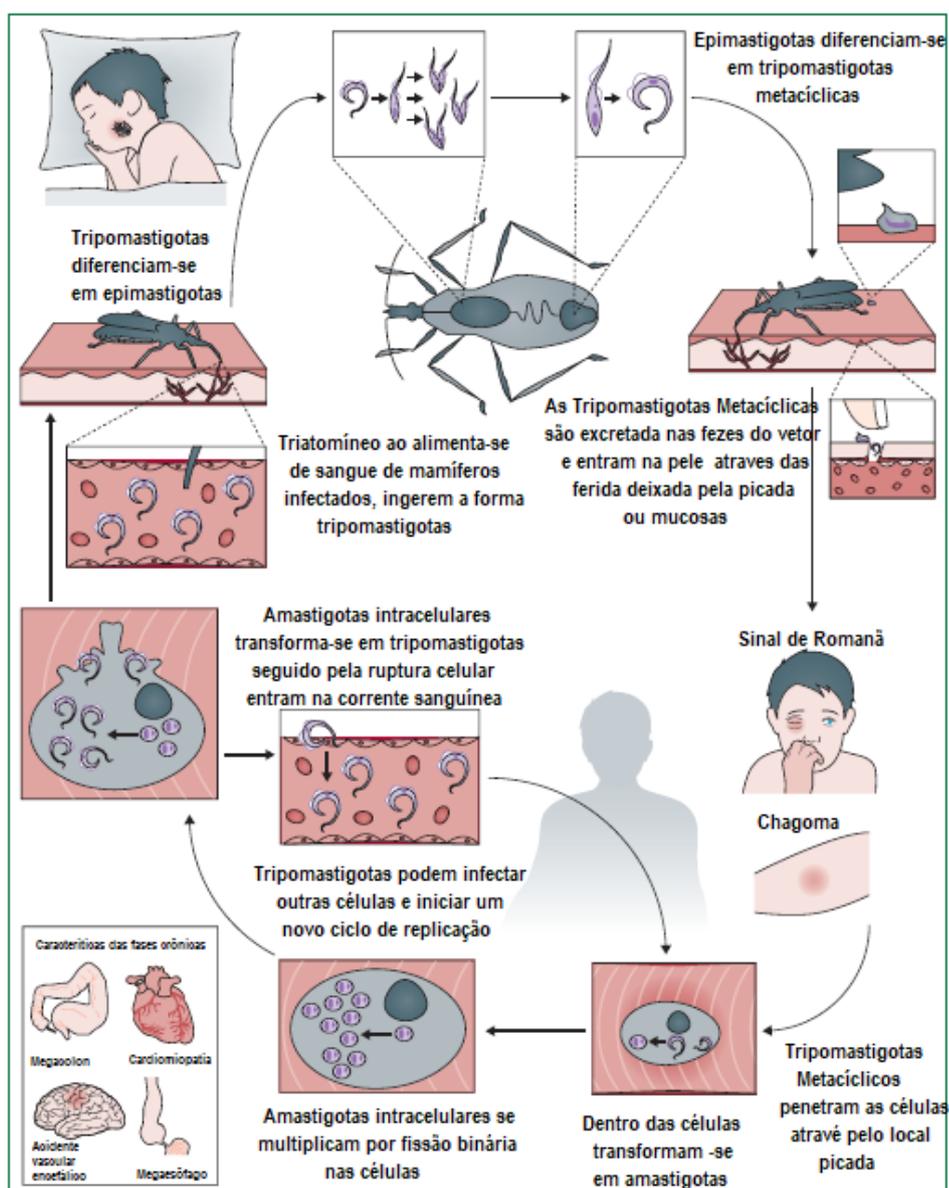


Imagem ilustrando o ciclo de vida do parasita *T. cruzi*.
Fonte: Adaptado de Pérez-Molina; Molina, 2018.

Sintomática ou não, a fase aguda da doença pode evoluir para a fase crônica. Essa fase é caracterizada pela ausência de sintomas clínicos e parasitemia muito baixa, intermitente ou nula (Balouz *et al.*, 2017). Durante essa fase, a replicação do parasita é mantida sob controle pela imunidade mediada por células B e T (Padilla *et al.*, 2009). No entanto, o parasita tem capacidade de elaborar formas de evasão do

sistema imune e voltar a invadir as células hospedeiras (Balouz *et al.*, 2017). Aproximadamente 30% a 40% dos pacientes podem desenvolver cardiomiopatia, megaesôfago ou megacólon até 30 anos após adquirir o parasita (Pérez-Molina; Molina, 2018). A reativação da doença também ocorre em pacientes imunodeprimidos, como portadores do AIDS (WHO, 2017).

A estratégia diagnóstica mais apropriada depende do estágio clínico do paciente. O diagnóstico padrão ouro para a fase inicial é a microscopia convencional (visualização de tripomastigotas circulantes no sangue periférico), devido à parasitemia patente, como nos casos de recém-nascidos infectados congenitamente (Balouz *et al.*, 2017). Na fase crônica, a OMS recomenda, pelo menos, duas técnicas para a confirmação do diagnóstico (WHO, 2015). A reação em cadeia da polimerase (PCR) do sangue periférico e a sorologia de anticorpos anti- *T. cruzi* são as mais indicadas, mas mesmo assim podem produzir resultados falsos negativos devido à baixa parasitemia nessa fase (Balouz *et al.*, 2017).

O tratamento com drogas é sempre recomendado para doença de Chagas aguda, congênita e infecções reativadas (Antinori *et al.*, 2017; WHO, 2017). Os fármacos licenciados para o tratamento da doença de Chagas benzonidazol e nifurtimox (WHO, 2017). Ambos tem sido o pilar dos tratamentos nos últimos 50 anos, embora seu perfil de segurança esteja longe do ideal (Pérez-Molina; Molina, 2018). Apesar dos antiparasitários serem quase 100% eficazes na cura da infecção se administrada no início da fase aguda, sua eficácia diminui quanto maior for o tempo que uma pessoa estiver infectada (WHO, 2017).

O tratamento com nifurtimox apresenta uma taxa de cura de 86% na fase crônica, para crianças de até 14 anos, e entre 5 a 7 % para adultos. Os efeitos adversos mais frequentes são anorexia, perda de peso, distúrbios neurológicos (irritabilidade, insônia, desorientação, alterações de humor e neuropatia periférica), manifestações digestivas como náuseas e vômitos e, ocasionalmente, febre e erupção cutânea (Pérez-Molina; Molina, 2018).

O benzonidazol alcança 100% de cura quando administrado durante o primeiro ano de vida dos pacientes que adquiriram a doença de forma vertical, e 76% para pacientes na fase aguda. Na fase crônica, as taxas de cura são muito menores: 60-93% em crianças com idade até 13 anos e 2-40% em adultos. Os efeitos adversos mais comuns são hipersensibilidade, (principalmente sob a forma

de erupção cutânea e intolerância digestiva), anorexia, dor de cabeça e distúrbios do sono (Pérez-Molina; Molina, 2018).

Pacientes na fase crônica, geralmente, vem a óbito por morte súbita causada por arritmia ou insuficiência cardíaca. Essa doença tem sido um dos maiores problemas na América Latina devido aos efeitos incapacitantes e alta taxa de mortalidade (WHO, 2015).

Um século após a descoberta da doença de Chagas, essa patologia ainda apresenta desafios críticos, incluindo uma quimioterapia eficiente. Os medicamentos clínicos disponíveis têm baixa eficácia na fase crônica, além de efeitos colaterais graves (Menna-Barreto *et al.*, 2009). A própolis tem sido extensivamente investigada como um potente agente antichagásico (Dantas *et al.* 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano e antiparasitário da própolis produzida pela espécie *Scaptotrigona aff. postica*.

2.2 Específicos

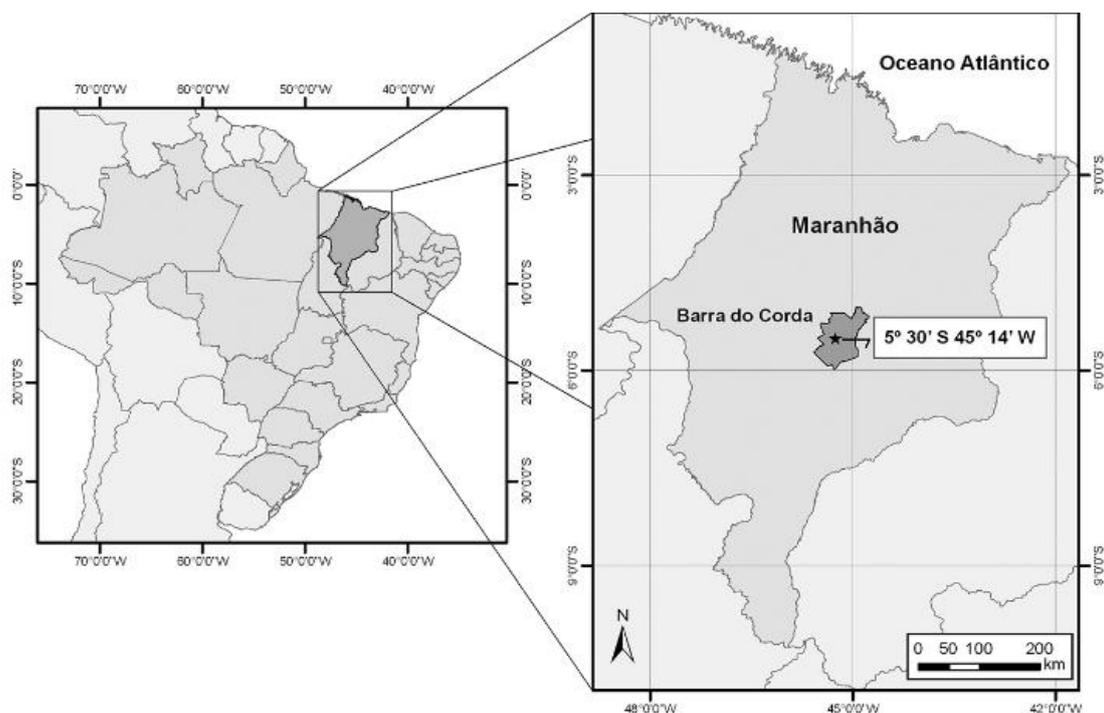
- Avaliação da ação antimicrobiana frente a cepas de fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
- Avaliação da ação antiparasitária contra o parasita *Trypanosoma cruzi*.
- Avaliação da viabilidade celular dos extratos em células animais (VERO e LLC-MK2).
- Identificação dos compostos presentes nas frações 40 AQ e 40 AL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Método de extração

A própolis foi obtida de uma colônia de *S. aff. postica*, na região do Barra do Corda, localizada no centro geográfico do Maranhão, na confluência dos Rio Corda e Rio Mearim (Figura 5), cedida gentilmente pelo Apicultor Wilson Amorin Melo. Após coleta, a própolis foi armazenada em recipiente ao abrigo de luz e transportada até o laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, onde foi mantida em freezer – 20° C até seu uso.

Figura 5 - Município de Barra do Corda, Maranhão, Brasil



Mapa do Brasil, estado do Maranhão, em destaque o Município de Barra do Corda, local onde está situado o apiário de *S. postica*.

Fonte: artigo "Espectro polínico da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em Barra do Corda, MA, Brasil".

3.1.1 Obtenção do extrato aquoso

Iniciou-se a extração pela maceração da própolis (100 gramas) em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó (**Figura 6**), adicionou-se água ultrapura (Direct-Q 5UV) (100 mL para cada 10 gramas), ficando armazenado em vidro estéril e

mantido sob rotação magnética (IKA® Big Squido - 1.000 rpm) por 24 horas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Para a separação do precipitado (cera) do meio líquido (extrato), o sobrenadante foi centrifugado (*Eppendorf® centrifuge 5804R*- a 4°C por 30 minutos à 15.000 rpm) e posteriormente filtrado (J. Prolab – papel filtro qualitativo Ø 15,0 cm). O filtrado foi liofilizado (SUPERMODULYO Freezer DRYER Thermo Electron Corporation) para a obtenção do extrato seco. O extrato aquoso da própolis (EAP) foi mantido à -20°C até a realização dos experimentos

Figura 6 - Própolis da abelha *S. postica*



Macerado e própolis da abelha *S. aff. postica*.
Fonte: Cantero, 2018.

3.1.2 Extração alcoólica

Iniciou-se a extração pela maceração da própolis (100 gramas) em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. O metanol (70%) foi adicionado ao pó (100 mL para cada 10 gramas), armazenado em vidro estéril e mantido sob rotação magnética (IKA® Big Squido - 1.000 rpm) por 24 horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Para a separação do precipitado (cera) do meio líquido (extrato), o sobrenadante foi centrifugado (*Eppendorf® centrifuge 5804R*- à 4°C por 30 minutos à 15.000 rpm) e posteriormente filtrado (J. Prolab – papel filtro qualitativo Ø 15,0 cm). O filtrado foi liofilizado (SUPERMODULYO Freezer DRYER Thermo Electron

Corporation) para a obtenção do extrato seco. O extrato metanólico da própolis (EMP) foi mantido à -20°C até a realização dos experimentos.

3.2 Ensaio de viabilidade celular

3.2.1 Linhagem celular e meio de cultivo

Células VERO, linhagem de fibroblastos (*Cercopithecus aethiops* - células renais de macaco verde da África), foram cultivadas a 37°C em frascos T25 contendo 5 mL de meio Leibovitz (L-15) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após atingirem 70% de confluência, as células foram tratadas com tripsina, dissolvidas em meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão celular por azul de tripan (0,2%), na qual apenas as células viáveis permanecem descoradas.

Células LLC-MK2, linhagem epitelial (Células renais de Macaco Rhesus), foram cultivadas a 37°C em frascos T25 contendo 5 mL de meio Dulbecco modification of Minimum Essential Media (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após atingirem 70% de confluência, as células foram tratadas com tripsina, dissolvidas em meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão celular por azul de tripan (0,2%), na qual apenas as células viáveis permanecem descoradas.

Para o cálculo da viabilidade utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{número de células vivas nos 4 quadrantes}}{\text{total de células contadas nos 4 quadrantes}} \times 100$$

3.2.2 Viabilidade celular pela técnica do MTT

A viabilidade celular foi quantificada através da atividade do succinato desidrogenase, enzima mitocondrial ativa em células com metabolismo da cadeia respiratória intacto, pelo método MTT Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, protocolo descrito por Mosmann (1983).

As células VERO foram semeadas na concentração de 10⁴ células/poço em placas de 96 poços em meio L-15 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mantidas a 37° C durante 24 horas. Ao atingir 70 a 80% de confluência, os poços

foram lavados com PBS estéril para remoção das células não aderidas e 100 µL das amostras (na concentração máxima utilizada nos testes antimicrobianos, ou seja, 200 µg/mL) foram adicionadas. Foram realizados controles positivos (células + L-15 10% SBF) e controle negativos (células + 1% DMSO). As placas foram mantidas a 37°C, por 24 horas. Após as 24 h de incubação o sobrenadante das culturas foi removido e 20 µL da solução de 5 mg/mL de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em PBS foi adicionado em cada poço, as células foram mantidas por 4 horas a 37°C ao abrigo de luz. Passado o período foi adicionado 100 µL de DMSO por 10 minutos para a solubilização dos precipitados. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (FlexStation® 3, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

O experimento também foi realizado com as células LLC-MK2. As células foram semeadas na concentração de 10^4 células/poço em placas de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mantidas a 37° C durante 24 horas. Ao atingir 70 a 80% de confluência, os poços foram lavados com PBS estéril para remoção das células não aderidas e 100 µL do EMP (nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2 mg/mL) foram adicionados. Foram realizados controles positivos (células + L-15 10% SFB) e controle DMSO (células + L-15 10% SFB + 0,5% DMSO). O controle DMSO foi utilizado pois o extrato proveniente do metanol, não solubiliza em água, assim fizemos um controle nas mesmas concentrações da solubilização. As placas foram mantidas a 37°C, por 24 horas. Após as 24 h de incubação o sobrenadante das culturas foi removido e 20 µL da solução de 5 mg/mL Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em PBS foi adicionado em cada poço, as células foram mantidas por 4 horas a 37°C ao abrigo de luz. Passado o período foi adicionado 100 µL de DMSO por 10 minutos para a solubilização dos precipitados. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (FlexStation® 3, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

Os cálculos para obtenção dos valores de viabilidade celular seguiram o seguinte procedimento:

1. Cálculo da média da densidade óptica das amostras, do controle celular e do controle com DMSO 0,5%;
2. Subtração da média do controle com DMSO 0,5% das médias do controle e das amostras;

3. Cálculo da viabilidade celular média pela equação:

$$VC = \frac{ODD}{ODC} \times 100$$

Sendo, VC= viabilidade celular; ODD= média da densidade óptica das amostras; ODC= média da densidade óptica dos controles.

A partir dos dados obtidos foi plotado o gráfico de viabilidade celular em função da concentração das amostras.

3.2.3 Viabilidade celular pela técnica do *AlamarBlue*

A metodologia empregada utilizou a resazurina. A resazurina é um corante azul não fluorescente que é reduzido à resorufina altamente fluorescente de cor rosa. Especificamente, a resazurina ao penetrar a membrana plasmática é reduzido em resposta a uma redução química do meio devido ao crescimento celular ou por ação de enzimas mitocondriais.

As células LLC-MK2 foram semeadas na concentração de 10^4 células/poço em placas de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37° C durante 24 horas. Ao atingir 70 a 80% de confluência, os poços foram lavados com PBS estéril para remoção das células não aderidas e 100 µL do EMP (nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2 mg/mL) foram adicionadas. Foram realizados controle positivo (células + DMEM 10% SFB) e DMSO (células + 0,5% DMSO + DMEM 10% SFB). O controle DMSO foi utilizado pois o extrato proveniente do metanol, não solubiliza em água, assim fizemos um controle nas mesmas concentrações da solubilização. As placas foram mantidas a 37°C a 5% de CO₂, por 24 horas. Após 24 h de incubação o sobrenadante das culturas foi retirado e foram adicionados aos poços 10 µL da solução do reagente Alamar Blue ao volume (90 µL) do meio DMEM presente nos poços (v/v) conforme recomendações do fabricante (Alamar Blue® Cell Viability Reagent). Em seguida a placa foi mantida no escuro em incubadora de CO₂ por 4 h a 37°C. A presença de células viáveis nos poços foi detectada pela intensidade de fluorescência (excitação de 550 nm e emissão de 585 nm) em leitor de Microplacas (Modelo Cytation 3, Marca BioTek Instruments).

Os cálculos para obtenção dos valores de viabilidade celular seguiram o seguinte procedimento:

1. Cálculo da média da densidade óptica das amostras, do controle celular e do controle com DMSO 0,5%;
2. Subtração da média do controle com DMSO 0,5% das médias do controle e das amostras;
3. Cálculo da viabilidade celular média pela equação:

$$VC = \frac{ODD}{ODC} \times 100$$

Sendo, VC= viabilidade celular; ODD= média da densidade óptica das amostras; ODC= média da densidade óptica dos controles.

A partir dos dados obtidos foi plotado o gráfico de viabilidade celular em função da concentração das amostras.

3.3 Testes biológicos

3.3.1 Microrganismos

A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada frente aos seguintes microrganismos *Escherichia coli* (SBS363), *Micrococcus luteus* (A270) doadas pelo Instituto Pasteur (Paris, França); *Candida albicans* (MDM8) doada pelo Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo (São paulo, Brasil); *Escherichia coli* (D31- resistente à estreptomicina), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella enterica serovar typhimurium* (ATCC 14028) *Bacillus megaterium* (ATCC 10778) e *Micrococcus luteus* (BR1 – resistente à estreptomicina) doadas pela Coleção Americana de tipos de Cultura Celular (ATCC). Os fungos de isolados clínicos humanos *Candida krusei* (IOC 4559), *Candida glabrata* (IOC 4565), *Candida parapsilosis* (IOC 4564), *Candida guilliermondii* (IOC 4557), *Candida tropicalis* (IOC 4560) e *Candida albicans* (IOC 4558) foram doados pelo Instituto Oswaldo Cruz (Rio de janeiro, Brasil). As cepas foram mantidas em coleção de cultura a -80°C no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior.

3.3.2 Preparo do inóculo

Para a realização dos ensaios utilizamos o método recomendado pela norma M07-A9 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/NCCLS, 2012) na cultura de bactérias. As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 h de crescimento em placa Mueller Hinton. A colônia foi adicionada à 10 mL de meio de cultura *Mueller-Hinton* (MH). O meio com o inóculo foi incubado a 37° C sob agitação, até atingir a concentração de 10^5 CFU/mL. A concentração foi confirmada através da medida de absorvância do inoculo por espectrofotometria utilizando o aparelho Victor³ (1420 Multilabel Counter /Victor³ - Perkin Elmer) a 595 nm.

Nas culturas dos fungos utilizamos o método descrito pela NCCLS M38-P (NCCLS, 2002). As culturas dos fungos foram crescidas por 7 dias em meio de cultura de dextrose de batata 1,2% (m:v) (Difco; “halfstrength”) (PDB) a 35°C, até que atingissem a concentração final de 10^4 CFU/mL. O crescimento foi determinado através da densidade óptica em 570 nm.

3.4 Ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido

Para avaliação da atividade antimicrobiana utilizamos o ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido em microplaca de 96 poços (Riciluca *et al.*, 2012). As amostras EAP e EMP, foram submetidas inicialmente a um *screening* de atividade contra as cepas *Escherichia coli* (SBS363), *Micrococcus luteus* (A270), *Candida albicans* (MDM8) e *Candida tropicalis* (IOC 4560).

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com volume final de 100 µL. Foram testados 20 µl de cada amostra (200 µg/mL) e adicionados 80 µL do meio de cultura contendo 10^5 CFU/mL para bactérias e/ou 10^4 CFU/mL para fungos.

