



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE CHAPADINHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DA TOXICIDADE DA GEOPRÓPOLIS
DE *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) e *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942)

Pós-Graduando: Danilo Costa dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Samuel Vieira Brito

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências de Chapadinha da Universidade Federal do Maranhão.

Chapadinha-MA

2023

DANILO COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DA TOXICIDADE DA GEOPRÓPOLIS
DE *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) e *Scaptotrigona depilis* (MOURE, 1942)**

Aprovado em: 24 de fevereiro de 2023

Prof. Dr. Samuel Vieira Brito (Orientador)

Prof. Dr. Clesivan Pereira dos Santos

Prof. Dr. Pedro Augusto de Oliveira Morais

Chapadinha-MA

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Santos, Danilo Costa dos.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E DA TOXICIDADE DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona subnitida* Ducke, 1910 e *Scaptotrigona depilis* Moure, 1942 / Danilo Costa dos Santos. - 2023.

79 f.

Orientador(a): Samuel Vieira Brito.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais/ccch, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, Maranhão, 2023.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Atividade antimicrobiana.
3. Geoprópolis. I. Brito, Samuel Vieira. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus avós (*in memorian*):

Raimundo Pereira Costa, Doralice Borges de Sousa Costa e Maria da Conceição dos Santos que muito contribuíram com minha formação humana, obrigado pelos ensinamentos, as diversas histórias contadas com bastante entusiasmo e, aos momentos vividos pelos quais sou extremamente grato.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por sua infinita bondade, proteção e misericórdia. A Ele toda honra e glória.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Elcilene de Sousa Costa, por todo seu amor, carinho, exemplo e dedicação de vida. Gratidão pelo seu incentivo, suporte e sabedoria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samuel Vieira Brito, por me acolher e permitir que um desconhecido pudesse seguir em frente nessa jornada que foi a Pós-Graduação. Minha gratidão por sua amizade, pelas oportunidades concedidas, pelos valiosos ensinamentos que sempre me foram transmitidos com otimismo, paciência, sabedoria, serenidade e acima de tudo, muito profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha, da Universidade Regional do Cariri-URCA, pelos ensinamentos, incentivo, disponibilidade e por ser peça fundamental antes, durante e depois da realização deste trabalho. Gratidão e muita “saúde e paz”

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, da Universidade Regional do Cariri -URCA, por oportunizar a realização deste trabalho, pelo acolhimento em seu laboratório, pela parceria, colaboração, disponibilidade, otimismo e bom humor. Gratidão.

Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular-LMBM, da Universidade Regional do Cariri-URCA, em especial ao Raimundo Luiz Silva Pereira, Isaac Moura Araújo, Sheila Alves Gonçalves e Ana Carolina Justino de Araújo pelo auxílio, incentivo, disponibilidade e companheirismo. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioprospecção Molecular e Métodos Alternativos-LABSEMA, da Universidade Regional do Cariri-URCA, de modo especial a Nair Silva Macêdo e Zildene de Souza Silveira pela disponibilidade, apoio e compreensão durante este trabalho. Muito obrigado por tudo!

Aos Profs. Drs. Marcos da Silveira Regueira Neto, Valdir de Queiroz Balbino, Bruno Oliveira de Veras, do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal do Pernambuco-UFPE, ao Prof. Dr. Ailton Torres de Carvalho, do Departamento de Biociências da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, pelo material concedido, a identificação das abelhas utilizadas neste trabalho e pela

parceria científica estabelecida entre as Instituições (UFMA, URCA, UFPE, UFERSA). O avanço da Ciência é feito de colaboração.

Ao Prof. Dr. Jomar Livramento Barros Furtado, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA CCCh, por conceder a oportunidade de desenvolver meu trabalho de Estágio e Docência na sua disciplina de Química Geral e Inorgânica. Minha gratidão por suas dicas, incentivo e profissionalismo.

A Universidade Federal do Maranhão - UFMA, de forma especial ao Centro de Ciências de Chapadinha- CCCh, que por meio da visão, inclusão e inovação das pessoas que a fazem, trouxeram este programa e ofereceram oportunidade a diversos alunos das mais variadas áreas de fazerem uma Pós-Graduação de excelência e qualidade.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais-PPGCAM, por todos os ensinamentos compartilhados, aos momentos de descontração, aprendizado e direcionamento.

Aos meus ilustres colegas de mestrado, Gilney Soares Nascimento, Islana Silva Ponte, João Victor Mendes Cardoso, João Victor Castro Aguiar, Joellyson Lucas da Conceição dos Santos, Laryssa Reis Silva, Lucas de Oliveira Vieira e Thiara Lopes Rocha, que dividiram comigo os momentos de estudo, partilha, angústias, alegrias e experiências ao longo dos últimos anos.