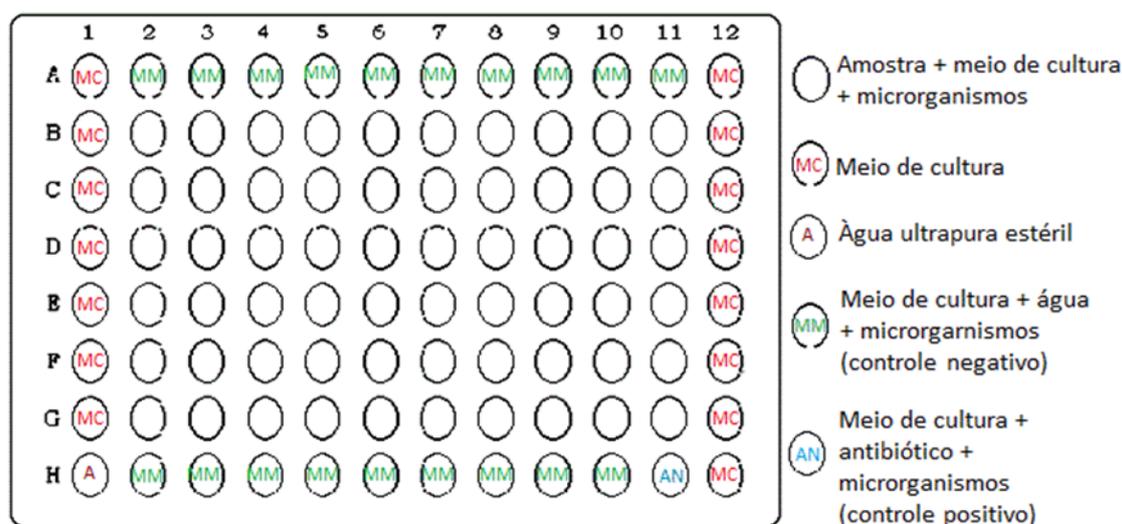
Os meios de crescimento utilizados foram PB (Peptonas 10 g / L; NaCl 5 g / L; pH 7,4) para bactérias e PDB (Potato Dextrose Broth 1,2 g Dextrose de batata; 100 mL de H₂O; pH 5,0) para fungos. Neste experimento, foram utilizados como controle positivo 20 µL de estreptomicina (10 mg/mL) e 80 µL do meio de cultura contendo o inoculo microbiano, e como controle negativo 20 µL de água ultrapura (Direct-Q 5UV) e 80 µL do meio de cultura contendo o inoculo microbiano.

Para todos os microrganismos foi realizado um controle de solvente com a concentração máxima de DMSO utilizado para solubilizar as amostras provenientes do EMP (0,5%). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Foram realizados os controles de crescimento de cultura, bem como, controles apropriados de esterilidade dos materiais, adicionando 100 μL de água ultrapura (Direct-Q 5UV) e 100 μL dos meios de cultura, como representado na Figura 7.

O crescimento microbiano foi avaliado através da turbidez do meio por medida de absorbância (λ : 595nm) num leitor de microplaca Victor³ (1420 Multilabel Counter /Victor³ - Perkin Elmer), após 24 horas de incubação à 37°C.

Figura 7 - Esquema representativo do ensaio inibição de crescimento microbiano em meio líquido.



Para realização dos experimentos foram utilizados 20 μL EAP e EMP (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 80 μL do meio de cultivo contendo 105 CFU/mL para bactérias ou 104 CFU/mL para fungos. Controle positivo 20 μL de estreptomicina (10mg/mL) ou controle negativo 20 μL água e 80 μL do meio de cultivo contendo 105 cél/mL ou 104 cél/mL dos microrganismos.

3.4.1 Determinação da Mínima Concentração Inibitória (MIC)

Após a confirmação da atividade antimicrobiana, determinamos as mínimas concentrações inibitórias (MIC). O MIC é definido como a mínima concentração de uma substância que provoca 100% da morte do microrganismo. Foi utilizado o ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido (item 3.4). Na placa de 96 poços foram adicionadas as amostras, o meio de cultura e as suspensões

microbianas nas mesmas condições do item 3.4, totalizando 100 µL. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 31,3 à 200 µg/mL.

Para todos os microrganismos foi realizado um controle de solvente com a concentração máxima de DMSO utilizado para solubilizar as amostras provenientes da EMP (0,5%), bem como, o controle de crescimento de cultura, e os controles apropriados de esterilidade dos materiais. As placas foram incubadas por 48 h em estufa a 37°C. O experimento foi realizado em triplicata.

A leitura dos resultados foi avaliada através da turbidez do meio por medida de absorbância (λ : 595nm) num leitor de microplaca Victor 3 -1420 (Perkin Elmer). Foi definido como MIC a menor concentração onde não foi observada turbidez do meio, ou seja, a qual não houve o crescimento dos microrganismos.

3.5 Parasita

Foi utilizada neste estudo a forma epimastigota CL Brener do *T. cruzi*, cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT). Este meio consiste em solução a 10% em água de infuso de fígado (DiFCO), de triptose (DIFCO), 40 g de cloreto de sódio (SYNTH), 4,0 g de cloreto de potássio (SYNTH), 80 g de fosfato de sódio (SYNTH), 5 mL de trietonalamina, 250 mg hemina (Sigma), solução a 40% em água de glicose (Sigma) e 50 mL de soro fetal bovino (Sigma) (CAMARGO, 1964).

3.5.1 Preparo do inóculo

Para iniciar o cultivo das formas epimastigotas, foi realizado um inóculo de 3×10^6 parasitos/mL em uma garrafa de cultura de células contendo 5 mL de LIT. As culturas foram diariamente homogeneizadas para oferecer uma maior aeração e observadas em microscópio óptico para verificar a ausência de contaminação. A cada 2 a 3 dias, as culturas foram repicadas por passagens sucessivas em meio LIT. As culturas foram mantidas em estufa a temperatura de 28 °C.

3.5.2 Ensaio de inibição de crescimento

A cultura de epimastigotas cepa CL Brener do *T. cruzi* em crescimento exponencial foi diluída para a concentração de 10^6 parasitas/mL em meio LIT. A

suscetibilidade do *T. cruzi* à própolis foi avaliada inicialmente na concentração de 2 mg/mL dos extratos brutos. O extrato que exibiu ação antiparasitária foi avaliado nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, e 2 mg/mL. Para a realização de curva de crescimento os parasitos foram mantidos em placa de 96 poços, com volume de 200 µL em cada poço e foram feitas leituras de absorbância à 620 nm (Modelo Cytation 3, Marca BioTek Instruments). Cada concentração de própolis foi testada em quadruplicata por placa, mantidas à 28°C, e a absorbância foi medida a cada 24h. Três controles foram realizados: poços com apenas meio LIT, poços contendo parasito com LIT apenas e parasitos em meio LIT acrescido de DMSO (concentração final de 0,5%). Para a conversão das leituras de absorbância em número de parasitos por mL, foi utilizada regressão linear baseada em leituras de absorbância (620 nm) a partir de curva de concentração conhecida de epimastigotas (Damasceno *et al.*, 2014). Os resultados mostrados aqui correspondem a três experiências independentes. A partir dos dados obtidos foi plotado o gráfico em função da concentração das amostras.

3.6 Separação das moléculas

3.6.1 Preparação

Os EAP e EMP após liofilização, foram dissolvidos em água acidificada (ácido trifluoroacético – TFA 0,05%). Para o EPM foi adicionado 10% DMSO à água acidificada para solubilização das moléculas apolares.

Ambos os extratos foram mantidos sob rotação magnética (IKA® Big Squido - 1.000 rpm) por 30 minutos em banho de gelo e ao abrigo de luz, e posteriormente submetidos à centrifugação 16.000 rpm por 30 minutos à 4°C (Centrifuge 5804R Eppendorf Instruments).

3.6.2 Extração em fase sólida

Para a separação das moléculas por solubilidade, o sobrenadante foi aplicado a um cartucho Sep-Pak C18 (Water Associates), equilibrado previamente com TFA (0,05%). Os extratos foram eluídos em três concentrações de acetonitrila acidificada

(ACN/TFA 0,05%), 5%, 40% e 80% ACN, onde foram obtidas três frações de cada extrato, que foram denominadas 5 AQ, 40 AQ, 80 AQ, 5 AL, 40 AL e 80

As frações foram liofilizadas, pesadas e armazenadas em freezer - 20° C até a realização dos experimentos.

3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

Para a cromatografia foram selecionadas duas amostras obtidas da extração em fase sólida que apresentaram ação antimicrobiana contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Elas foram novamente liofilizadas, dissolvidas em TFA (0,05%) e submetidas à CLAE-FR. A cromatografia foi realizada utilizando o aparelho LC-8A Preparative Liquid Chromatograph (Shimadzu), em uma coluna de fase reversa semi-preparativa (Shim-pack ODS) durante 70 minutos com fluxo de 8 mL/min empregando-se gradientes de solução de TFA (0,05%) (A) e ACN/TFA (0,01%) (B). O gradiente da corrida utilizado está descrito na Tabela 2. A absorbância foi monitorada a 225nm e 280nm, à temperatura ambiente. As frações foram coletadas manualmente. Os fracionamentos foram realizados no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan.

Tabela 2 - Esquema de gradiente da cromatografia em fase reversa das frações 40 AL e 40 AQ.

Tempo/Amostra 40AQ e 40 AL	Gradiente
0-10	2%
10-60	60%
60-65	60%
65-70	2%
70.01	Stop

3.8 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi utilizada para identificar as substâncias das amostras com maiores atividades antimicrobianas. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto Butantan. Os materiais foram analisados através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), utilizando um sistema UFLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan) acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF) (LCMS-8030, Shimadzu Co., Japão).

As amostras foram ressuspendidas em água / 0,1% Ácido Acético e analisadas em uma coluna C18 (Discovery C18, 5 μ m, 50 mm x 2.1 mm), tendo como solventes (A) Ácido Acético/água (1:999) e (B) Ácido Acético / ANC / Água (1:900:99), por meio de um fluxo constante de 0,2 mL/min, onde o gradiente variou de 5 a 70 % de solvente B, durante 35 minutos, a 37 °C, e monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA.

Seguida a etapa cromatográfica, foram realizadas as análises por espectrometria de massas, de acordo com os seguintes parâmetros: a voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e a voltagem do detector 1,76 KV, com temperatura de 200 °C; a fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia; e os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. Os dados obtidos pelo software LabSolutions (LCMSsolution versão 3.60.361, Shimadzu) foram comparados a literatura para identificação dos compostos.

3.9 Análise Estatística

Os valores foram testados quanto a sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e os dados foram expressos em média e desvio-padrão. A comparação entre os grupos foi realizada através do ANOVA. O Teste de contraste (Pós-Hoc) utilizado foi o *Tukey*. Os resultados serão considerados estatisticamente significantes se $p \leq 0,05$, analisados por meio do programa GraphPad Prism versão 5.1.

4 RESULTADOS

4.1 Extração

Inicialmente, 100 g da própolis foram extraídas com água ou metanol (Figura 8) (conforme descrito nos itens 3.1.1 e 3.1.2), o rendimento total, após liofilização, foi de 5,250 g do EAP e 4,600 g do EMP.

Figura 8 - Extratos da própolis



EMP e EAP, respectivamente, após centrifugação e processo de filtragem.
Fonte: Campos/2018

4.2 Ensaio de inibição de crescimento microbiano em meio líquido

O ensaio foi realizado com as amostras EAP e EMP, nas concentrações 1.000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL que foram testadas contra os microrganismos *Micrococcus luteus* (A270), *Escherichia coli* (SBS 363), *Candida tropicalis* (C4560) e *Candida albicans* (MDM08). Essas espécies de bactérias e fungos foram selecionadas para a realização de um *screening* inicial para determinação da ação antimicrobiana dos extratos.

No ensaio de rastreamento, ambas as amostras demonstraram ação antimicrobiana na concentração de 200 µg/mL, (Tabela 3).

Tabela 3 - Teste de inibição do crescimento de microrganismos em meio líquido (screening de atividade).

Microrganismos	EPA	EMP
Bactéria Gram-positiva		
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+
Bactéria Gram-negativa		
<i>Escherichia coli</i>	+	+
Fungos		
<i>Candida albicans</i>	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-

As amostras foram testadas na concentração de 200 µg/mL. São apresentados na tabela os resultados obtidos para as amostras EPA e EMP. (+) atividade antimicrobiana e (-) sem atividade.

Confirmada a atividade biológica das amostras, foram realizados novos experimentos para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), pelo ensaio de microdiluição (Tabela 4).

Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória mínima (MIC) dos extratos brutos aquoso (EAP) e metanólico (EMP)

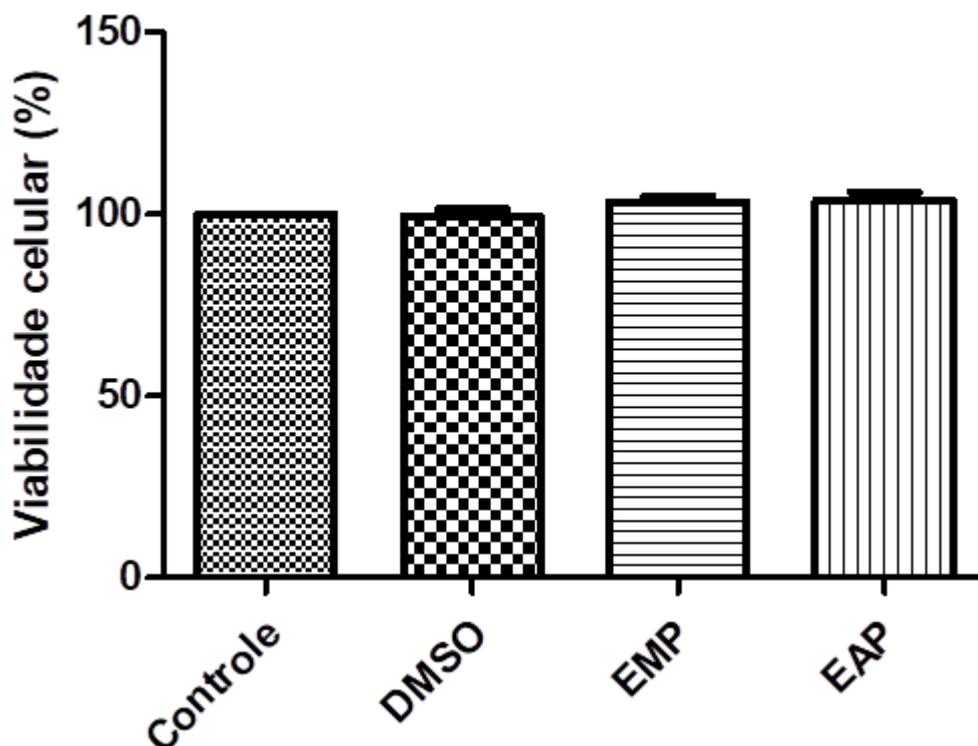
Microrganismos	EMP	EAP
Bactérias Gram-positivas		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	200	ND
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC10778	62,5	200
<i>Micrococcus luteus</i> A270	125	200
Bactérias Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i> SBS 363	200	ND
<i>Escherichia coli</i> D31- resistente a estreptomicina	200	ND
Fungos		
<i>Candida krusei</i> IOC 455916	ND	ND
<i>Candida parapsilosis</i> IOC 456416	ND	ND
<i>Candida guilliermondii</i> IOC 4557	ND	ND
<i>Candida albicans</i> IOC 45588	ND	ND
<i>Candida tropicalis</i> IOC 45608	ND	ND
<i>Candida glabrata</i> IOC 45658	ND	ND

O MIC foi expresso em $\mu\text{g/mL}$. As concentrações testadas foram de 31.1 a 200 $\mu\text{g/mL}$. (ND) Não apresentou atividade antimicrobiana.

4.3 Avaliação da viabilidade celular

Paralelamente aos ensaios antimicrobianos, realizamos o teste de viabilidade celular na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. O resultado dos efeitos das concentrações da EAP e EMP, sobre a proliferação de fibroblastos estão representadas graficamente na figura 9. A viabilidade celular foi expressa em termos da absorbância relativa das células tratadas e não tratadas (controle).

Figura 9 - Viabilidade celular frente a tratamento com as amostras EAP e EMP, da própolis de *S. aff. postica*.



Efeito das amostras EAP e EMP sobre a viabilidade celular de cultura de fibroblastos após 24h de tratamento. Os resultados correspondem aos tratamentos realizados com as amostras na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT. Não houve diferença estatística entre os grupos. Como o EMP foi ressuscitado com 0,5% de DMSO, foi realizado um controle com DMSO nas mesmas concentrações para verificar a interferência dele no crescimento celular.

Fonte: ANOVA GraphPad Prism 5,1.

4.4 Extração em fase sólida

A própolis é um material complexo, assim, com o propósito de identificar quais moléculas seriam as responsáveis pela inibição do crescimento dos microrganismos, os extratos foram submetidos ao fracionamento em fase sólida utilizando colunas descartáveis Sep-Pak C18 (Figura 10). A eluição do EMP e EAP resultaram em três frações para cada extrato, ou seja, 6 frações totais. As frações resultantes do EAP foram nomeadas de 5 AQ, 40 AQ, 80 AQ; e as frações do EMP receberam o nome de 5 AL, 40 AL e 80 AL.

Figura 10 - Extração em fase sólida



Fracionamento dos extratos da própolis em fase sólida utilizando Sep-Pak C18.
Fonte: Campos/2018

4.5 Atividades antimicrobianas das frações

Com as frações obtidas através da extração em fase sólida, foi realizado novo teste antimicrobiano (Tabela 5) para determinar quais delas teriam ação antimicrobiana. O ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.3 com os microrganismos *Micrococcus luteus* (A270), *Escherichia coli* (SBS 363), *Candida tropicalis* (C4560) e *Candida albicans* (MDM08).

Tabela 5 - Teste de inibição do crescimento de microrganismos em meio líquido pelas frações

<i>Microrganismos</i>	5 AQ	5 AL	40 AQ	40 AL	80 AQ	80 AL
Bactéria Gram-positiva						
<i>Micrococcus luteus</i>	+	+	+	+	-	-
Bactéria Gram-negativa						
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	-	-
Fungos						
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-

As frações foram testadas na concentração de 200 µg/mL. São apresentados na tabela os resultados obtidos para as frações 5 AQ, 5 AL, 40 AQ, 40 AL, 80 AQ e 80 AL. (+) atividade antimicrobiana e (-) sem atividade.

As frações 40 AQ e 40 AL foram selecionadas para a determinação do MIC, através do ensaio de microdiluição (Tabela 6), pois apresentam ação antimicrobiana contra microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo.

Tabela 6 - Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) das frações 40 AL e 40 AQ.

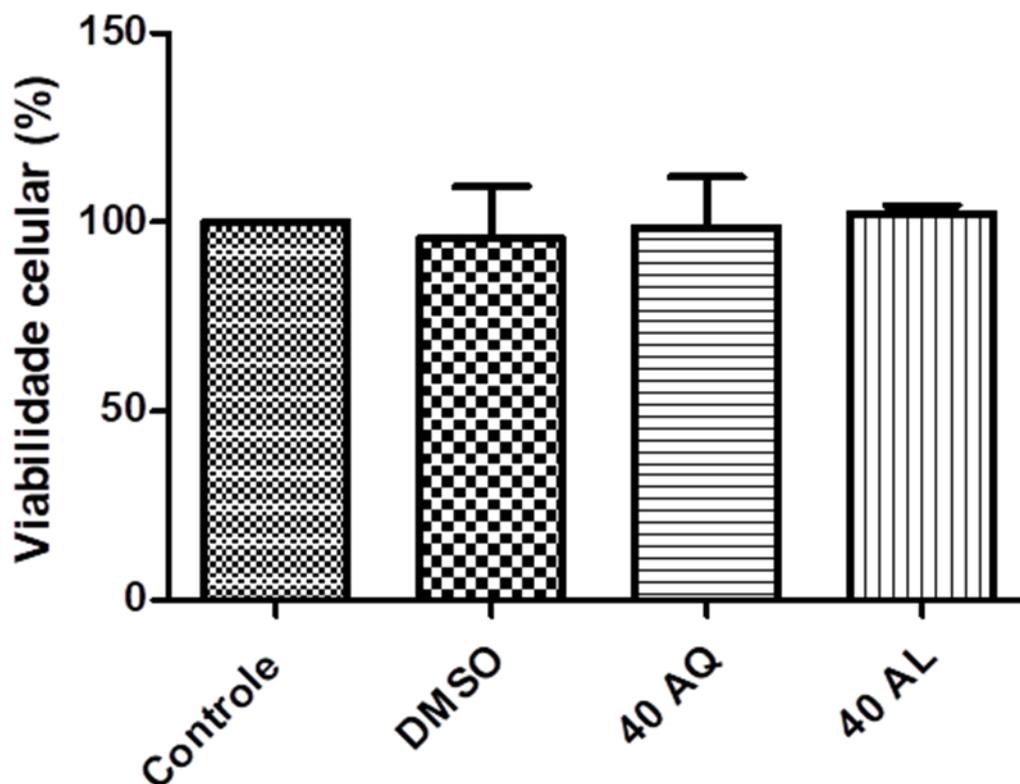
Microrganismos	40 AL	40 AQ
Bactéria Gram-positivas		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	200	200
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC10778	62,5	62,5
<i>Micrococcus luteus</i> A270	125	200
Bactéria Gram-negativas		
<i>Escherichia coli</i> SBS 363	200	200
<i>Escherichia coli</i> (D31 – resistente a estreptomicina)	200	200
<i>Fungos</i>		
<i>Candida krusei</i> IOC 455916	ND	ND
<i>Candida parapsilosis</i> IOC 456416	ND	ND
<i>Candida guilliermondii</i> IOC 4557	ND	ND
<i>Candida albicans</i> IOC 45588	ND	ND
<i>Candida tropicalis</i> IOC 45608	ND	ND
<i>Candida glabrata</i> IOC 45658	ND	ND

O MIC foi expresso em $\mu\text{g/mL}$. As concentrações testadas foram de 31.1 a 200 $\mu\text{g/mL}$. (ND) Não apresentou atividade antimicrobiana.

4.6 Viabilidade Celular

As frações 40 AL e 40 AQ foram submetidas a novo ensaio de viabilidade celular sobre a proliferação de fibroblastos. Os resultados estão representados graficamente na Figura 11. A viabilidade celular foi expressa em termos da absorbância das células tratadas e não tratadas (controle).

Figura 11 - Viabilidade celular de fibroblastos frente ao tratamento com as frações 40 AQ e 40 AL



No gráfico são avaliados os efeitos das frações 40 AQ e 40 AL sobre a cultura de células de fibroblastos (VERO) após 24 h de tratamento nas concentrações de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT. Não houve diferença estatística entre os grupos. Como o EMP foi ressuspendido com 0,5% de DMSO, foi realizado um controle com DMSO para verificar a interferência dele no crescimento celular.