Aos Profs. Drs. Clesivan Pereira dos Santos e Pedro Augusto de Oliveira Morais por aceitarem participar como membros da banca de qualificação e defesa. Obrigado pelas valiosas observações e as valorosas sugestões que muito irão contribuir com a melhoria deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA pela bolsa de estudos concedida e por me proporcionar a possibilidade de estar dedicado integralmente às atividades discentes.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram de maneira significativa para a concretização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

“Até aqui o Senhor nos ajudou”

1 Samuel 7:12

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	1
LISTA DE SÍMBOLOS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELA.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
CAPÍTULO I.....	7
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
1.1. Bactérias e Resistência Microbiana.....	7
1.1.2 Produtos Naturais e Atividade antibacteriana.....	9
1.1.3 Abelhas Sem Ferrão.....	10
1.1.4 <i>Melipona subnitida</i> (Ducke, 1910).....	11
1.1.5 <i>Scaptotrigona depilis</i> (Moure, 1942).....	12
1.1.6 Geoprópolis: Composição Química e Atividades Biológicas.....	13
1.1.7 Toxicidade.....	27
1.2 OBJETIVOS.....	29
1.2.1 Geral.....	29
1.2.2 Específicos.....	29
1.3 REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO II.....	41
1. Introdução.....	44
2. Materiais e Métodos.....	46
2.1 Obtenção dos extratos naturais.....	46
2.2 Preparo da Solução Inicial e das Soluções Teste.....	46
2.3 Microrganismos e meio de cultura.....	46
2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	47
2.5 Avaliação da Atividade Modificadora da Atividade Antibiótica pelos Extratos da Geoprópolis de <i>Melipona subnitida</i> e <i>Scaptotrigona depilis</i>	47

2.6 Teste de Toxicidade.....	48
2.6.1 <i>Drosophila Melanogaster</i>.....	48
2.6.2 Ensaio de Sobrevivência.....	48
2.7 Análise Estatística.....	48
3. Resultados.....	49
3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	49
3.2 Avaliação Modificadora da Atividade Antibiótica pelos Extratos da Geoprópolis de <i>Melipona subnitida</i> e <i>Scaptotrigona depilis</i>.....	49
3.3 Testes Toxicológicos.....	52
4. Discussão.....	54
5. Conclusão.....	57
Referências.....	58
CAPÍTULO III.....	68
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68

LISTA DE SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection

ANOVA - Análise de Variância

BHI - Brain Heart Infusion

BOD - Box Organism Development

CIM ou MIC - Concentração Inibitória Mínima

GC-MS Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas

HPLC-MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectroscopia de Massas

RP HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

HPLC-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector por Arranjo de Diodos

HPLC-DAD-ESI-MS/MS-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Detector de Arranjo de Diodos-Hifenizado com Espectrometria de Massas em Tandem

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas

UPLC-ESI-QTOF-MS - Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplado a Espectrometria de Massas de tempo de voo Quadrupolo de ionização por eletrospray.

DMSO - Dimetilsulfóxido

EAEGMs - Extrato de Acetato de Etila da Geoprópolis de *Melipona subnitida*

EAEGSd - Extrato de Acetato de Etila da Geoprópolis de *Scaptotrigona depilis*

HIA - Heart Infusion Agar

HPLC-DAD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a arranjo de Diodos

S. A - *Staphylococcus aureus*

E. C - *Escherichia coli*

P. A - *Pseudomonas aeruginosa*

LISTA DE SÍMBOLOS

< - menor que

> - maior que

≥ - maior ou igual que

® - Marca registrada

°C - graus Celsius

µg – microgramas

µg/mL - microgramas de soluto por mililitro da solução

mg - miligrama

mL - mililitro

mg/mL - miligrama por mililitro da solução

% - porcentagem

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1: Abelha *Melipona subnitida* (Ducke, 1910).....12

Figura 2: Abelha *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) fazendo a proteção na entrada de sua colônia.....13

Figura 3: Geoprópolis da espécie de abelha *Melipona subnitida* (A) e da espécie *Scaptotrigona bipunctata* (B).....14

Figura 4: Adultos (fêmea à esquerda e o macho à direita, com o seu pente sexual indicado pelas setas) de *Drosophila melanogaster*.....28

CAPÍTULO II - Atividade Antibacteriana e Toxicidade dos Extratos da Geoprópolis de *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) (Hymenoptera: Apidae) e *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera: Apidae).