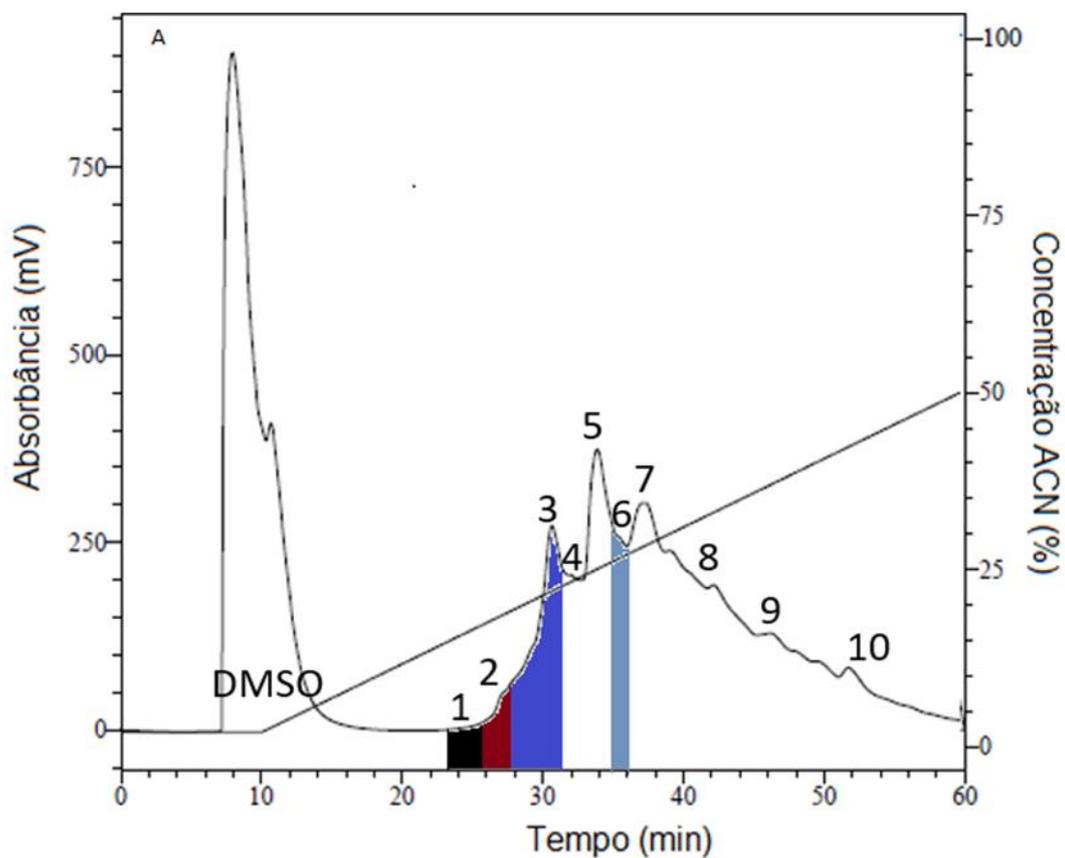
Fonte: ANOVA GraphPad Prism 5,1.

4.7 Fracionamento cromatográfico através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa CLAE-FR

Após a primeira etapa de separação das moléculas, observamos que ainda não era possível determinar se a ação biológica das frações frente aos microrganismos estava sendo determinada pelo efeito sinérgico das substâncias presentes nas frações, ou se apenas uma molécula era responsável pela ação antimicrobiana. Assim, as frações 40 AL e 40 AQ foram submetidas a um novo fracionamento.

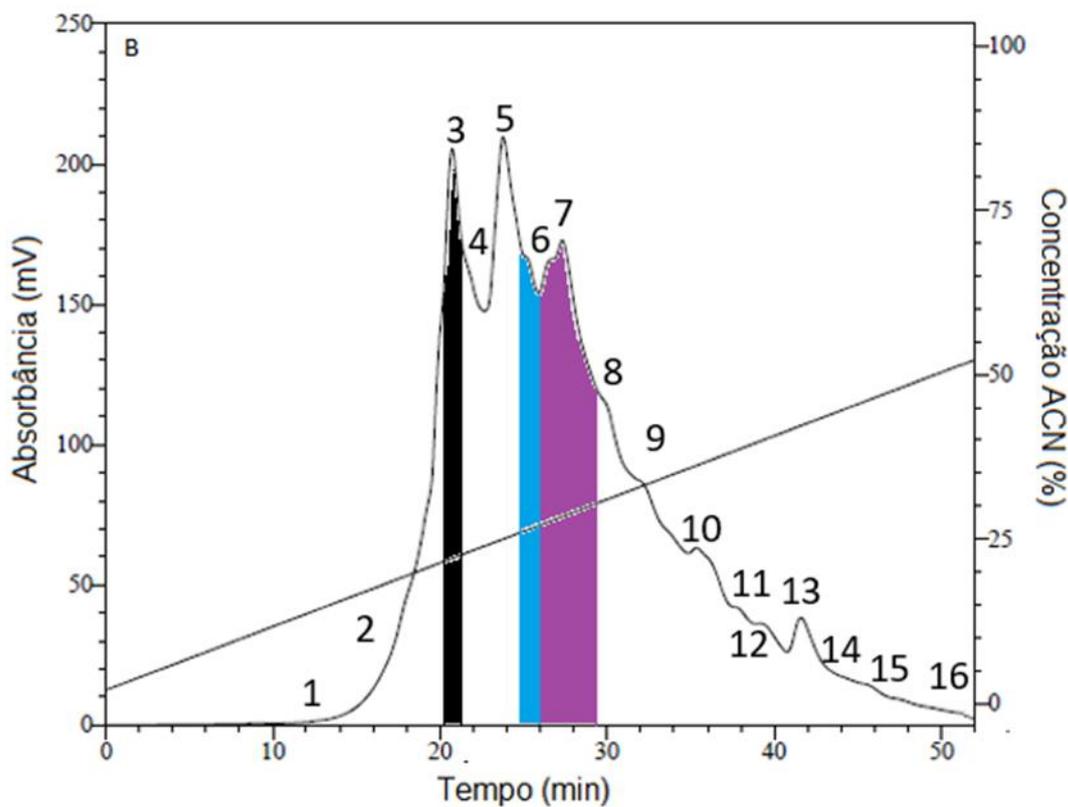
Obtivemos 16 sub frações (Figura 12) da fração 40 AQ e 10 sub frações da fração 40 AL (Figura 13). Nas Figura 12 e 13 destacamos as sub frações com atividade antimicrobiana.

Figura 12 - Cromatograma da amostra 40 AL.



Perfil cromatográfico da fração 40 AL, eluída num gradiente de 2% a 60% de ACN. Destacamos as sub frações com ação antimicrobiana contra o microrganismo *Micrococcus luteus*.
Fonte: Imagem obtida através do software *LabSolutions*.

Figura 13 - Cromatograma da amostra 40 AQ.



Perfil cromatográfico da fração 40 AQ, eluída num gradiente de 2% a 60% de ACN. Destacamos as sub frações com ação antimicrobiana contra o microrganismo *Micrococcus luteus*.
 Fonte: Imagem obtida através do software LabSolutions

4.8 Atividades antimicrobianas das sub frações

Após esse segundo fracionamento, as concentrações das amostras foram substancialmente reduzidas, assim optamos em secar todas as amostras e ressuspende-las em 1 mL de meio e testa-las novamente. Todas sub frações foram submetidas ao ensaio de inibição do crescimento microbiano em meio líquido, conforme descrito no item 3.3, contra os microrganismos *Micrococcus luteus* (A270), *Escherichia coli* (SBS 363) e *Candida albicans* (MDM08). Todas as sub frações inibiram o crescimento do microrganismo *Micrococcus luteus* (Tabela 7).

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana das sub frações 40 AQ e 40 AL

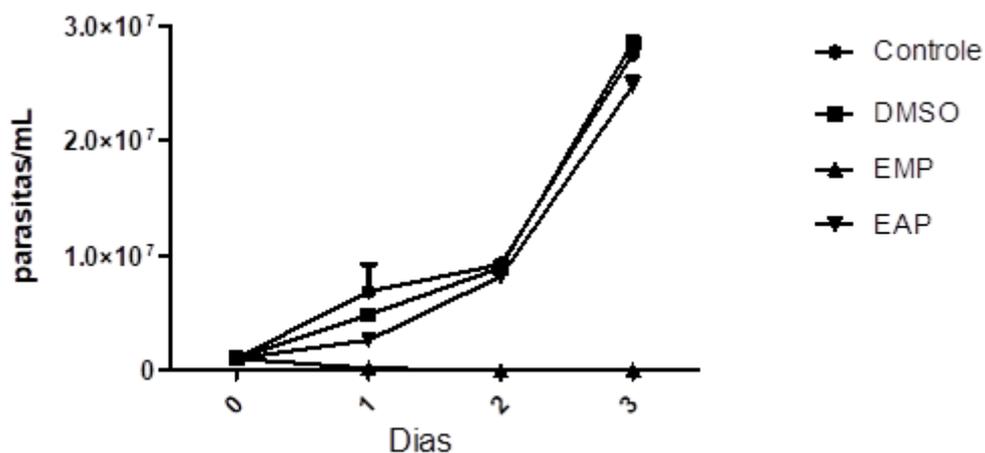
Fração	Sub fração	Microrganismos		
		<i>Candida albicans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Eschirichia coli</i>
40AQ	3	-	+	-
40AQ	6	-	+	-
40AQ	7	-	+	-
40AL	1	-	+	-
40AL	2	-	+	-
40AL	3	-	+	-
40AL	6	-	+	-

(+) atividade antimicrobiana. (-) sem atividade.

4.9 Ensaio de inibição de crescimento

O ensaio de inibição de crescimento antiparasitário (item 3.5.2) foi realizado com as amostras EAP e EMP, contra a forma epimastigota do protozoário *T. cruzi*. Os testes iniciais foram realizados com 2 mg/mL dos extratos (Figura 14). Nesse teste os extratos foram comparados ao grupo Controle (parasita + meio), também foi realizado um controle com DMSO na concentração de 0,5%. A proliferação celular foi quantificada através da leitura da densidade óptica das placas por 3 dias.

Figura 14 - Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi*



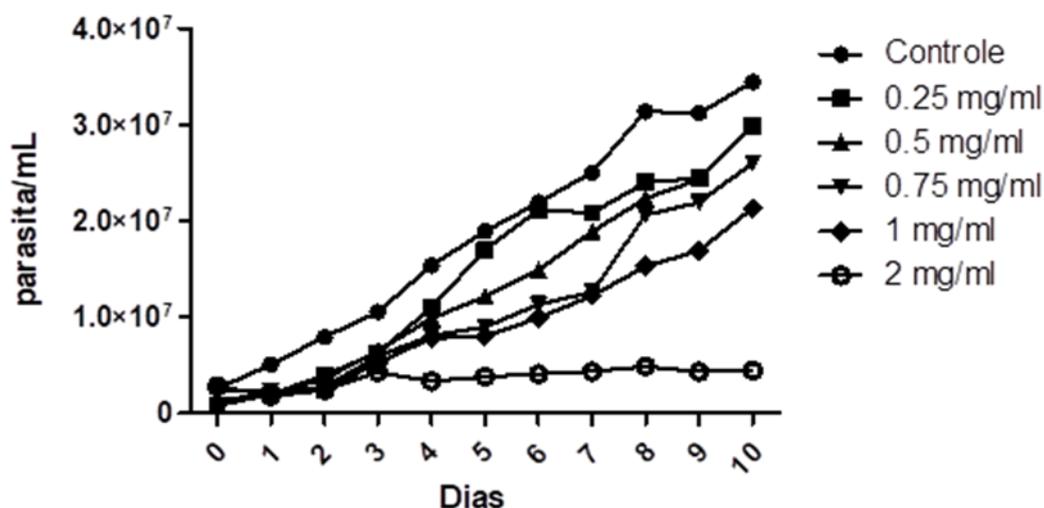
No gráfico foram avaliados os efeitos dos extratos contra o parasita *T. cruzi* após 1, 2 e 3 dias de incubação. Não houve diferença estatísticas entre os grupos Controle, DMSO e EAP. Houve diferença estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e EMP. Ambas as amostras foram utilizadas nas concentrações de 2 mg/mL.

Fonte: ANOVA GraphPad Prism 5,1

Observou-se que não houve diferença entre crescimento das células tratadas com DMSO e EAP e do Controle. Houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre os grupos Controle e EMP.

Novos experimentos foram realizados com diferentes concentrações do EMP para determinar a menor concentração eficaz na inibição do crescimento do parasita (Figura 15). Nesse teste as concentrações foram comparadas ao grupo Controle (parasita + meio). A proliferação celular foi quantificada através da leitura da densidade óptica das placas por 10 dias.

Figura 15 - Curva de crescimento da forma epimastigota do *T. cruzi*



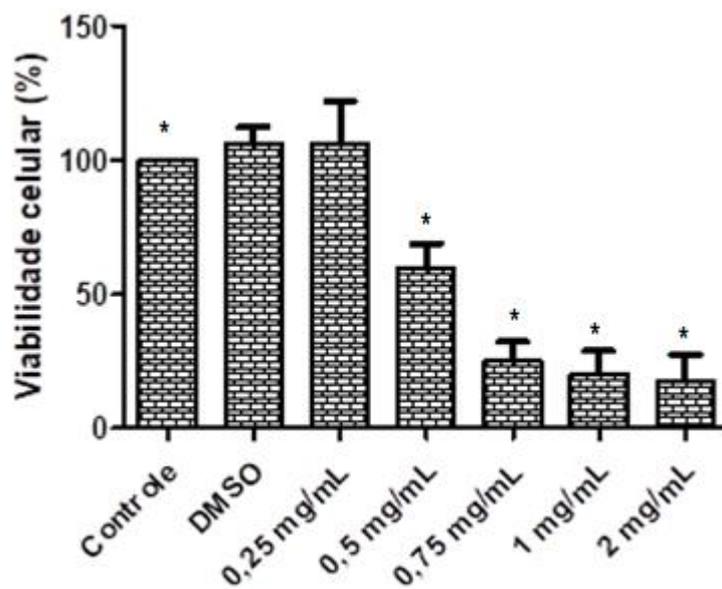
No gráfico foram avaliados os efeitos das concentrações 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, e 2 mg/mL do EMP sobre a forma epimastigotas Y do parasita *T. cruzi* por 10 dias de incubação. Houve diferença estatísticas entre os grupos Controle e 2 mg/mL ($p < 0,05$). Não houve diferença estatísticas entre os grupos Controles e 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL. Fonte: ANOVA GraphPad Prism 5, 1.

Neste experimento observou-se que os grupos 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL não demonstram diferença estatística do grupo Controle. O grupo 2 mg/mL foi eficaz na morte do parasita. Houveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos Controle e 2 mg/mL.

4.10 Viabilidade celular (células LLC-MK2)

O extrato EMP foi submetido a dois ensaios colorimétricos sobre células LLC-MK2. Essas células foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular, pois elas são as células padrão utilizadas na replicação do ciclo de infecção de *T. cruzi* no nosso laboratório. Os resultados estão representados graficamente nas Figuras 16 e 17. A viabilidade celular foi expressa em termos da absorbância das células tratadas e não tratadas (controle).

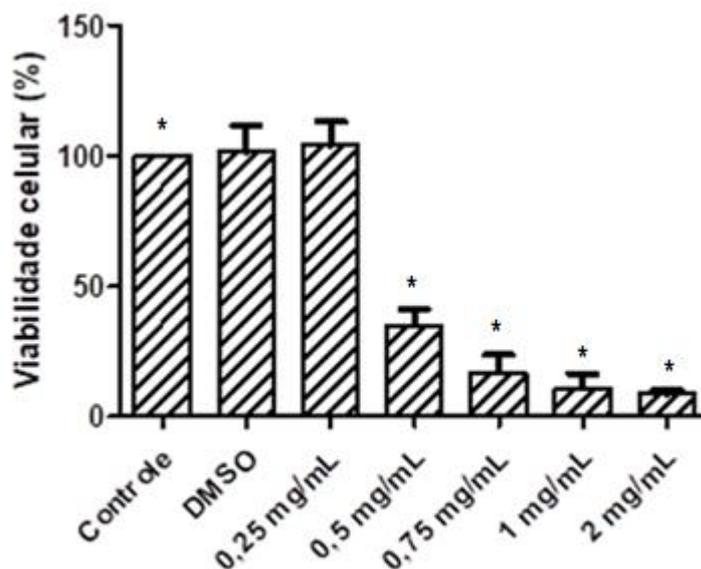
Figura 16 - Viabilidade celular de LLMC-MK2 frente ao tratamento contra amostra EMP



No gráfico foram avaliados os efeitos das concentrações da amostra EMP sobre a cultura de LLMC-MK2 após 24 h de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio AlamarBlue. Não houve diferença estatísticas entre os grupos Controle, DMSO e 0,25 mg/mL. * Houve diferença estatísticas entre o grupo Controle e os grupos 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, e 2 mg/mL ($p < 0,05$). Como o EMP foi ressuspendido com 0,5% de DMSO, foi realizado um controle com DMSO para verificar a interferência dele no crescimento celular.

Fonte: ANOVA *GraphPad Prism 5,1*.

Figura 17 - Viabilidade celular de LLC-MK2 frente ao tratamento contra amostra EMP.



No gráfico são avaliados os efeitos das concentrações da amostra EMP sobre a cultura de LLC-MK2 após 24 h de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT. Não houve diferença estatísticas entre os grupos Controle, DMSO e 0,25 mg/mL. * Houve diferença estatísticas entre o grupo Controle e os grupos 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e, 2 mg/mL ($p < 0,05$). Como o EMP foi ressuspenso em 0,5% de DMSO, foi realizado um controle com DMSO para verificar a interferência dele no crescimento celular.

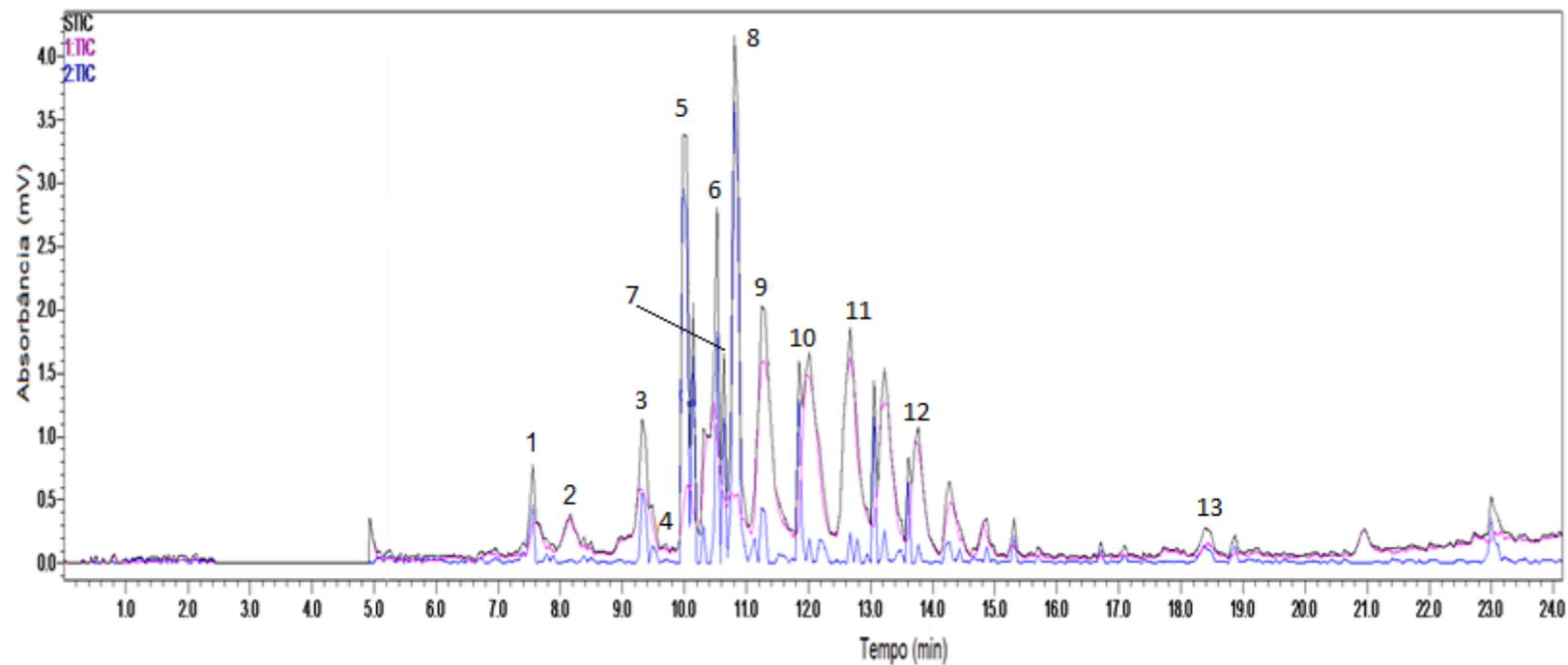
Fonte: ANOVA GraphPad Prism 5,1.

4.11 Análise dos dados de espectrometria de massas

As interpretações dos espectros de massas (Apêndices A e B) aliados ao tempo de retenção da cromatografia (Figuras 18 e 19) foram utilizadas para sugerir as estruturas dos compostos achados nas amostras 40 AQ e 40 AL, através de comparação com a literatura.

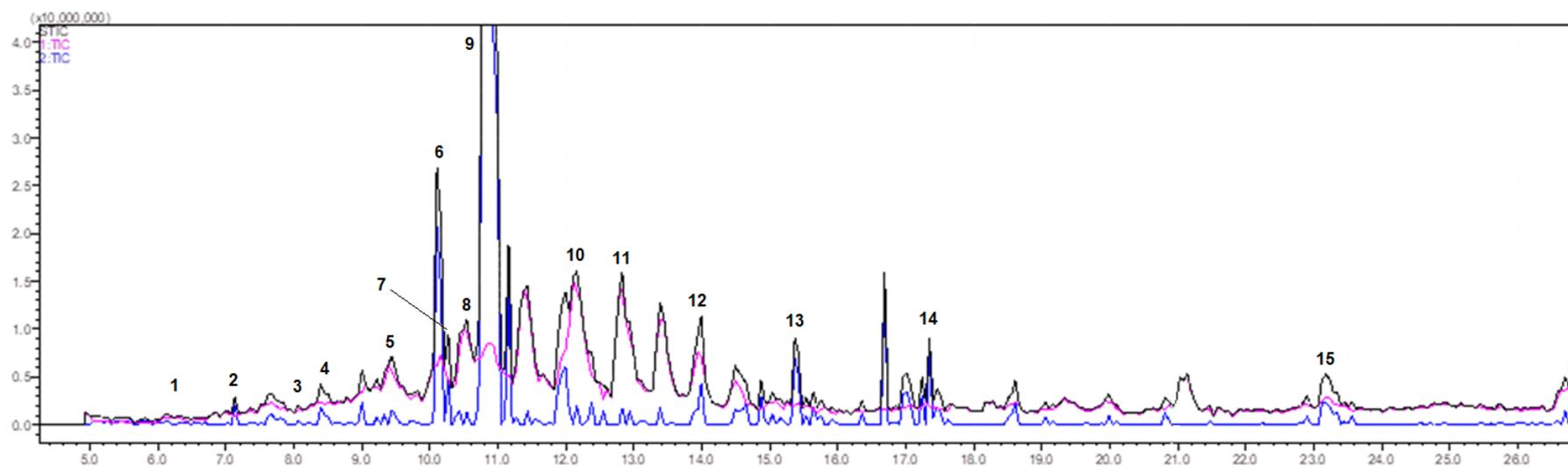
Os compostos detectados (Tabela 8) foram alcaloide das classes dos isoquinolinico, aporfínico, pirrolizidínico; flavonoides das classes flavona, flavonol, flavonol glicosídeo, além de compostos cafeoilquínicos, e composto polifenólicos. Dentre as moléculas identificadas destacamos os alcaloides pirrolozidínicos, identificados pela primeira vez na própolis de *S. aff. postica* (COELHO et al., 2015), que reproduzem mesmo compostos identificados nestas amostras própolis.

Figura 18 - Perfil cromatográfico da fração 40 AL



Perfil cromatográfico da fração 40 AL para identificação das substâncias na amostra por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

Fonte: Imagem obtida através do software *LabSolutions*.

Figura 19 - Perfil cromatográfico da fração 40 AQ

Perfil cromatográfico da fração 40 AQ para identificação das substâncias na amostra por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

Fonte: Imagem obtida através do *software LabSolutions*.

Tabela 8 - Compostos identificados nas frações 40 AL e 40 AQ.

Nº	Estrutura proposta para a fração 40 AQ	Classe de composto	Nº	Estrutura proposta para a fração 40 AL	Classe do composto
1	hidroxi asimilobine	Alcaloide porfirínico	1	Miricetina	Flavonol
2	Talifolina arabinosideo	Alcaloide isoquinolinico	2	Des-N-metil talifolina	Alcaloide isoquinolinico
3	Hidroxi metoxi talifolina	Alcaloide isoquinolinico	3	Ácido metoxi cinâmico	Fenil propanóide
4	Hexil apigenina	Flavona	4	10-dimetil magnoflorina	Alcaloide aporfínico
5	10-dimetil magnoflorina	Alcaloide aporfínico	5	Diidrofloridanina	Alcaloide pirrolizidínico
6	Ácido metoxi cinâmico	Fenil propanóide	6	7-(3-metoxi-2-metilbutiril)-9-echimidinil retronecina ou derivado de metoxi echimidina	Alcaloide pirrolizidínico
7	Raminetina ou isoraminetina	Flavonol	7	Taicanina	Alcaloide aporfínico
8	7-(3-metoxi-2-metilbutiril)-9-echimidinil retronecina ou derivado de metoxi echimidina	Alcaloide pirrolozidínico	8	Metoxi-heptahidroxi-flavona glicuronídeo	Flavonol glicosídeo

Nº	Estrutura proposta	Classe de composto	Nº	Estrutura proposta	Classe de composto
9	Cinamil arabinosídeo	Fenilpropenoídeo	9	Quercetina	Flavonol
10	Metoxi-heptahidroxi-flavona glicuronídeo	Flavonol glicosídeo	10	N-metoxicarbonil-3-metoxi-hidroxi-nordomesticina	Alcaloide aporfirínico
11	Apigenina	flavona	11	Apigenina	flavona
12	10-demetil-magnoflorina glicuronídeo	Alcaloide aporfínico	12	Formil-10-dimetil-magnoflorina glicuronídeo	Alcaloide aporfínico
13	Formil-10-dimetil-magnoflorina glicuronídeo	Alcaloide aporfínico	13	Dihidro Ribalinina	Alcaloide quinolínico
14	Norapomorpina hexosídeo	Alcaloide aporfínico			
15	Europina	Alcaloide pirrolozidínico			

Análises HPLC-ESI-IT-TOF em modo de ionização positiva. Compostos foram identificados através de literatura. Os números faltantes são os picos não identificados
 Fonte: tabela retirada do arquivo Excel.

5 DISCUSSÃO

A própolis é um produto natural de grande interesse científico (Bankova; Sforcin, 2011), muitos estudos sobre o tema vêm sendo desenvolvidos, no entanto, a maioria dos trabalhos realizados focam apenas na própolis da abelha *Apis mellifera* (Bankova; Castro; Marcucci, 2000; Cunha *et al.*, 2015). A documentação de própolis de outros grupos de abelha também é relevante para a literatura, especialmente a respeito das informações sobre a atividade biológica (Bankova; Castro; Marcucci, 2000).

Um grupo de abelhas interessante e pouco estudado, é o das *Meliponinae*, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (Bankova; Castro; Marcucci, 2000). No estado do Maranhão a própolis da abelha *S. aff. postica*, pertencente ao grupo dos meliponíneos, é utilizada pela população ribeirinha no tratamento de doenças (Araújo *et al.*, 2010), porém há poucos estudos científicos sobre seus componentes e atividades biológicas.

Sabemos que as propriedades biológicas atribuídas à própolis estão relacionadas à sua composição química (Sforcin; Bankova, 2011) e para a extração dessas substâncias são utilizados diversos tipos de solventes, estando, portanto a ação farmacológica diretamente relacionada ao solvente utilizado na produção dos extratos (Dantas *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2015; Sforcin, 2016;).

Os solventes alcoólicos são os mais eficientes na extração de moléculas bioativas (Mello; Hubinger, 2012) sendo o etanol e metanol os mais utilizados. Já foi documentado que ambos possuem capacidade de extrair compostos químicos semelhantes (Oliveira *et al.*, 2017). Outro solvente utilizado é a água. Ela apresenta menor destaque na literatura, dado seu baixo potencial na extração de substâncias (Sforcin, 2016; Kubiliene *et al.*, 2015), mas apresenta bons resultados na busca por atividades biológicas (Orsolíc *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2017; Schnitzler *et al.*, 2010).

Além disso, a ação contra microrganismos parece ser uma característica inerente da própolis, amplamente relatados na literatura (Bankova; Castro; Marcucci, 2000; Kubiliene *et al.*, 2015), com destaque para atividade contra cepas bacterianas Gram-positivas (Sforcin; Bankova, 2011; Sforcin, 2016; Dantas *et al.*, 2017).

Neste contexto, nos propusemos a estudar a própolis da abelha *S. aff. postica*, utilizando dois solventes, água e metanol, para compararmos os compostos e as atividades biológicas.

Iniciamos o trabalho pela extração da própolis, após a produção dos extratos EAP e EMP, o próximo passo foi testa-los contra cepas bacterianas e fúngicas, pois apesar da atividade biológica contra microrganismos estar sempre presente nos extratos da própolis, independente das regiões geográficas (Bankova, 2005), não tínhamos certeza se a própolis de *S. aff. postica* inibiria o crescimento microbiano.

Assim os extratos em diferentes concentrações (1.000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL e 100 µg/mL) foram testados contra 4 microrganismos (Tabela 3), através da técnica de inibição do crescimento microbiano em meio líquido (Riciluca *et al.*, 2012). Esse teste de suscetibilidade antimicrobiana foi utilizado por ser um dos mais confiáveis em termos de reprodutibilidade, além de ser o segundo mais utilizados nos laboratórios (White *et al.*, 2001). Ambas as amostras demonstraram atividade contra as bactérias e a menor concentração a inibir o crescimento bacteriano foi 200 µg/mL.

Após esse *screening* inicial, estabelecemos 200 µg/mL como concentração máxima para os próximos testes. As atividades antimicrobiana e antifúngica foram avaliadas pela determinação dos valores de MIC. A Tabela 4 mostra os resultados dos testes *in vitro*. Observamos que EMP apresentou maior atividade que o EAP, inibindo o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas.

A amostra EMP apresentou a maior atividade contra *Bacillus megaterium* e *Micrococcus luteus*, com valores de MIC de 62,5 e 125 µg/mL, respectivamente, além de inibir as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Escherichia coli* resistente à estreptomicina com valores de MIC de 200 µg/mL (valor máximo testado). O EAP inibiu as bactérias *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, e *Escherichia coli*, com valores de MIC de 200 µg/mL. Resultados com a própolis da abelha *Apis mellifera* descrevem a maior atividade antimicrobiana de extratos produzidos com solventes alcoólicos em comparação a extratos produzidos por outros tipos de solventes (Dantas *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2016; Mirzoeva; Grishanin; Calder, 1997; Neves *et al.*, 2016; Regueira *et al.*, 2017; Velikova *et al.*, 2000). Esses dados corroboram com os encontrados em nosso estudo.

Como há poucos registros da ação antimicrobiana da própolis da abelha *Scaptotrigona*, um estudo que merece destaque é o de Farnesi *et al.* (2009). No

trabalho realizaram um estudo comparativo das própolis de três espécies de abelhas: *Apis mellifera*, *Scaptotrigona sp*, e *Melipona quadrifasciata*. Os extratos etanólicos foram testados contra as cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, e *Escherichia coli*. Todos os extratos apresentaram alguma atividade antimicrobiana. O extrato da espécie da *Scaptotrigona sp* inibiu todas as cepas testadas, com efeito mais pronunciado contra a bactéria *E coli*, quando comparado aos demais extratos. Não há informações referentes aos compostos químicos presentes nesses extratos.

Maia Filho *et al.* (2008) também testaram o extrato da própolis da *Scaptotrigona sp* contra a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*. A própolis apresentou boa atividade antimicrobiana contra a bactéria periodontal, comprovando ser capaz de inibir o crescimento bacteriano. O autor concluiu que essa própolis futuramente poderá ser utilizada como medicação endodôntica.

A literatura descreve a própolis como um eficiente antibacteriano para bactérias Gram-positivas (Sforcin; Bankova, 2011; Sforcin, 2016; Dantas *et al.*, 2017), o que constata os resultados observados no nosso estudo, porém observamos que a própolis da *Scaptotrigona sp* apresenta efeitos contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. (Farnesi *et al.*, 2009; Maia Filho *et al.*, 2008) resultados semelhantes aos nossos.

Apesar de EAP ter apresentado menor atividade contra as cepas bacterianas, na literatura encontramos resultados de atividades biológicas de extratos aquosos da própolis tão eficazes quanto dos extratos alcoólicos ou compostos isolados da própolis (Orsolíc *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2017; Schnitzler *et al.*, 2010).

Para exemplificar destacamos o artigo de Oliveira *et al.* (2017). Nesse estudo foram testados fatores que impactam na composição química dos extratos e consequentemente na atividade antibacteriana. Para realização do trabalho a própolis portuguesa foi coletada de diferentes regiões durante duas estações do ano (primavera e inverno) e foram extraídas com etanol, metanol e água. O resultado da composição química dos diferentes extratos demonstrou que, no geral, os compostos extraídos pelos solventes alcoólicos eram relativamente os mesmos, já as moléculas extraídas pela água eram totalmente diferentes. Analisando os compostos, era esperando que os extratos etanólico e metanólico tivessem ações biológicas parecidas, o que se confirmou. O destaque está nos resultados do extrato aquoso que demonstrou ação antimicrobiana semelhante aos demais extratos, no

entanto, os autores atribuíram esse efeito a compostos que não puderam ser identificados, ou seja, compostos distintos daqueles identificados nos extratos alcoólicos.

Orsolić *et al.* (2004) apresentaram resultados relevantes de compostos solúveis em água (WSDP) da própolis de Zagreb, Croácia. A pesquisa compara o WSDP a outras substâncias presentes na própolis. O composto apresentou ação antitumoral e efeito protetivo mais pronunciado contra metástase do que as demais amostras. Também demonstrou efeito modulatório em macrófagos, além da indução de apoptose e necrose em células tumorais. O desfecho do trabalho exemplifica que a água pode sim viabilizar a obtenção de resultados significativos.

Outro exemplo do potencial da água como solvente é observado nos extratos produzidos com a própolis da cidade de Morávia, República Tcheca. O estudo fez uma avaliação comparativa entre os extratos aquoso e alcoólico da própolis, com relação ao aciclovir (droga padrão utilizada no tratamento contra vírus), contra o vírus da Herpes. O grupo observou que a análise da composição química das amostras difere entre os extratos, mas o resultado dos testes *in vitro* demonstra que os extratos e o fármaco inibiram a ação viral de forma semelhante. Nesse trabalho, um dos resultados mais relevantes é a rápida inativação do vírus pelo extrato aquoso quando comparado com as demais amostras (Schnitzler *et al.*, 2010).

No nosso trabalho nenhum dos extratos foi ativo contra os fungos testados. Esses resultados negativos no teste da atividade antifúngica foram inesperados, porque a própolis já foi descrita anteriormente como um potente agente antifúngico (Freires; Alencar; Rosalen, 2016a; Neves *et al.*, 2016; Petelinc *et al.*, 2013; Popova *et al.*, 2011). Mas também há estudos onde a própolis não demonstrou ação antifúngica. No estudo realizado por Dantas *et al.* (2017), foi obtido um resultado semelhante ao nosso. Eles utilizaram 8 amostras de própolis brasileiras (vermelha, verde e marrom) de diferentes regiões e duas técnicas de extração (etanol e supercrítica), produzindo 16 amostras. Para avaliar a atividade biológica das amostras optou-se pela realização de testes antimicrobianos. Os resultados dos experimentos evidenciaram que as amostras da própolis vermelha produzidas com solvente alcoólico apresentaram maior atividade antimicrobiana, mas nenhum dos extratos inibiu o fungo *Candida albicans*. Esses dados sugerem que apesar da própolis demonstrar bons resultados antibacterianos, independente da origem

geográfica, do tipo de própolis e do tipo de extração, nem sempre será observada ação antifúngica.

Os extratos também foram avaliados quanto a sua atividade citotóxica em células VERO. Esses ensaios de citotoxicidade são amplamente utilizados, especialmente no campo do desenvolvimento de novas drogas (van Meerloo; Kaspers; Cloos, 2011). Os extratos EMP e EAP foram testados quanto à toxicidade através do ensaio colorimétrico do MTT (Mosmann, 1983), que consiste em um dos métodos mais utilizados para avaliar a proliferação celular e citotoxicidade (Lui *et al.*, 2002). No ensaio, nenhum dos extratos apresentou atividade citotóxica na concentração de 200 µg/mL quando comparados ao controle de células. O ensaio MTT é considerado um método válido como medida de viabilidade celular, porque mede a endocitose, uma característica fundamental das células vivas (Lui *et al.*, 1997), além de apresentar vantagens por ser rápido e de fácil execução, permitindo que um grande número de amostras possam ser testadas em um único lote (van Meerloo; Kaspers; Cloos, 2011). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism através do teste ANOVA, utilizado para comparar dois ou mais grupos. Nos resultados obtidos observamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 9), o que mostra que os extratos não foram tóxicos para a linhagem de células utilizada.

A avaliação toxicológica do extrato hidroalcoólico (PHE) da própolis da abelha *S. aff. postica* já havia sido relatado na literatura. Com a utilização dessa própolis no tratamento de doenças no Maranhão (Araújo *et al.*, 2010), a criação dessas abelhas passou a ser uma atividade relacionado ao desenvolvimento econômico do Estado. Nesse contexto foi observada a necessidade de uma avaliação farmacológica e toxicológica do extrato. Araujo *et al.* (2011), realizaram seu estudo de acordo com a Lei nº. 116/96 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O teste de toxicidade aguda de PHE não induziu a morte dos animais, mesmo quando recebem altas doses (1000, 2000 e 4000 mg/kg⁻¹), segundo ANVISA, a dosagem limitante para avaliação toxicológica aguda é 2000 mg/kg⁻¹. Também não houve alteração encontrada no estudo hematológico, que o autor atribuiu à baixa toxicidade do extrato.

O mecanismo de ação da própolis na colmeia não é totalmente elucidado. Sugere-se que o efeito protetivo ocorra devido ao sinergismo de sua composição química (Drescher *et al.*, 2014). Nessa mesma linha, a literatura supõe que a

atividade biológica dos extratos só ocorra pela ação sinérgica entre as substâncias extraídas da própolis (Bankova, 2005; Drescher et al., 2014; Dantas et al., 2017). No entanto, alguns estudos já demonstraram que a separação das substâncias presentes no extrato pode potencializar o efeito biológico observado (Freires; de Alencar; Rosalen, 2016; Petelinc et al., 2013).

Assim, para entendermos melhor a atividade bacteriana dos extratos estudados, realizamos o fracionamento do EAP e do EMP pela técnica de extração em fase sólida. Essa técnica já foi utilizada para separação de amostras complexas como a própolis e se mostrou eficiente (Petelinc *et al.*, 2013), atualmente, pode ser classificada como uma das técnicas clássicas de separação de substâncias (Płotka *et al.*, 2017). Os extratos brutos da própolis foram separados de acordo com a polaridade. As frações eluídas do EAP foram 5 AQ, 40 AQ e 80 AQ e do EMP foram 5 AL, 40 AL e 80 AL.

As frações foram submetidas a um novo *screening* de atividade contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, todas as frações foram testadas na concentração de 200 µg/mL. Observamos que as frações 40 AQ, 40 AL e 5 AL inibiram o crescimento de todas as bactérias (Tabela 5). Novamente não foi observada ação antifúngica. Selecionamos as frações 40 AQ e 40 AL para a realização do MIC com um número maior de cepas bacterianas e apesar de não identificarmos inibição do crescimento dos fungos, ampliamos as cepas de leveduras testadas.

Ambas as frações (40 AQ e 40 AL) inibiram o crescimento bacteriano com valores de MIC semelhantes (Tabela 6). Observamos que o EAP não teve ação contra a bactéria *Escherichia coli*, resistente à estreptomicina, mas a fração eluída a partir desse extrato foi capaz de inibir seu crescimento. A partir desse resultado podemos inferir que a inibição da cepa Gram-negativa não ocorre pelo sinergismo de todas as substâncias presentes nos extratos brutos (EAP e EMP). Petelinc *et al.* (2013), observaram resultados semelhantes aos nossos, a medida que em seu estudo o extrato bruto da própolis colhida na Eslovénia e suas frações (obtidas através da técnica de separação em fase sólida) foram testadas quanto à atividade antioxidante, medida pela oxidação intracelular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155). Eles observaram que, as frações EL60 e EL70 apresentaram atividade antioxidante mais pronunciada e maior conteúdo fenólico quando comparados às demais amostras, principalmente quando comparado ao extrato

bruto. O estudo demonstrou que a ação biológica não está relacionada a todos os compostos da própolis, mas apenas a uma parte dele.

Para identificar quais seriam os componentes presentes nas frações 40 AQ e 40 AL, ambas foram submetidas a espectrometria de massas acoplada a CLAE-FR. As interpretações dos espectros de massas foram utilizadas para sugerir as estruturas dos compostos achados nas amostras. Os compostos detectados (Tabela 8) foram alcaloides das classes dos isoquinolínico, aporfínico, pirrolizidínico; flavonoides das classes flavona, flavonol, flavonol glicosídeo, além de compostos cafeoilquínicos, e composto polifenólicos. Os alcaloides foram identificados em maior presença na fração eluída do extrato aquoso e os flavonoides na fração eluída do extrato alcoólico.

A pesquisa sobre os componentes químicos da própolis de *S. aff. postica* já havia sido descrita anteriormente. Araújo *et al.* (2011), em um trabalho pioneiro sobre própolis da *S. aff. postica*, identificou altas concentrações de flavonoides e triterpenos no extrato hidroalcoólico dessa abelha. O conteúdo total de flavonóides (0,55%) e fenóis (11,95%) mostraram valores acima do mínimo (0,25% e 0,50%) exigidos pela legislação brasileira. No entanto, eles não caracterizaram esses compostos.

Nosso grupo de estudo, em um trabalho anterior, foi o primeiro a identificar as substâncias presentes no extrato hidroalcoólico da própolis da *S. aff. postica*. Dentre as moléculas descritas, os alcaloides pirrolozidínicos foram identificados pela primeira vez na própolis. Também foi avaliada a ação biológica do extrato contra os vírus da Herpes, Sarampo, Picornavírus, Rubéola e da gripe. A própolis inibiu todos os vírus. Sugere-se que o extrato interfira na adsorção do capsídeo à célula. A interferência impede a entrada do vírus na célula hospedeira, inibindo assim a replicação viral (Coelho *et al.*, 2014; 2015).

A atividade antimicrobiana da própolis foi analisada em muitas pesquisas e as amostras contendo altas concentrações de compostos fenólicos e flavonóides são frequentemente relatadas com ação bacteriana. Muitos grupos de pesquisa isolaram e identificaram estrutura dos flavonoides que possuem atividade antibacteriana tais como os flavonóides apigenina, quercetina, miricetina e vários glicósidos de quercetina (Cushnie; Lamb, 2005). Essas estruturas foram encontradas na fração 40 AL.

Os flavonoides quercetina e miricetina foram associados à inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli* (Desoti *et al.*, 2011). Esses mesmos flavonoides também apresentaram ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), com destaque para a miricetina, que demonstrou ser ativa contra *Enterococcus* resistentes à Vancomicina (VRE), *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Xu; Lee, 2001). Estes dados corroboram os resultados observados a partir da fração 40 AL, no extrato foram identificadas concentrações dos flavonóides quercetina, miricetina, além da inibição do crescimento bacteriano das cepas *S. aureus*, *M. luteus* e *E. coli*. Não podemos afirmar se os compostos isolados, ou a interação desses flavonóides juntamente com as demais substâncias, foram determinantes para a atividade biológica observada.

Alguns estudos demonstraram os flavonóides apigenina e quercetina causam danos estruturais na membrana citoplasmática externa das bactérias (Regueira-Neto *et al.*, 2018).