Figura 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato de Acetato de Etila de Geoprópolis de *Melipona subnitida* (EAEGMs) e Extrato de Acetato de Etila de Geoprópolis de *Scaptotrigona depilis* (EEAGSd) contra *Staphylococcus aureus*.....50

Figura 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato de Acetato de Etila de Geoprópolis de *Melipona subnitida* (EEAGMs) e Extrato de Acetato de Etila de Geoprópolis de *Scaptotrigona depilis* (EEAGSd) contra *Escherichia coli*.....51

Figura 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Extrato de Acetato de Etila de Geoprópolis de *Melipona subnitida* (EEAGMs) e Extrato de Acetato de Etila de Geoprópolis de *Scaptotrigona depilis* (EAEGSd) contra *Pseudomonas aeruginosa*.....52

Figura 4: Ensaios de sobrevivência usando o modelo de *Drosophila melanogaster* utilizando o Extrato de Acetato de Etila da Geoprópolis de *Melipona subnitida* (EAEGMs).....53

Figura 5: Ensaios de sobrevivência usando o modelo de *Drosophila melanogaster* utilizando o Extrato de Acetato de Etila da Geoprópolis de *Scaptotrigona depilis* (EAEGSd).....53

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1: Pesquisas realizadas sobre a composição química e a atividade biológica da geoprópolis de abelhas do gênero *Melipona* e *Scaptotrigona*.....18

CAPÍTULO II - Atividade Antibacteriana e Toxicidade dos Extratos da Geoprópolis de *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) (Hymenoptera: Apidae) e *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera: Apidae).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos testados sobre cepas padrões e multirresistentes.....49

RESUMO

A utilização descontrolada de antibióticos tem levado ao aumento da resistência de bactérias patogênicas, que ocasionam diversos problemas de saúde. Em virtude disso, surge a necessidade de se buscar alternativas efetivas, seguras e sustentáveis para o controle e tratamento desses microrganismos multirresistentes. Neste sentido, a utilização de produtos naturais com potenciais terapêuticos vem sendo cada vez mais estudada. A geoprópolis é um produto natural derivado de abelhas sem ferrão e tem se apresentado como uma possibilidade viável para a síntese e desenvolvimento de novos fármacos por apresentar uma diversidade de compostos químicos com atividades biológicas. O presente estudo buscou avaliar a atividade antibacteriana, a modulação antibiótica e a toxicidade dos extratos de geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão, a *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) e *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) contra bactérias padrão e multirresistente de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As amostras dos extratos foram coletadas em um meliponário localizado em Camaragibe, Pernambuco, Brasil. Os extratos foram obtidos pela técnica de maceração utilizando o solvente acetato de etila. Os ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados pelo método de microdiluição em caldo para ambas as linhagens bacterianas. A modulação da ação antibiótica foi realizada com os antimicrobianos ampicilina, gentamicina e norfloxacina. A toxicidade foi realizada sobre o modelo *in vivo* *Drosophila melanogaster*. Os testes antibacterianos demonstraram que ambos extratos tiveram atividade biológica frente às cepas testadas. O extrato de *M. subnitida* apresentou melhores efeitos inibitórios do crescimento microbiano em comparação ao extrato de *S. depilis*, com concentrações de 64, 64 e 256 µg/mL contra as cepas padrão de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e de 128, 85 e 512 µg/mL frente às multirresistentes. Algumas associações entre os extratos e os antibióticos testados resultaram em efeitos sinérgicos e aumentaram o espectro de ação antibacteriana, diminuindo a CIM das drogas. Efeitos tóxicos não foram observados durante os ensaios com modelo *in vivo*. Esses resultados ressaltam a importância de estudos que utilizam produtos naturais em terapias alternativas, bem como apontam os extratos como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos tratamentos contra infecções bacterianas.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão, Atividade antimicrobiana, Geoprópolis.

ABSTRACT

The uncontrolled use of antibiotics has led to increased resistance of pathogenic bacteria, which cause various health problems. As a result, there is a need to seek effective, safe and sustainable alternatives for the control and treatment of these multiresistant microorganisms. In this sense, the use of natural products with therapeutic potential has been increasingly studied. Geopropolis is a natural product derived from stingless bees and has been presented as a viable possibility for the synthesis and development of new drugs because it presents a diversity of chemical compounds with biological activities. The present study aimed to evaluate the antibacterial activity, antibiotic modulation and toxicity of geopropolis extracts from two species of stingless bees, *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) and *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) against standard and multiresistant bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Extract samples were collected in a meliponary located in Camaragibe, Pernambuco, Brazil. The extracts were obtained by maceration technique using ethyl acetate solvent. Assays to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were performed using the broth microdilution method for both bacterial strains. The modulation of the antibiotic action was carried out with the antimicrobials ampicillin, gentamicin and norfloxacin. Toxicity was performed on the *in vivo* model *Drosophila melanogaster*. Antibacterial tests showed that both extracts had biological activity against the tested strains. *M. subnitida* extract showed better inhibitory effects on microbial growth compared to *S. depilis* extract, with concentrations of 64, 64 and 256 µg/mL against standard strains of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* and of 128, 85 and 512 µg/mL against the multidrug resistant ones. Some associations between the extracts and the tested antibiotics resulted in synergistic effects and increased the spectrum of antibacterial action, decreasing the MIC of the drugs. Toxic effects were not observed during *in vivo* model tests. These results underscore the importance of studies using natural products in alternative therapies, as well as pointing to extracts as potential candidates for the development of new treatments against bacterial infections.

Keywords: Stingless bees, Antimicrobial activity, Geopropolis