Dentre as principais classes de alcaloides que exibem atividade antibacteriana encontramos os quinolínico, isoquinolínico e pirrolizidínico (Cushnie; Cushnie; Lamb, 2014). Extratos com alto teor de alcaloides pirrolizidínicos (AP) apresentaram ação contra os microrganismos *C. albicans*, ao *M. luteus* e *E. coli*. Sugere-se que a ação antibacteriana esteja associada à capacidade dos AP em interferir na composição de ácidos nucleicos e proteínas. Ao entrarem em contato com o alcaloide sofrem desidrogenização catalisada por monooxigenases do sistema citocromo P450, interrompendo assim o ciclo celular do microrganismo (Deuschle *et al.*, 2007). Essas informações assemelham-se aos resultados encontrados no presente estudo. A fração 40 AQ exibiu, majoritariamente AP, além de outras classes de alcaloides, eficiência na inibição das bactérias *M. luteus* e *E. coli*. Assim como os dados gerados pela fração 40 AL, não podemos afirmar quais compostos desempenham a atividade biológica observada.

As frações também foram avaliadas quanto a sua atividade citotóxica pelo ensaio de MTT. No ensaio, nenhuma das frações apresentou atividade citotóxica na concentração de 200 µg/mL quando comparados ao controle de células. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism através do teste ANOVA, utilizado para comparar dois ou mais grupos. Nos resultados obtidos

observarmos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 11), o que mostra que os extratos não foram tóxicos para a linhagem de células utilizada.

Conforme relatamos acima, mesmo após o fracionamento, verificamos que as amostras ainda demonstram complexidade quanto ao número de compostos presentes em cada fração, não sendo possível inferir qual composto ou compostos seriam os responsáveis pela atividade antibacteriana. Então, as frações 40 AL e 40 AQ foram submetidas a um novo fracionamento por CLAE-FR (Figuras 12 e 13). Após esse segundo fracionamento, as concentrações das amostras foram substancialmente reduzidas, dessa forma optamos por secar todas as amostras e ressuspendê-las em 1 mL de meio de cultura e testá-las novamente. Os testes antimicrobianos demonstram que as sub frações inibiram o crescimento da bactéria *M. luteus* (Tabela 7). Após esses resultados observamos que a própolis da *S. aff. postica* possui atividade antimicrobiana, porém não pudemos determinar quais os compostos possuem essa atividade. Para tanto, mais estudos se fazem necessários.

Paralelamente aos ensaios antimicrobianos, extratos EAP e EMP, foram testados contra o parasita *T. cruzi*. A doença de Chagas é uma patologia que ainda apresenta desafios. Os medicamentos clínicos disponíveis são eficazes apenas na fase aguda da infecção (Menna-Barreto *et al.*, 2009). O tratamento geralmente é abandonado pelos pacientes devido a reações adversas fortes aos medicamentos, administração complicada, toxicidade e o alto custo. Esses problemas também são agravados pelo desenvolvimento da resistência aos medicamentos parasitários (Regueira-Neto *et al.*, 2018). Um número crescente de estudos sobre a própolis tem investigado os efeitos antiparasitários contra o *T. cruzi* (Dantas *et al.*, 2017; Regueira-Neto *et al.*, 2018). Até onde sabemos não há estudos sobre a ação da própolis da abelha *S. aff. postica* contra a doença de Chagas.

Assim iniciamos os ensaios de inibição de crescimento (Damasceno *et al.*, 2014) contra *T. cruzi* (epimastigota), na concentração de 2 mg/mL, por 3 dias. Os resultados observados demonstram atividade do extrato alcoólico (Figura 14). Como amplamente relatado, as atividades de própolis se devem à presença de flavonóides em sua composição, inclusive para as atividades antiparasitárias (Dantas *et al.*, 2017; Regueira-Neto *et al.*, 2018). Esses dados estão de acordo com os resultados por nós encontrados. Apesar de não identificarmos os compostos do extrato bruto, a análise da fração 40 AL (proveniente do EMP), indicou a maior presença de flavonóides nesse extrato.

A nova curva de crescimento foi realizada com diferentes concentrações (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL) do EMP, no intervalo de 10 dias (Tabela 15). Observamos que a maior concentração do EMP testada (2 mg/mL) inibiu os parasitas já nas primeiras 24h e manteve esse resultado até o 10º dia. No entanto, outras concentrações não apresentaram diferença na taxa de morte das formas epimastigotas quando comparadas ao controle.

Em estudo comparando a atividade antiparasitária de três diferentes tipos de própolis brasileira (verde, marrom e vermelha) da abelha *Apis mellifera* contra *T. cruzi*, Dantas *et al.* (2017), observaram que os extratos etanólicos, nas concentrações de 75 e 300 mg/mL, no geral inibiram o parasita nas primeiras 24h, mas a amostra de própolis vermelha, na concentração de 300 mg/mL apresentou maior atividade (98%) em comparação com outros tipos de própolis (90%).

Regueira-Neto *et al.* (2018) testou três própolis vermelhas, colhidas nos estados do Pernambuco e Alagoas bem como o extrato da *Dalbergia ecastaphyllum* (árvore conhecida como fonte botânica para essa própolis) contra epimastigotas de *T. cruzi*. Os extratos foram testados nas concentrações de 15.62 a 1.000 µg/mL. Os três extratos da própolis inibiram 80% do crescimento do parasita nas concentrações de 1.000, 500, 250 e 125 µg/mL. A própolis de Pernambuco foi a única a matar quase 100% dos epimastigota na concentração de 1.000 µg/mL. O extrato de resina *Dalbergia ecastaphyllum* obteve menor desempenho comparado aos demais extratos. O autor sugere que as abelhas podem possivelmente modular os compostos químicos presentes na resina da planta durante a produção de própolis ampliando a atividade biológica dos compostos. Os mecanismos pelos quais a própolis pode matar parasitas do *Trypanosoma* envolvem alterações mitocondriais e da membrana plasmática. Foi observado que a morte da forma epimastigota se dá pela formação de edema mitocondrial, vacúolos alterados e formações de mielina. Tais alterações comprometem a biossíntese lipídica dos epimastigotas de *T. cruzi*, afetando sua membrana plasmática (Regueira-Neto *et al.*, 2018).

O EMP foi avaliado quanto à sua atividade citotóxica em células LLC-MK2. Essas células foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular, pois elas são células padrão utilizadas na replicação do ciclo de infecção de *T. cruzi* em nosso laboratório. Os ensaios colorimétricos utilizados foram MTT (Mosmann, 1983) e a resazurina (Alamar Blue), para maior confiabilidade nos resultados. O Alamar Blue, é

empregado em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular, determinando a função mitocondrial, além de ser comumente utilizado na literatura (Rolón *et al.*, 2006).

O extrato EMP foi testado nas concentrações 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL. O EMP apresentou atividade citotóxica na concentração de 0,5 mg/mL a 2 mg/mL (Figura 16,17). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism através do teste ANOVA, utilizado para comparar dois ou mais grupos. Nos resultados obtidos observamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos Controle, DMSO e 0,25 mg/mL. Quando o grupo Controle foi comparado aos grupos 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$), o que mostra que os extratos nessas concentrações foram tóxicos para a linhagem de células utilizada. Esses resultados nos surpreenderam, pois conforme descrito anteriormente, o extrato hidroalcoólico já havia sido testado em concentrações superiores aos do nosso estudo e não demonstraram atividade citotóxica (Araújo *et al.*, 2011). No entanto, a concentração de 0,25 mg/mL repetiu os resultados apresentados no ensaio com linhagem de células VERO, ou seja, não foram tóxicas para as células testadas.

Após esses resultados observamos que a própolis de *S. aff. postica* possui atividade antiparasitária, porém não pudemos determinar quais compostos possuem essa atividade. São necessários estudos mais detalhados sobre o assunto..

6 CONCLUSÕES

1. A própolis da abelha *S. aff. postica* possui ação antimicrobiana e antiparasitária.

2. Os extratos brutos aquoso e alcoólico, suas frações e sub frações apresentaram ação contra bactérias Gram-positivas, e as frações 40 AL e 40 AQ inibiram a bactéria Gram-negativa *E. coli* resistente a estreptomicina, resultado inédito para a própolis da *S. aff. postica*

3. Os extratos e suas frações não apresentaram atividade citotóxica em células VERO.

4. Foram identificados alcaloides pirrolizidínicos e aporfirínicos, flavonoides, compostos cafeoilquínicos e compostos polifenólicos nas frações 40 AL e 40 AQ.

5. O EMP apresentou ação antichagásica contra a forma epimastigota CL Brener do *T. cruzi* resultado também inédito para a própolis da *S. aff. postica*.

6. O EMP apresentou atividade citotóxica em células LLC-MK2.

REFERÊNCIAS¹

Anjum, S.I.; Ullah, A.; Khan, K.; Attaullah, M.; Khan, H.; Ali, H.; Bashir, M.A.; Tahir, M.; Ansari, M.J.; Ghrah, H.A.; Adgaba, N.; Dask, C.K. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi J Biological Sciences**, 2018.

Antinori, S.; Galimberti, G.; Bianco, R.; Grande, R.; Galli, M.; Corbellino, M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **Eur J Intern Med**, v. 43, p. 6-15, 2017.

Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A.L.; González, K.; Reyes-Lezama, M.; Villaseñorc, J.L.; Romo de Vivar, A. Pyrrolizidine Alkaloids and Diterpenes from *Villasenorina orcuttii*. **J Braz Chem Soc**, v. 24, n. 7, p. 1167-1171, 2013.

Araújo, M.J.A.M.; Dutra, R.P.; Costa, G.C.; Reis, A.S.; Assunção, K.M.; Libério, S.A.; Silva, L.; Guerra, R.N.M.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Rev Bras farmacogn**, v. 20, n. 4, p. 580-587, 2010.

Araújo, M.J.A.M.; Dutra, R.P.; Costa, G.C.; Reis, A.S.; Assunção, A.K. M.; Libério, S.A.; Silva, L.; Guerra, R.N.M.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. **Nat Prod Res**, v. 25, n. 11, p. 1037-1046, 2011.

Avula, B.; Sagi, S.; Wang, Y.H.; Zweigenbaum, J.; Wang, M.; Khan, I.A. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. **Food Chem**, v. 178, p.136-148, 2015.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

Balouz, V.; Agüero, F.; Buscaglia, C.A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. **Adv Parasitol**, v. 97, p. 1-45, 2017.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

Bankova, V.; Castro, S.L.; Marcucci, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

Bankova, V.; Galabov, A.S.; Antonova, D.; Vilhelmova, N.; Di Perri B. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1432-1438, 2014.

Bolechová, M.; Cáslavský, J.; Pospíchalová, M.; Kosubová, P. UPLC–MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed. **Food Chem**, v. 170, p. 265-270, 2015.

Boppré, M.; Colegate, S.M.; Edgar, J.A. Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 3, p. 594–600, 2005.

Boppré, M.; Colegate, S.M.; Edgar, J.A.; Fischer, O.W. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying related implications for commercial processing of bee pollen. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 14, p. 5662–5672, 2008.

Boppré, M. The ecological context of pyrrolizidine alkaloids in food, feed and forage: an overview. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 28, n. 3, 260–281, 2011.

Borges, K.S.; Brassesco, M.S.; Scrideli, C.A.; Soares, A.E.E.; Tone, L.G. Antiproliferative effects of tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genet Mol Biol**, v. 34, n. 2, p. 310-314, 2011.

Bradley, P.; Gordon, N.C.; Walker, T.M.; Dunn, L.; Heys, S.; Huang, B.; Earle, S.; Pankhurst, L.J.; Anson, L.; de Cesare, M.; Piazza, P.; Votintseva, A.A.; Golubchik, T.; Wilson, D.J.; Wyllie, D.H.; Diel, R.; Niemann, S.; Feuerriegel, S.; Kohl,

T.A.; Ismail, N.; Omar, S.V.; Smith, E.G.; Buck, D.; McVean, G.; Walker, A.S.; Peto, T.E.; Crook, D.W.; Iqbal, Z. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Commun**, v. 6, 10063, 2015.

Búfalo, M.C.; Bordon-Graciani, A.P.; Conti, B.J.; de Assis Golim, M.; Sforcin, J.M. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n. 10, p. 1497-1504, 2014.

Burdock, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

Camargo, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. **Rev Inst Med Trop**, v. 6, p. 93-100, 1964.

Carvalho, J.C.B.; Almeida, H.S.; Lobo, J.F.R.; Ferreira, J.L.P.; Oliveira, A.P.; Rocha, L. Pyrrolizidine alkaloids in two endemic capeverdian *Echium* species. **Biochem Syst Ecol**, v. 50, p. 1-6, 2013.

Castells, E.; Mulder, P.P.; Pérez-Trujillo, M. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in native and invasive *Senecio pterophorus* (Asteraceae): implications for toxicity. **Phytochemistry**, v. 108, p. 137-146, 2014.

Chandra, H.; Bishnoi, P.; Yadav, A.; Patni, B.; Mishra, A.P.; Nautiyal, A.R. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials-A Review. **Plants (Basel)**, v. 6, n. 2, pii: E16, 2017.

Coelho, G.R.; Villar, K.S.; Figueiredo, C.A.; Badari, J.C.; Mendonça, R.M.Z.; Oliveira, M.I.; Curti, S.P.; Silva, P.E.S.; Do Nascimento, R.M.; Mendonça, R.Z. Antiviral effects of *Scaptotrigona postica* propolis and their fractions. **BMC Proc**, v. 8, n. 4, p63, 2014.

Coelho, G.R.; Mendonça, R.Z.; Villar, K.S.; Figueiredo, C.A.; Badari, J.C.; Taniwaki, N.; Naiyaa, G.; Oliveira, M.I.; Curti, S.P.; Silva, P.E.; Negri, G. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against

Antiherpes Simplex Virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-10, 2015.

Cook D, Lee S T., Gardner D. R., Pfister J. A., Welch K. D., Green B. T., Davis T. Z., Panter Kip E.. 2009. The Alkaloid Profiles of *Lupinus sulphureus*. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 4, p. 1646–1653, 2009.

Cornara, L.; Biagi, M.; Xiao, J.; Burlando, B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. **Front Pharmacol**, v. 8, n. 412, 2017.

Cramer, L.; Schiebel, H.M.; Ernst, L.; Beuerle, T. Pyrrolizidine alkaloids in the food chain: development, validation, and application of a new HPLC-ESI-MS/MS sum parameter method. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 47, p. 11382–11391, 2013.

Cremer, S.; Pull, C.D.; Fürst, M.A. Social Immunity: Emergence and Evolution of Colony-Level Disease Protection. *Annu Rev Entomol*, v. 63, p. 105-123, 2017.

Cuca-Suarez, L.E.; Barrera, E.D.C.; Caballero, J.M.A. Quinoline alkaloids and friedelane-type triterpenes isolated from leaves and wood of *Esenbeckia alata* Kunt (Rutaceae). **Quim Nova**, v. 34, n. 6, p. 984-986, 2011.

Cunha, M.G.; Rosalen, P.L.; Franchin, M.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Ransom, T.; Beutler, J.A. Componentes antiproliferativos de Geopropolis da Bee *Melipona scutellaris*. **Planta Med**, v.82, n. 3, p. 190-194, 2016.

Cushnie, T.P.; Cushnie, B.; Lamb, A.J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 5, p. 377–386, 2014.

Cushnie, T.P.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

Damasceno, F.S.; Barisón, M.J.; Pral, E.M.; Paes, L.S.; Silber, A.M. Memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2717, 2014.

Dantas Silva, R.P.; Machado, B.A.; Barreto, G.A.; Costa, S.S.; Andrade, L.N.; Amaral, R.G.; Carvalho, A.A.; Padilha, F.F.; Barbosa, J.D.; Umsza-Guez, M.A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

Davies, J.; Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

Desoti, V.C.; Maldaner, C.L.; Carletto, M.S.; Heinz, A.A.; Coelho, M.S.; Piaty, D.; Tiuman, T.S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq Ciênc Saúde Unipar**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

Deuschle, R.A.; Camargo, T.; Alves, H.S.; Mallmann, C.A.; Heizmann, B.M. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmac**, v. 17, n. 2, p. 220-223, 2007.

Evans, J.D.; Pettis, J.S. Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. **Evolution**, v. 59, n. 10, p. 2270-2274, 2005.

Falcão, S.I.; Vilas-Boas, M.; Estevinho, L.M.; Barros, C.; Domingues, M.R.M.; Cardoso, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, n. 2, p. 887-897, 2010.

Farias, J.H.; Reis, A.S.; Araújo, M.A.; Araújo, M.J.; Assunção, A.K.; Farias, J.C.; Fialho, E.M.; Silva, L.A.; Costa, G.C.; Guerra, R.N.; Ribeiro, M.N.; Nascimento, F.R. Effects of stingless bee propolis on experimental asthma. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 8 p., 2014.

Farnesi, A.P.; Aquino-Ferreira, R.; De Jong, D.; Bastos, J.K.; Soares, A.E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res*, v. 8, n. 2, p. 635-640, 2009.

Freires, I.A.; Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem*, v. 110, p. 267-279, 2016a.

Freires, I.A.; Queiroz, V.C.; Furletti, V.F.; Ikegaki, M.; de Alencar, S.M.; Duarte, M.C.; Rosalen, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida spp.* *J Mycol Med*, v. 26, n. 2, p. 122-132, 2016b.

Galeotti, F.; Maccari, F.; Fachini, A.; Volpi, N. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. *Foods*, v. 7, n. 3, pii: E41, 2018.

Garcia, A.Á; Carril, E.P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biologia). Serie Fisiologia vegetal**, v.2, n. 3, p. 119-145, 2009.

Ghannoum, M.A.; Rice, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*, v. 12, n. 4, p. 501-17.

Ghisalberti, E.L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1979.

Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol*, v. 9, n. 12, p. 767-776, 2007.

Griffin, C.T.; Danaher, M.; Elliott, C.T.; Glenn Kennedy, D.; Furey, A. Detection of pyrrolizidine alkaloids in commercial honey using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Food Chem*, v. 136, n. 3-4, p. 1577–1583, 2013.

Guo, J.L.; Feng, Z.M.; Yang, Y.J.; Zhang, Z.W.; Zhang, P.C. Pollenopyrroside A and B, Novel Pyrrole Keto-hexoside Derivatives from Bee-Collected *Brassica campestris* Pollen. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 58, n. 7, p. 983-985, 2010.

Huang, S.; Zhang, C.P.; Wang, K.; Li, G.Q.; Hu, F.L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

Jiang, C.; Li, Z.L.; Gong, P.; Kang, S.L.; Liu, M.S.; Pei, Y.H.; Jing, Y.K.; Hua, H.M. Five novel naphthylisoquinoline alkaloids with growth inhibitory activities against human leukemia cells HL-60, K562 and U937 from stems and leaves of *Ancistrocladus tectorius*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 305-312, 2013.

Kapadia, N.; Harding, W. Aporphine Alkaloids as Ligands for Serotonin Receptors. **Med chem**, v. 6, p. 241-249, 2016.

Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**, v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017.

Kubiliene, L.; Laugaliene, V.; Pavilionis, A.; Maruska, A.; Majiene, D.; Barauskaite, K.; Kubilius, R.; Kasparaviciene, G.; Savickas, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, n. 156, 2015.

Ladino, O.J.P.; Suárez, L.E.C. Isoquinoline alkaloids of *Zanthoxylum quinduense* (Rutaceae). **Biochem System Ecol**, v. 38, n. 4, p. 853-885, 2010.

Lai, D.; Brötz-Oesterhelt, H.; Müller, W.E.G.; Wray, V.; Proksch, P. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 100-106, 2013.

Levy, S.B.; Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, v. 10, n. 12 Suppl, p. 122-129, 2004.

Liu, Y.; Peterson, D.A.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J Neurochem**, v. 69, n. 2, p. 581–593, 1997.

Machado, C.S.; Mokochinski, J.B.; Lira, T.O.D.; de Oliveira, F.D.C.E.; Cardoso, M.V.; Ferreira, R.G.; Sawaya, A.C.H.F.; Ferreira, A.G.; Pessoa, C.; Cuesta-Rubio, O.; Monteiro, M.C.; Campos, M.S.; Torres, Y.R. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, 11p., 2016.

Madge, I.; Cramer, L.; Rahaus, I.; Jerz, G.; Winterhalter, P.; Beuerle, T. Pyrrolizidine alkaloids in herbal teas for infants, pregnant or lactating women. **Food Chem**, v. 187, p. 491-498, 2015.

Maia-Filho, E.M.; Maia, C.C.R.; Bastos, A.C.S.C.; Novais, T.M.G. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicacões endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 56, n. 1, p. 21–25, 2008.

Malanovic, N.; Lohner, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, V. 1858, n. 5, p. 936-946, 2016.

Mello, B.C.B.S.; Hubinger, M.D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **Inter J Food Sci Tech**, v. 47, n. 12, p. 2510–2518, 2012.

Menna-Barreto, R.F.S.; Salomão, K.; Dantas, A.P.; Santa-Rita, R.M.; Soares, M.J.; Barbosa, H.S.; de Castro, S.L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157–168, 2008.

Mathon, C.; Edder, P.; Bieri, S.; Christen, P. Survey of pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas on the Swiss market using HPLC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 406, n. 28, p. 7345-7354, 2014.

Mirzoeva, O.; Grishanin, R.; Calder, P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol Res**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

Moret, Y.; Schmid-Hempel, P. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. **Science**, v. 290, n. 5494, p. 1166-1168, 2000.

Morse, R.A.; Flottum, K. **Honey bee pests, predators and diseases**. Northern Bee Books, 3 Ed., Medina, 1997.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

Nakamura, R.; Nakamura, R.; Watanabe, K.; Oka, K.; Ohta, S.; Mishima, S.; Teshima, R. Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis. *Int Immunopharmacol*, v. 10, n. 9, p. 1107-1112, 2010.

Nardin, T.; Piasentier, E.; Barnaba, C.; Larcher, R. Targeted and untargeted profiling of alkaloids in herbal extracts using online solid-phase extraction and high-resolution mass spectrometry (Q-Orbitrap). **J Mass Spect**, v. 51, n. 9, p. 729-741, 2016.

Neves, M.V.; da Silva, T.M.; Lima Ede, O.; da Cunha, E.V.; Oliveira Ede, J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida sp.* *Braz J Microbiol*, v. 47, n. 1, p. 159-166, 2016.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

Nikolić, D.; Gödecke, T.; Chen, S.N.; White, J.; Lankin, D.C.; Pauli, G.F.; van Breemen, R.B. Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.). **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 441-460, 2012.

Nogueira–Neto, P. **Vida e criação das abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

Oliveira, A.V.; Ferreira, A.L.; Nunes, S.; Dandlen, S.A.; Miguel, D.G.D.G.; Faleiro, M.L. Antibacterial activity of propolis extracts from the south of Portugal. **Pak J Pharm Sci**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2017.

Orantes-Bermejo, F.J.; Serra Bonvehí, J.; Gómez-Pajuelo, A.; Megías, M.; Torres, C. Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in Spanish honey collected from purple viper's bugloss (*Echium spp.*). **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 30, n. 10, p. 1799-1806, 2013.

Orsolic, N.; Knežević, A.H.; Sver, L.; Terzić, S.; Basic, E. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J Ethnopharmacol**, v. 94, n. 23, p. 307-315, 2004.

Oryan, A.; Alemzadeh, E.; Moshiri, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomed Pharmacother**, v. 98, p. 469–83, 2018.

Otti, O.; Tragust, S.; Feldhaar, H. Unifying external and internal immune defences. **Trends Ecol Evol**, v. 29, n. 11, p. 625-634, 2014.

Pabon, L.C.; Cuca, L.E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Quim Nova**, v. 33, n. 4, p. 875-879, 2010.

Padilha, A.M.; Bustamante, J.M.; Tarleton, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 4, p. 385-390, 2009.

Park, Y.K.; Alencar, S.M.; Aguiar, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

Pereira, A.S.; Seixas, F.R.M.S; Aquino Neto, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

Pérez-Molina, J.A.; Molina, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82-94, 2018.

Petelinc, T.; Polak, T.; Demšar, L.; Jamnik, P. Fractionation of phenolic compounds extracted from propolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56104, 2013.

Plotka-Wasyłka, J.; Marć, M.; Szczepańska, N.; Namieśnik, J. New Polymeric Materials for Solid Phase Extraction. **Crit Rev Anal Chem**, v. 47, n. 5, p. 373–383, 2017.

Popova, M.P.; Graikou, K.; Chinou, I.; Bankova, V.S. GC–MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 5, p. 3167-3176, 2010.

Popova, M.P.; Trusheva, B.; Antonova, D.; Cutajar, S.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Bankova, V. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. **Food Chem**, v. 126, n. 3, p. 1431-1435, 2011.

Regueira-Neto, M.S.; Tintino, S.R.; da Silva, A.R.P.; Costa, M.D.S.; Boligon, A.A.; Matias, E.F.F.; de Queiroz Balbino, V.; Menezes, I.R.A.; Melo Coutinho, H.D. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food Chem Toxicol**, v. 107, pt B, p. 572-580, 2017.

Regueira-Neto, M.D.S.; Tintino, S.R.; Rolón, M.; Coronal, C.; Vega, M.C.; de Queiroz Balbino, V.; de Melo Coutinho, H.D. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. **Food Chem Toxicol**, v. 119, p. 215–221, 2018.

Riciluca, K.C.T.; Sayegh, R.S.R.; Melo, R.L.; Silva JR, P.I. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in Immunology**, v. 2, p. 66-71, 2012.

Robertson, J.; Stevens, K. Pyrrolizidine alkaloids. **Nat Prod Rep**, v. 31, n. 12, p. 1721-1788, 2014.

Roca, I.; Akova, M.; Baquero, F.; Carlet, J.; Cavaleri, M.; Coenen, S.; Cohen, J.; Findlay, D.; Gyssens, I.; Heuer, O.E.; Kahlmeter, G.; Kruse, H.; Laxminarayan, R.; Liébana, E.; López-Cerero, L.; MacGowan, A.; Martins, M.; Rodríguez-Baño, J.; Rolain, J.M.; Segovia, C.; Sigauque, B.; Tacconelli, E.; Wellington, E.; Vila, J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes New Infect**, v. 6, p. 22-29, 2015.

Rolón, M.; Vega, C.; Escario, J.A.; Gómez-Barrio, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006.

Schmunis, G.A.; Yadon, Z.E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.

Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Sensch, K.H.; Reichling, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother Res*, v. 24, n. S1, p. S20-S28, 2010.

Sforcin, J.M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

Sforcin, J.M.; Bankova, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **J Ethnopharmacol**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

Silveira, F.A.; Melo, G.A.R.; Almeida, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Composição e Arte, 2002.

Sim, H.J.; Kim, J.H.; Lee, K.R.; Hong, J. Simultaneous determination of structurally diverse compounds in different Fangchi species by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5235-5250, 2013.

Simone-Finstrom, M.; Borba, R.S.; Wilson, M.; Spivak, M. Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. **Insects**, v. 8, n. 2, pii:E46, 2017.

Sun, C.; Wu, Z.; Wang, Z.; Zhang, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of beijing propolis extracts. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, 9 p., 2015.

Tian, Y.; Zhang, C.; Guo, M. Comparative study on alkaloids and their anti-proliferative activities from three *Zanthoxylum* species. **BMC Complement Altern Med**, v. 17, n. 1, p. 460, 2017.

Van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods Mol Biol**, v. 731, p. 237-245, 2011.

Van de Schans, M.G.M.; Blokland, M.H.; Zoontjes, P.W.; Mulder, P.P.J.; Nielen, M.W.F. Multiple heart-cutting two dimensional liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. **J Chromatogr A**, v. 1503, p. 38-48, 2017.

Velikova, M.; Bankova, V.; Marcucci, M.C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Z Naturforsch C*, v. 55, n. 9-10, p. 785-789, 2000.

Vernet, G.; Mary, C.; Altmann, D.M.; Doumbo, O.; Morpeth, S.; Bhutta, Z.A.; Klugman, K.P. Surveillance for Antimicrobial Drug Resistance in Under-Resourced Countries. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 434-441, 2014.

Vynograd, N.; Vynograd, I.; Sosnowski, Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2000.

Xu, H.X.; Lee, S.F. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1, p. 39 – 43, 2001.

Zabaiou, N.; Fouache, A.; Trousson, A.; Baron, S.; Zellagui, A.; Lahouel, M.; Lobaccaro, J.A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids*, v. 207, Part B, p. 214-222, 2017.

Zhang, C.P.; Zheng, H.Q.; Hu, F.L. Extraction, partial characterization, and storage stability of β -glucosidase from propolis. **J Food Sci**, v. 76, n. 1, p. C75-79, 2011.

Zhu, L.; Ruan, J.Q.; Li, N.; Fu, P.P.; Ye, Y.; Lin, G. A novel ultra-performance liquid chromatography hyphenated with quadrupole time of flight mass spectrometry method for rapid estimation of total toxic retronecine-type of pyrrolizidine alkaloids in herbs without requiring corresponding standards. **Food Chem**, v. 194, p. 1320-1328, 2016.

Yang, S.; Tian, M.; Yuan, L.; Deng, H.; Wang, L.; Li, A.; Hou, Z.; Li, Y.; Zhang, Y. Analysis of *E. rutaecarpa* alkaloids constituents in vitro and in vivo by UPLC-Q-TOF-MS combined with diagnostic fragment. *J Anal Methods Chem*, v. 2016, 10 p., 2016.

White, D.G.; Acar, J.; Anthony, F.; Franklin, A.; Gupta, R.; Nicholls, T.; Tamura, Y.; Thompson, S.; Threlfall, E.J.; Vose, D.; van Vuuren, M.; Wegener, H.C.; Castarrica, M.L.; Office International Des Epizooties AD Hoc Group. Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance. **Rev Sci Tech**, v. 20, n. 3, p. 9849-9858, 2001.

WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development. France: World Health Organization, 2017 (WHO report on neglected tropical diseases, 278).

WHO. Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Weekly Epidemiological Record**, v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015.

WHO. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Geneva: World Health Organization, 2014 (WHO Antimicrobial Resistance, 257).

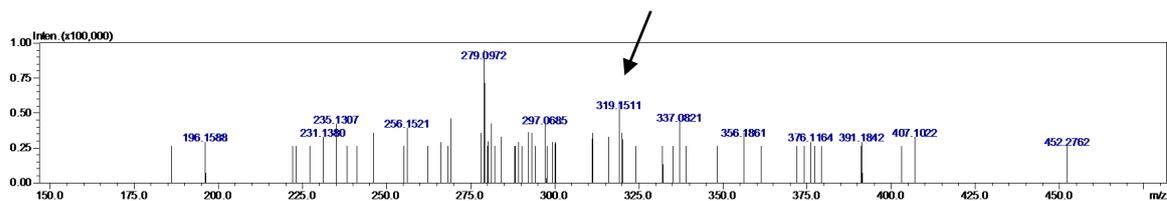
WHO. Global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization, 2001 (WHO Drug Resistance, 105).

APENDICE A

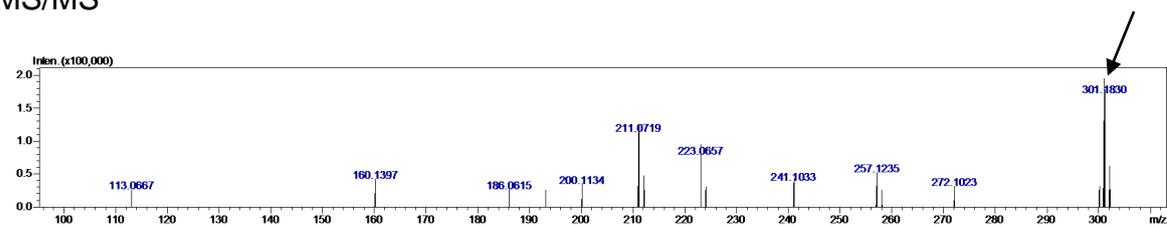
Figura A 1- Espectros da Fração 40 AL - Espectrometria de Massas - Íons modo positivo

1. Miricetina

Tempo de retenção: 7.393 min

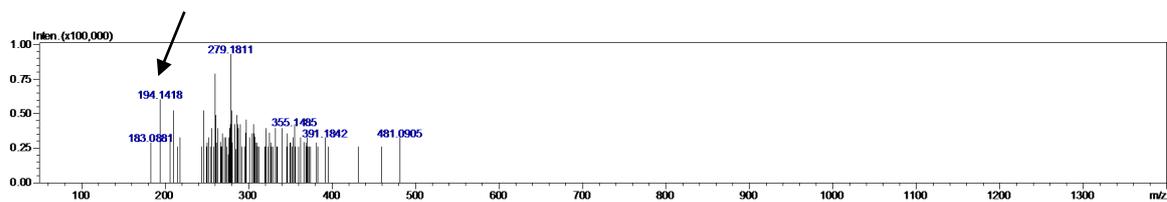


MS/MS

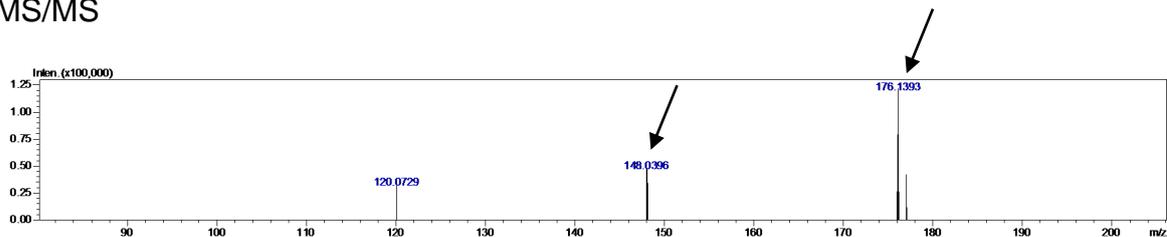


2. Des-N-metil talifolina

Tempo de retenção: 8.327min

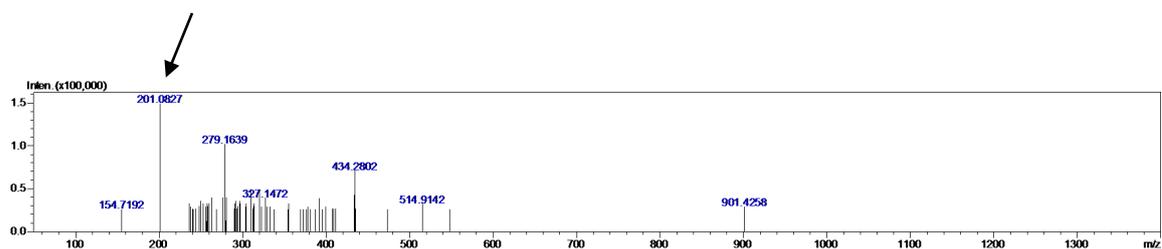


MS/MS

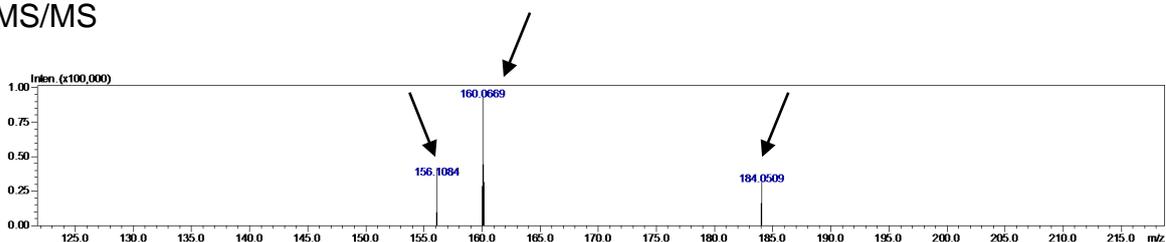


3. Ácido metoxi cinâmico

Tempo de retenção: 8.877 min

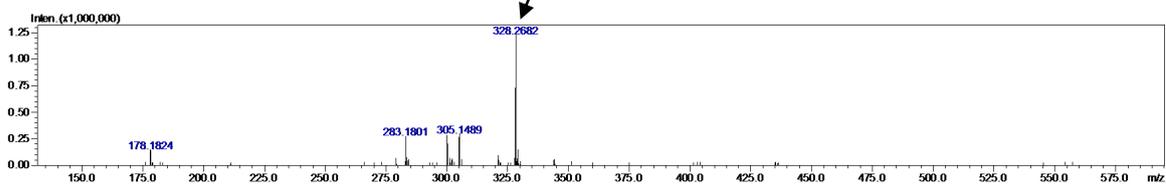


MS/MS

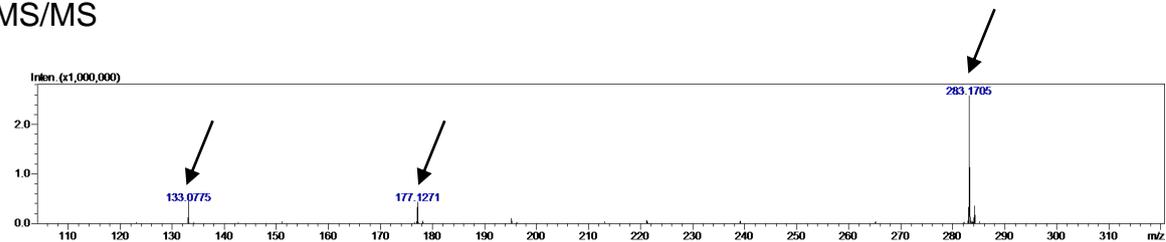


4. 10-dimetil magnoflorina

Tempo de retenção: 9.317 min

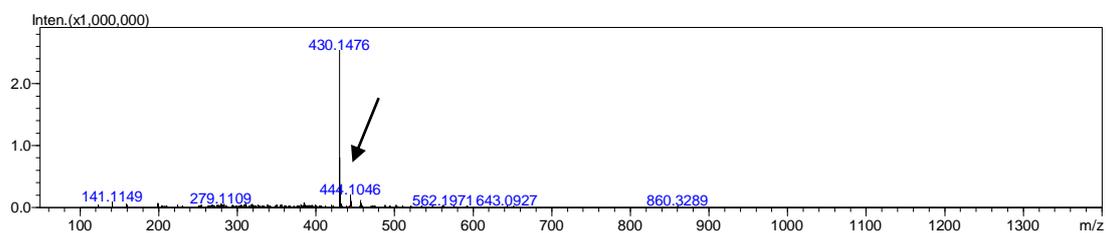


MS/MS

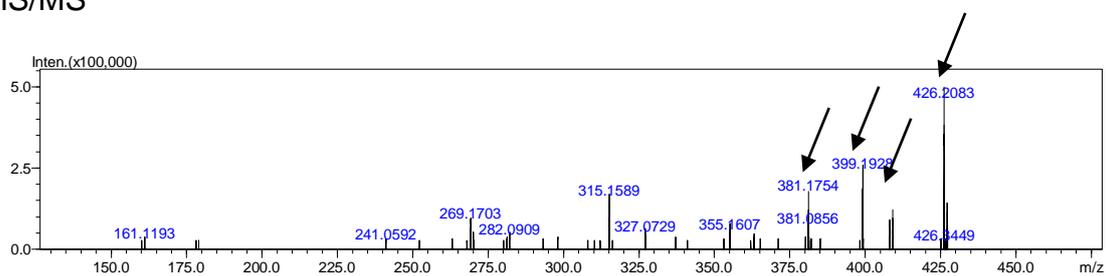


5. Diidrofloridanina

Tempo de retenção: 10.087 min

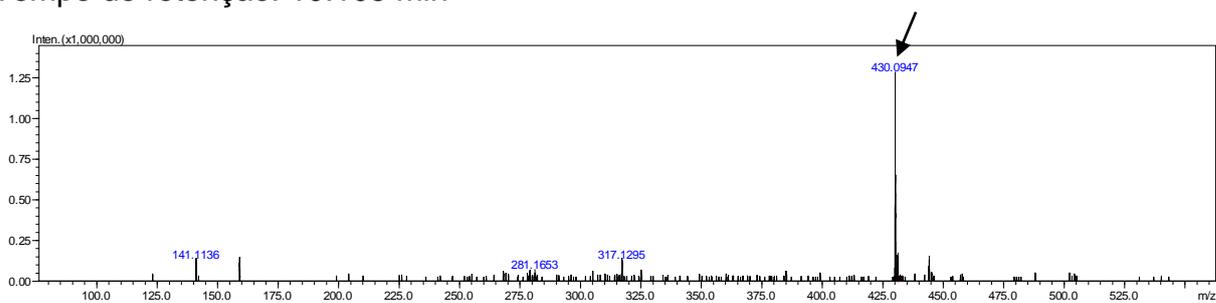


MS/MS

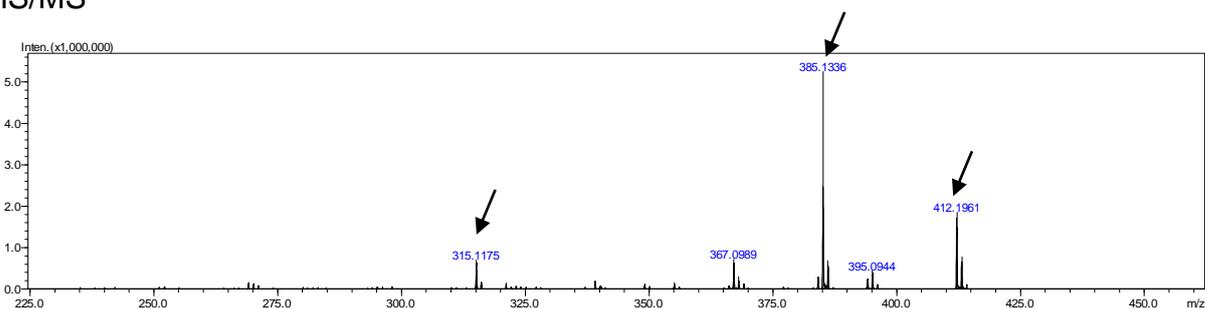


6. 7-(3-metoxi-2-metilbutiril)-9- echimidinil retronecina ou derivado de metoxi echimidina

Tempo de retenção: 10.105 min

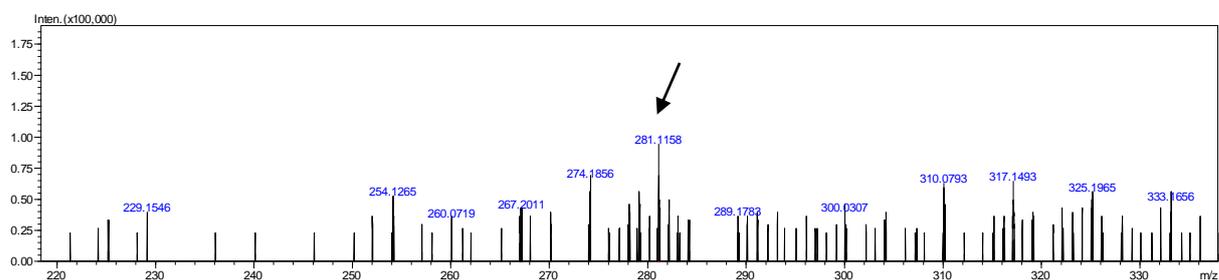


MS/MS

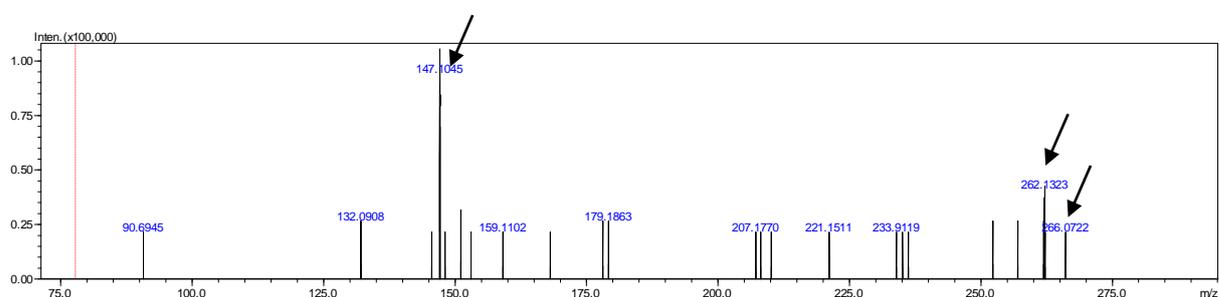


7. Taicanina

Tempo de retenção: 10.215

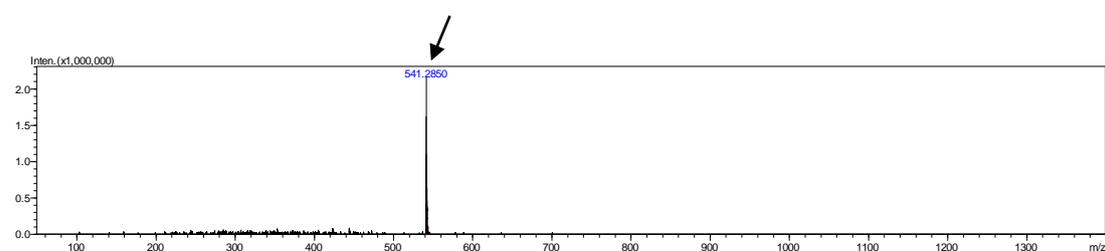


MS/MS

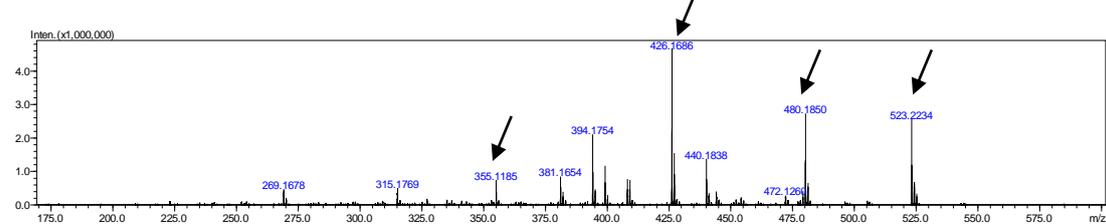


8. Metoxi-hepta-hidroxi-glucuronido de flavona

Tempo de retenção: 10.937 min

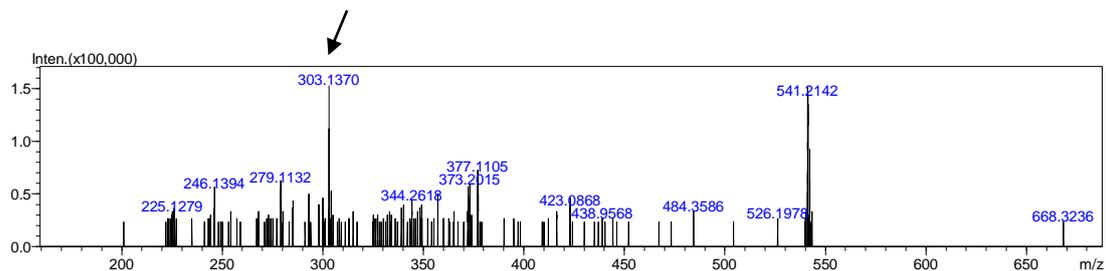


MS/MS

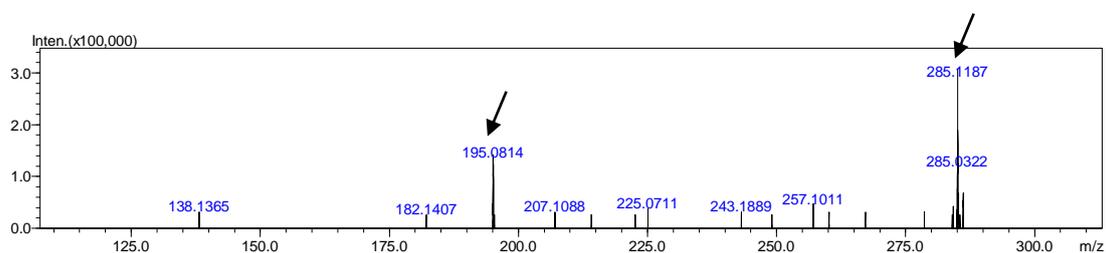


9. Quercetina

Tempo de retenção: 11.077 min

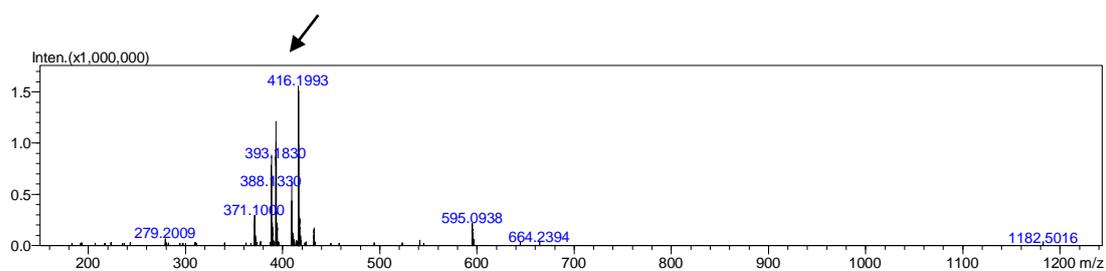


MS/MS

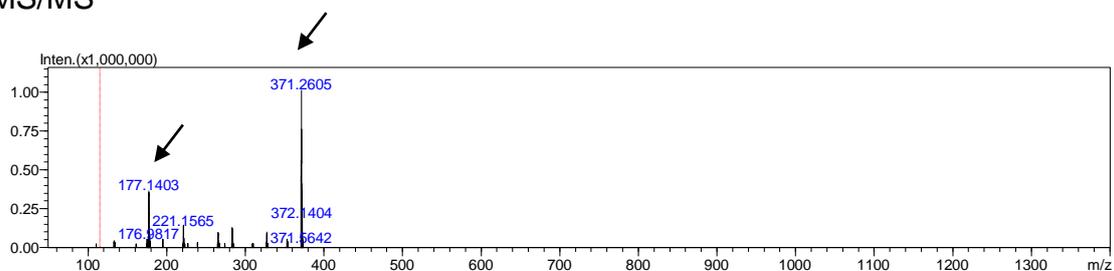


10. N-metoxycarbonil-3-metoxi-hidroxi-nordomesticina

Tempo de retenção: 11.242 min

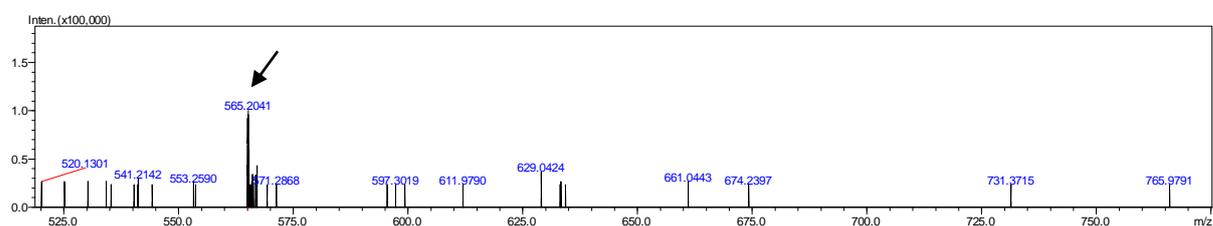


MS/MS

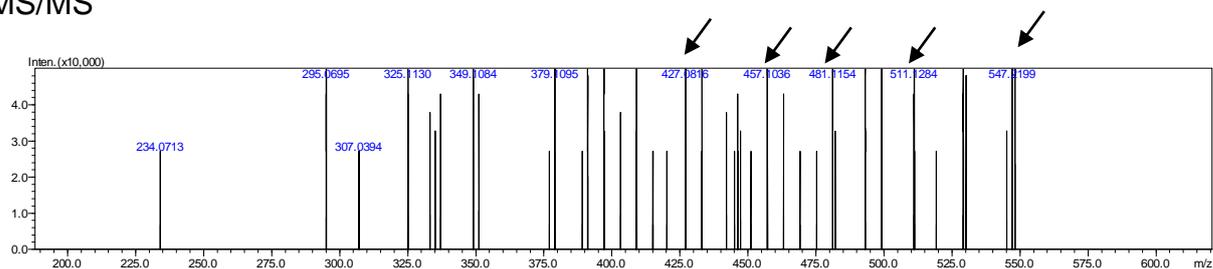


11. Apigenina

Tempo de retenção: 12.382 min

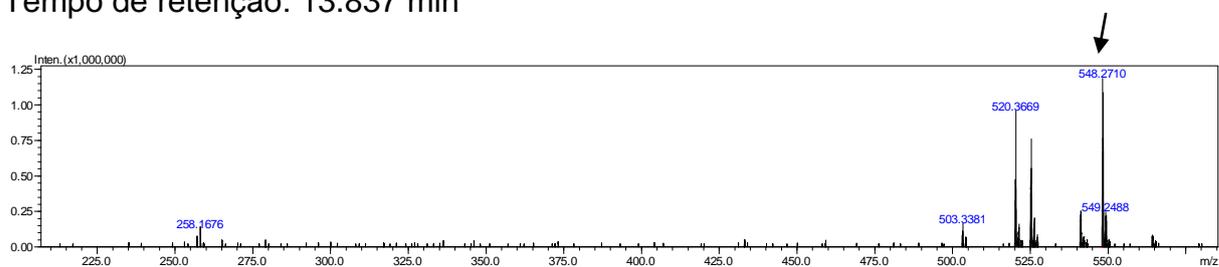


MS/MS

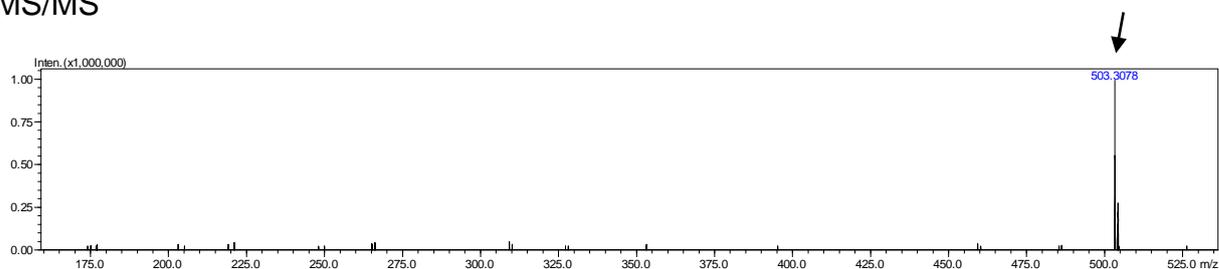


12. Formyl-10-demethyl-magnoflorine glucuronide

Tempo de retenção: 13.837 min

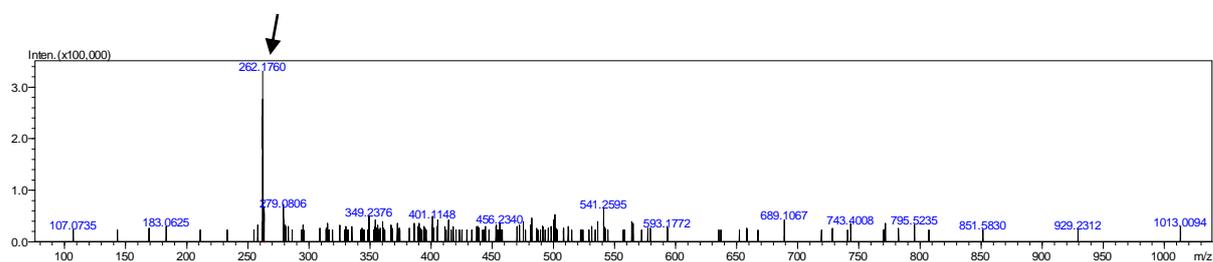


MS/MS

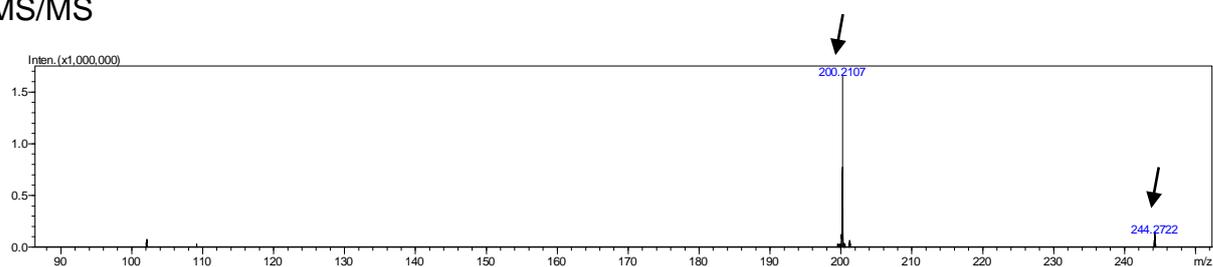


13. Di-hidroribalinina

Tempo de retenção: 18.612 min



MS/MS

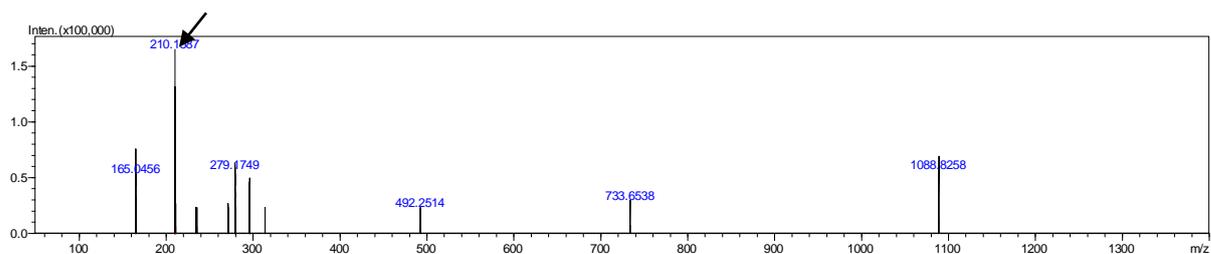


APENDICE B

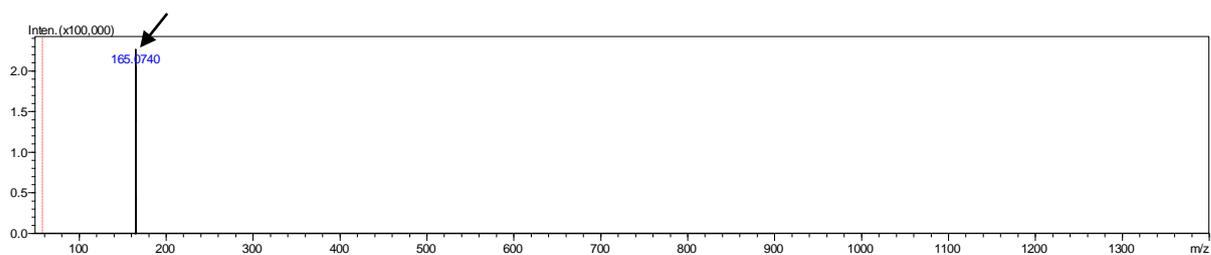
Figura A 2- Espectros da Fração 40 AQ - Espectrometria de Massas - Íons modo positivo

1. Hidroxi assimilobine

Tempo de retenção: 6.142 min

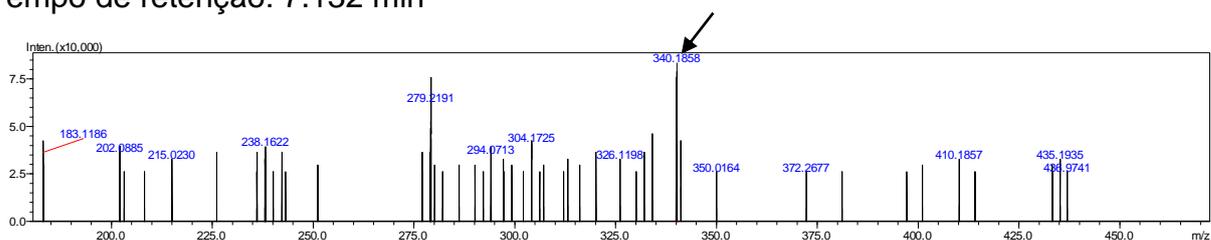


MS/MS

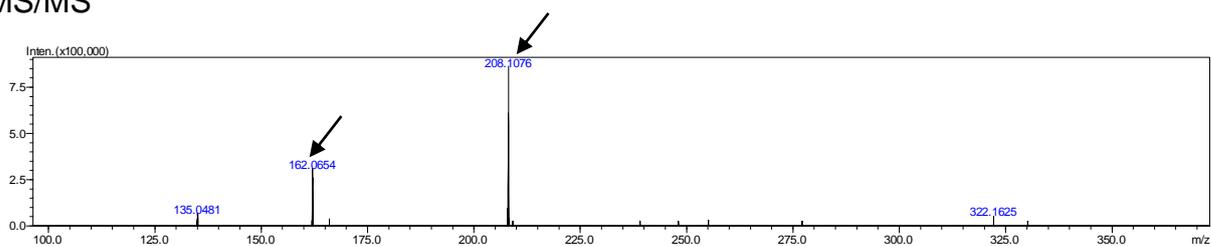


2. Talinolina arabinosídeo

Tempo de retenção: 7.132 min

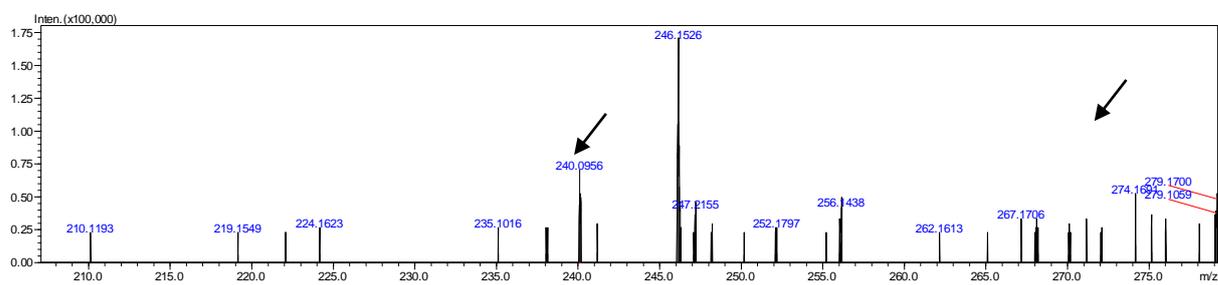


MS/MS

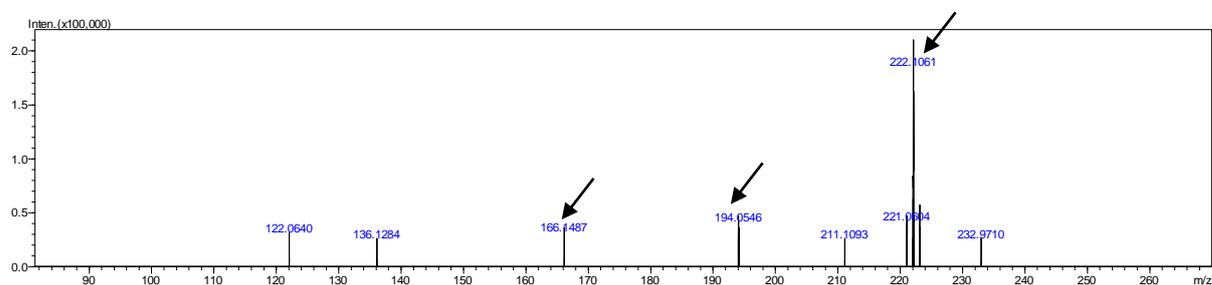


3. Hidroxi-metoxi-des-N-metil-talifolina

Tempo de retenção: 8.067 min

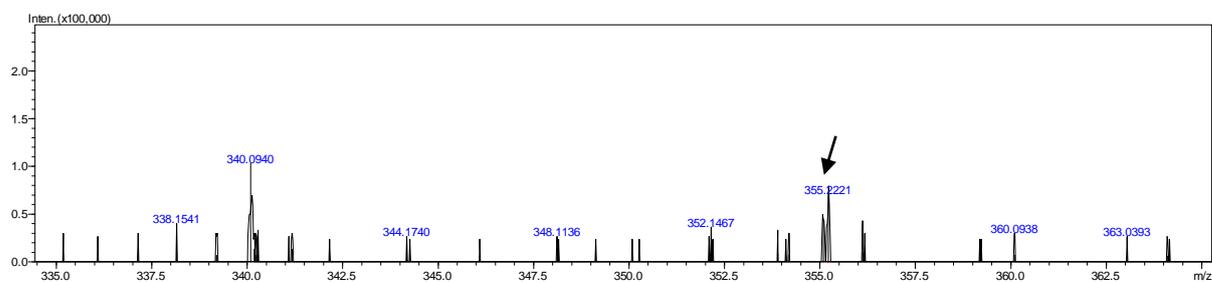


MS/MS

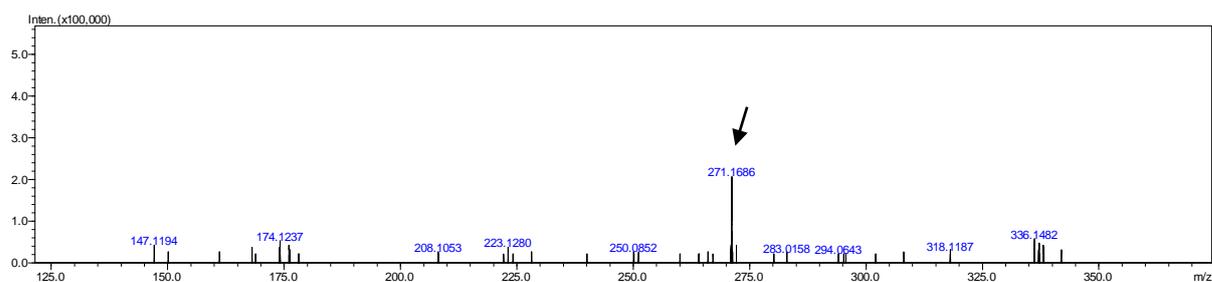


4. Hexil apigenina

Tempo de retenção: 8.507 min

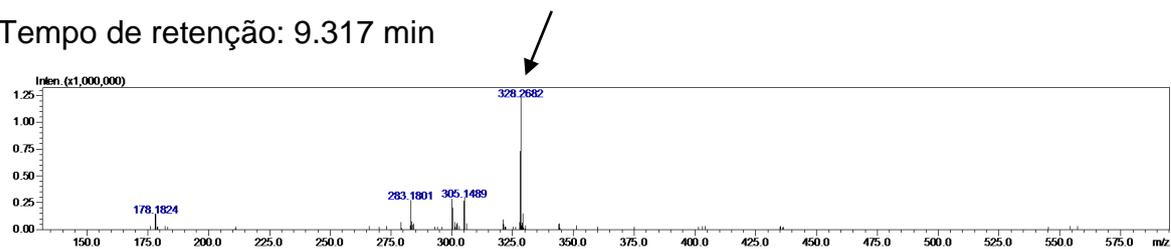


MS/MS

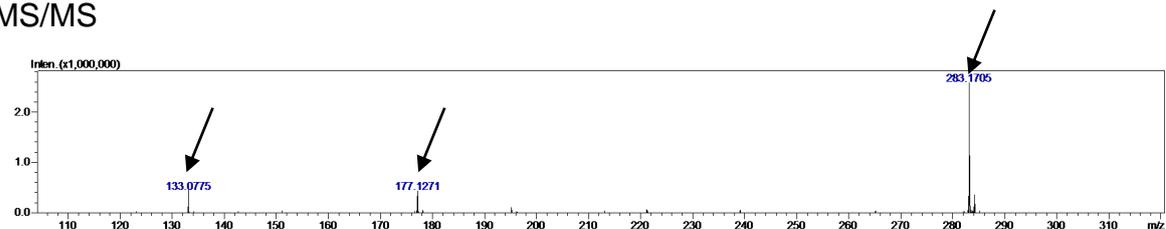


5. 10-dimetil magnoflorina

Tempo de retenção: 9.317 min

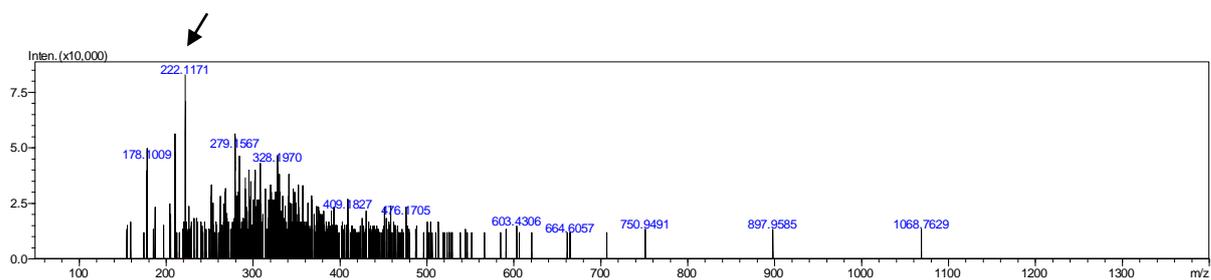


MS/MS

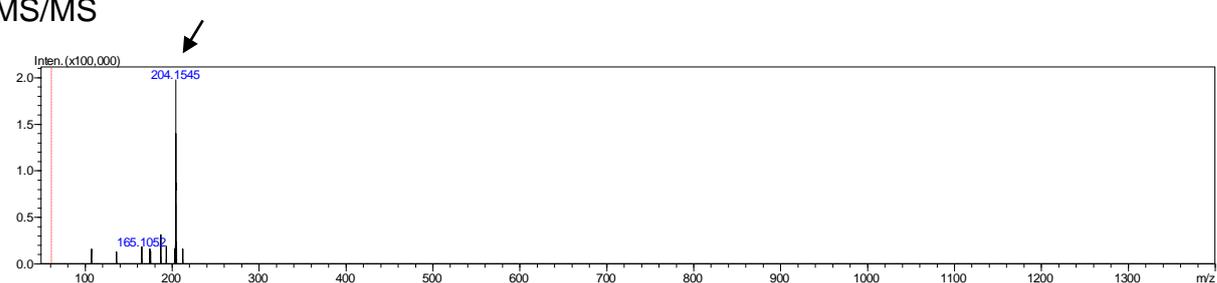


6. Ácido metoxi cinâmico

Tempo de retenção: 9.717 min

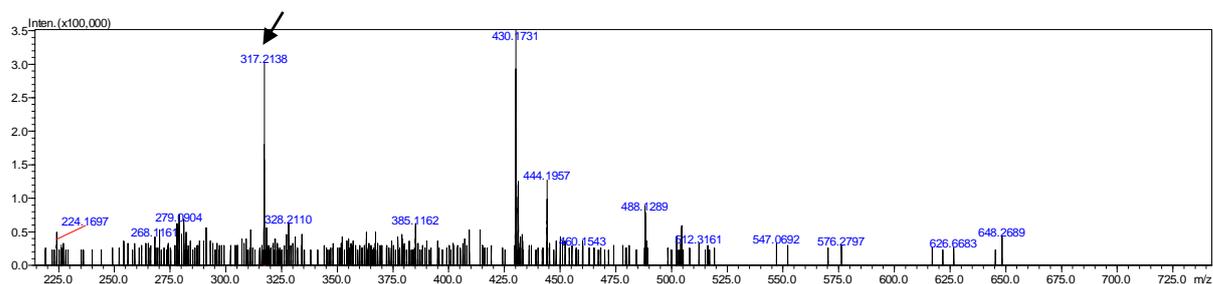


MS/MS

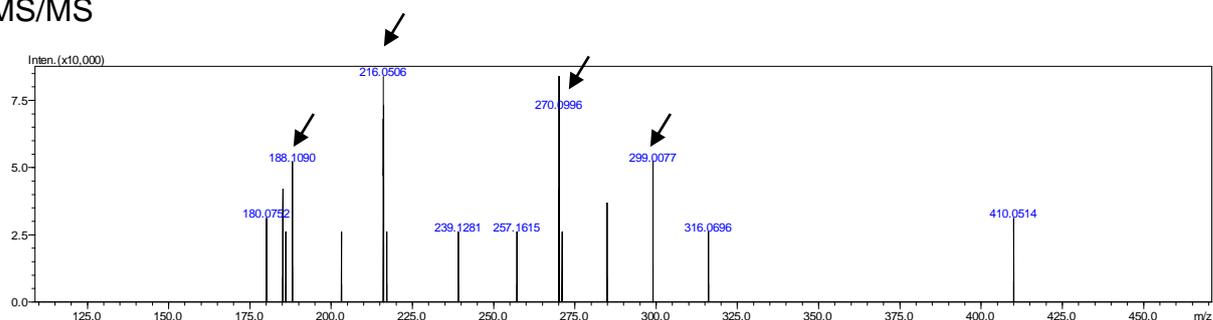


7. Rhamnetina ou Isorhamnetina

Tempo de retenção: 10.048 min

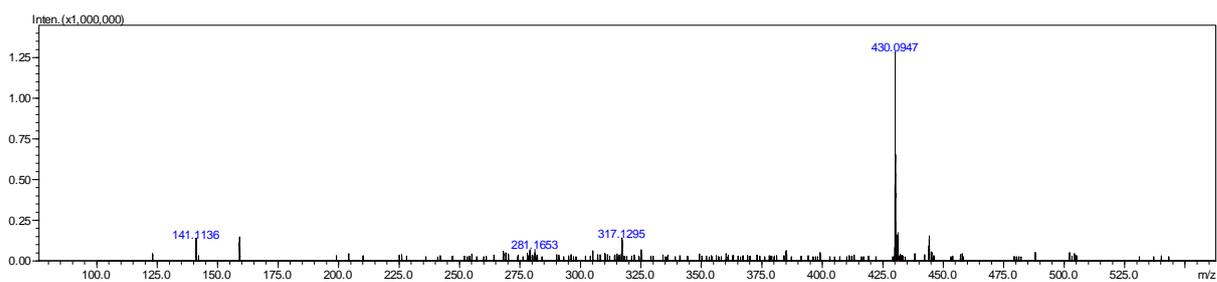


MS/MS

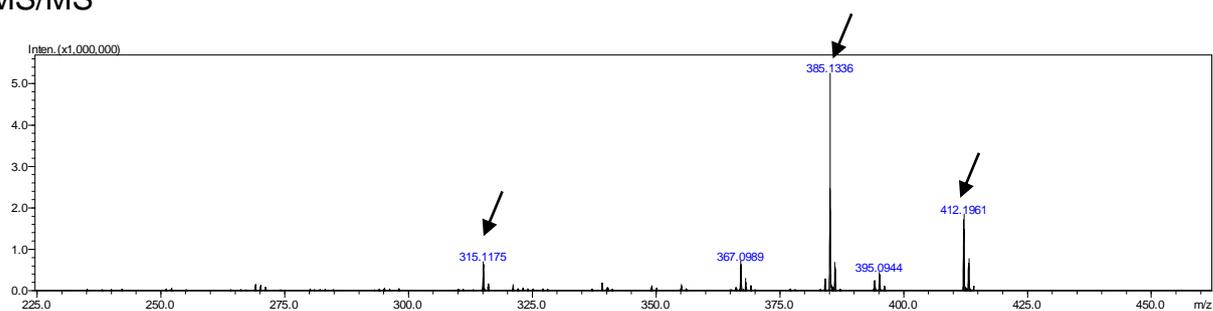


8. 7-(3-metoxi-2-metilbutiril)-9- echimidinil retronecina ou derivado de metoxi echimidina

Tempo de retenção: 10.105 min

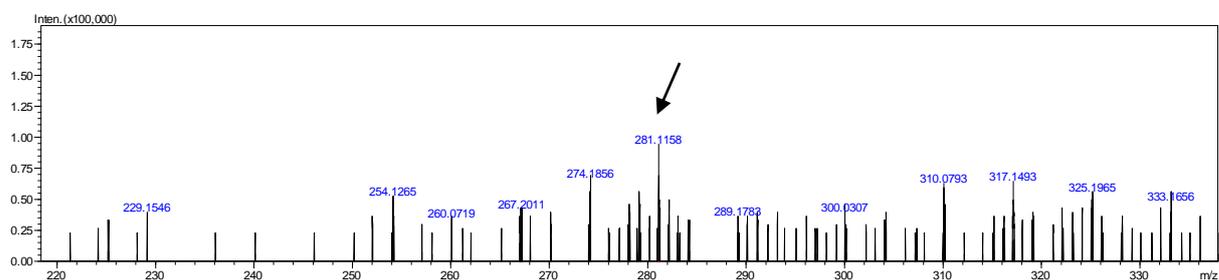


MS/MS

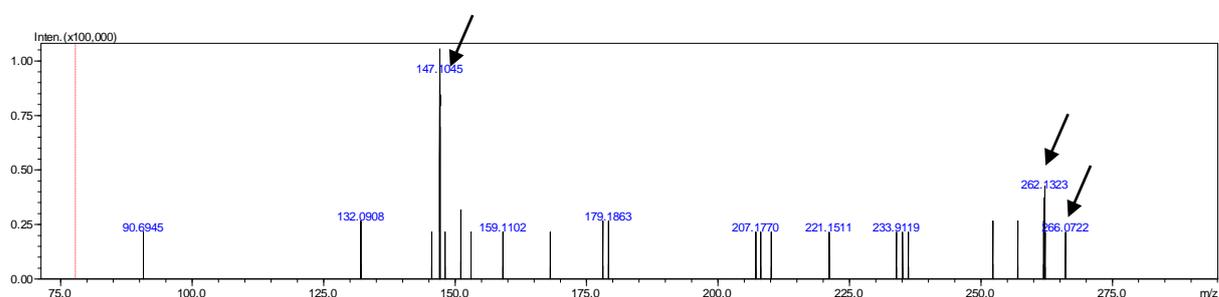


9. Cinamil arabinosideo

Tempo de retenção: 10.215

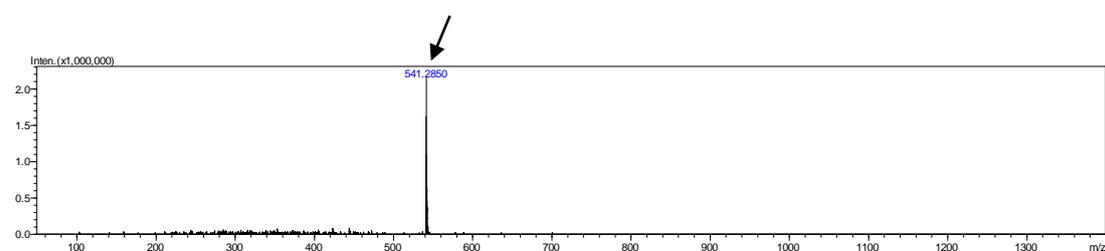


MS/MS

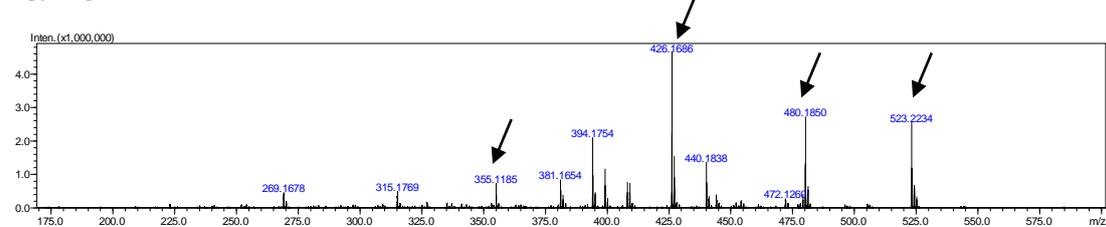


10. Metoxi-hepta-hidroxi-glucuronido de flavona

Tempo de retenção: 10.937 min

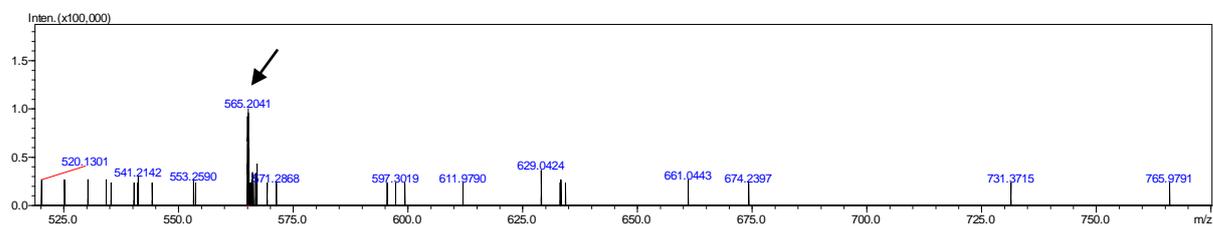


MS/MS

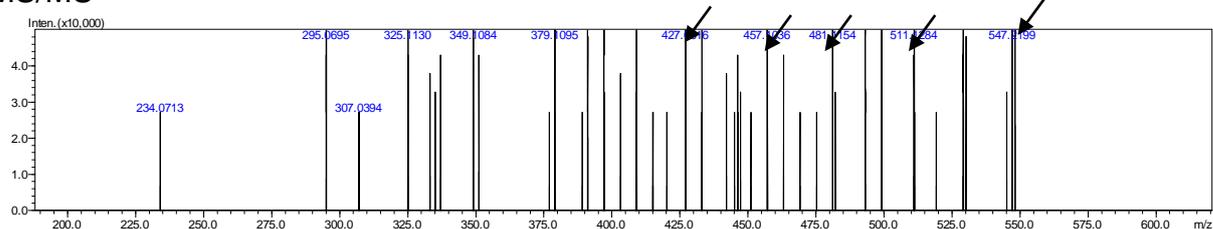


11. Apigenina

Tempo de retenção: 12.382 min

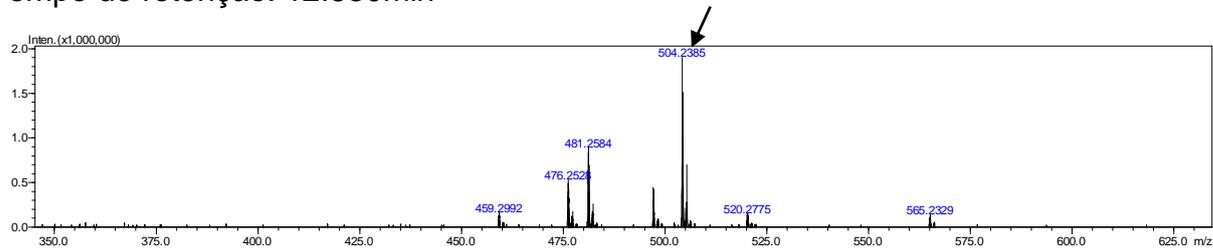


MS/MS

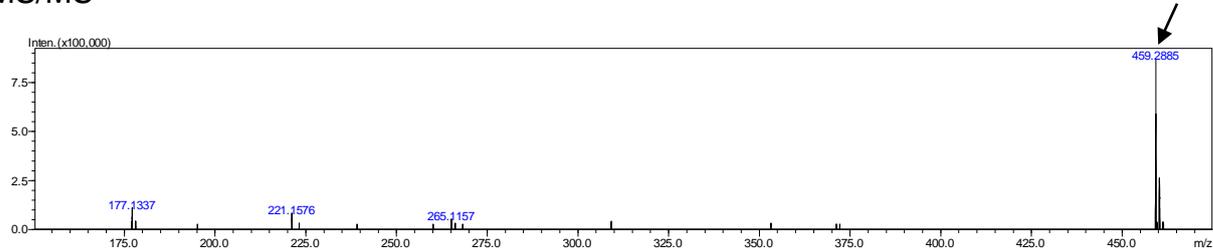


12. 10-demethyl-magnoflorine glucuronide

Tempo de retenção: 12.830min

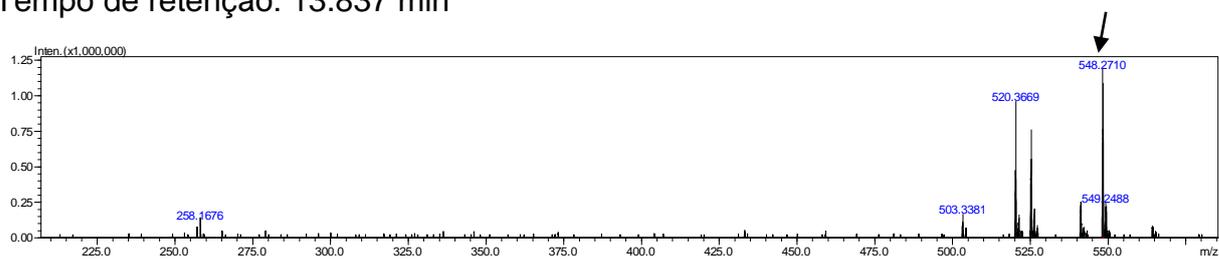


MS/MS

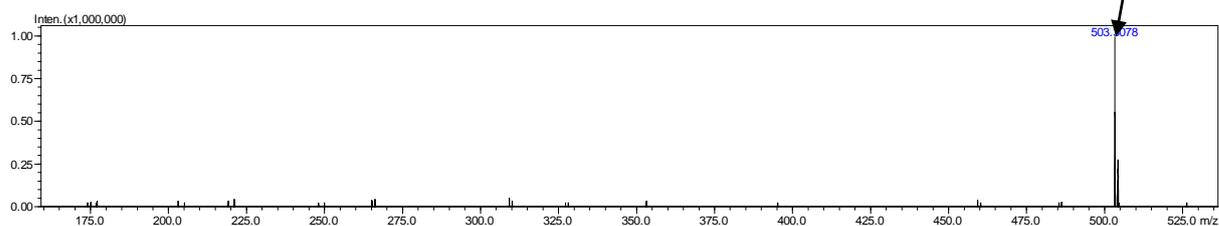


13. Formyl-10-demethyl-magnoflorine glucuronide

Tempo de retenção: 13.837 min

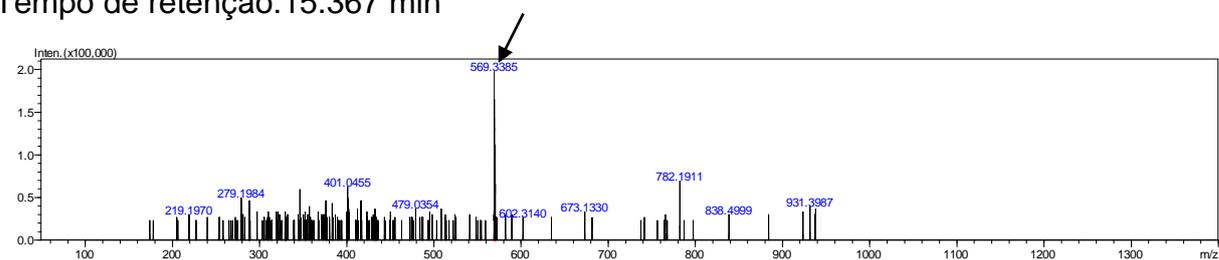


MS/MS

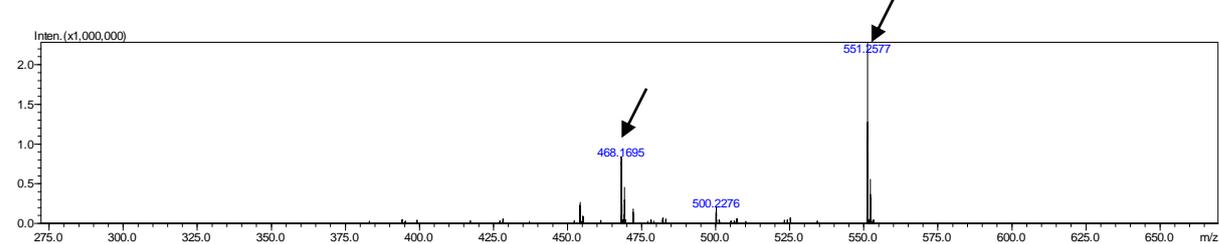


14. Norapomorpina hexosideo

Tempo de retenção: 15.367 min

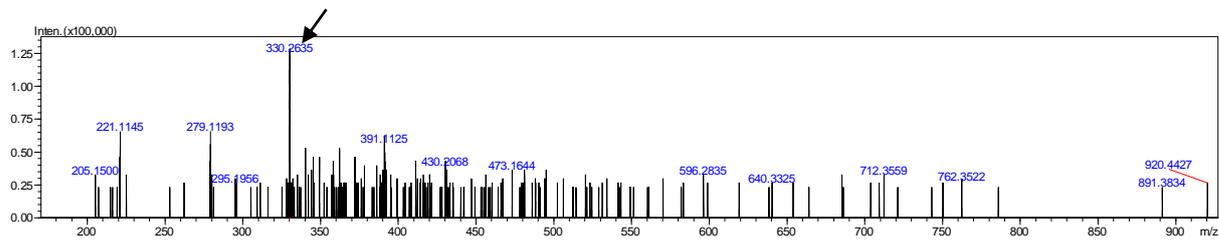


MS/MS



15. Europina

Tempo de retenção: 17.237 min



MS/MS

