

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA,  
ANTIMUTAGÊNICA E ANTIMICROBIANA DO GEOPRÓPOLIS DA ABELHA SEM  
FERRÃO *Melipona orbignyi***

**HELDER FREITAS DOS SANTOS**

**DOURADOS – MS**

**2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

**HELDER FREITAS DOS SANTOS**

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA,  
ANTIMUTAGÊNICA E ANTIMICROBIANA DO GEOPRÓPOLIS DA ABELHA SEM  
FERRÃO *Melipona orbignyi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Biologia Geral – Bioprospecção, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral, Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos  
Grupo de pesquisa: GEBBAM – Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo.

DOURADOS – MS  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237p Santos, Helder Freitas Dos  
Perfil químico e atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana do geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona orbignyi* [recurso eletrônico] / Helder Freitas Dos Santos. -- 2020.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Edson Lucas dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. HPLC-DAD-MS. 2. Compostos fenólicos. 3. Peroxidação lipídica. 4. Mutação. 5. Micro-organismos resistentes. I. Santos, Edson Lucas Dos. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMUTAGÊNICA E ANTIMICROBIANA DO GEOPRÓPOLIS DA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona orbigny*".


POR

**HELDER FREITAS DOS SANTOS**

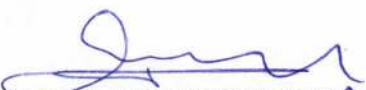
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF. DR. EDSON LUCAS DOS SANTOS  
ORIENTADOR – UFGD



PROF.ª DR.ª ANA PAULA DE ARAÚJO BOLETI  
MEMBRO TITULAR



PROF. DR. UILSON PEREIRÁ DOS SANTOS  
MEMBRO TITULAR

Aprovado em 16 de março de 2018.

## DEDICATÓRIA

*À Deus, meu protetor;*

*Aos meus pais **Paulo dos Santos** e **Cleidimar Freitas Martins**, que sempre me incentivaram e me apoiaram em meus estudos;*

*À toda minha família e amigos;*

## AGRADECIMENTOS

*Meus agradecimentos especiais ao Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos, pela oportunidade, pela doação de si mesmo, pelos ensinamentos, pelo empenho incansável na orientação, pelo exemplo de profissionalismo e por acreditar em mim. Muito obrigado;*

*À professora Kely de Picoli Souza pelo imenso conhecimento transmitido, auxílio em trâmites laboratoriais, acadêmicos e burocráticos, pelo grande exemplo e apoio;*

*Ao professor José Benedito Perrella Balestieri, por fornecer as amostras de geopropolis;*

*À professora de Portugal Leticia Miranda Estevinho pela realização dos ensaios anti-inflamatório, antimutagênico e antimicrobiano;*

*Ao professor Carlos Alexandre Carollo, pela realização das análises químicas do geoprópolis;*

*Aos membros da banca, Uilson Pereira dos Santos e Ana Paula de Araújo Boleti, pela disponibilidade em avaliar minha tese e colaborar para melhoria da mesma;*

*À Universidade Federal da Grande Dourados, local onde realizei minha graduação, agora mestrado e posteriormente o doutorado;*

*Ao técnico administrativo Felipe D'apolito, pelo auxílio e extrema eficiência em sanar quaisquer dúvidas e etapas do programa de pós graduação em Biologia Geral/Bioprospecção;*

*A todos os membros do GEBBAM (Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo) pelo companheirismo, participação durante os experimentos, momentos de descontração e ensinamentos durante o ciclo de seminários do grupo.*

*Agradeço em especial a Jaqueline Ferreira Campos, que desde a iniciação científica me auxiliou como co-orientadora, pelos conhecimentos transmitidos e exemplo de profissionalismo.*

*Agradeço a Ana Paula de Araújo Boleti, pela orientação na cultura de células, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos e momentos de risadas e descontração;*

*Ao colega de mestrado e amigo Pedro Cruz de Oliveira Júnior, pelas conversas, momentos de descontração, apoio e coleguismo em momentos difíceis;*

*À Deus, por me guiar, iluminar, proteger e dar forças para conquistar meus sonhos e objetivos;*

*Aos meus pais Paulo dos Santos e Cleidimar Freitas Martins, por serem meu alicerce, por sempre primarem a minha educação, por todo carinho, amor, apoio e pela paciência em meus momentos de ausência;*

*Ao CNPq, CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro;*

*Agradeço a todos aqueles que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste estudo;*

## RESUMO

O geoprópolis é uma resina acrescida de barro, produzida apenas pelas abelhas sem ferrão. Apesar de ser conhecida popularmente por suas propriedades medicinais, são poucos os estudos científicos que comprovam suas atividades biológicas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química e as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana do geoprópolis de *Melipona orbignyi*. Para isto, o extrato hidroetanólico de geoprópolis (EHGP) foi preparado e sua composição química determinada por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao detector de matriz de diodos e espectrometria de massa (HPLC-DAD-MS). A atividade antioxidante foi determinada pela captura direta de radicais livres DPPH/ABTS, inibição da hemólise oxidativa e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pela inibição da enzima hialuronidase e a ação antimutagênica foi investigada pelo método de indução de recombinação mitótica e mutação em colônias de *Saccharomyces cerevisiae*. As atividades antimicrobianas foram determinadas contra bactérias e leveduras de referência e de origem hospitalar. A composição química do EHGP demonstrou a presença dos flavonoides aromadendrina, naringenina, metil-aromadendrina e metil naringenina, bem como derivados de ácidos fenólicos glicosilados (ácidos gálico, cumárico e cinâmico) e terpenoides (sesqui, di e triterpenos). O EHGP apresentou alta atividade antioxidante, pela captura direta de radicais livres, exibindo IC<sub>50</sub> de  $18,3 \pm 2,8$  e  $10,3 \pm 0,5$  µg/mL para os radicais livres DPPH e ABTS respectivamente, e pela redução de  $93,2 \pm 0,83$  % da hemólise oxidativa e  $89,7 \pm 2,13$  % dos níveis de malondialdeído, ambos na concentração de 50 µg/mL, resultados superiores ao controle positivo ácido ascórbico. Adicionalmente, o EHGP inibiu a atividade da enzima hialuronidase de forma concentração-dependente. O EHGP reduziu os efeitos mutagênicos em *S. cerevisiae*, reduzindo em  $27,5 \pm 2,5$  % a conversão de genes e  $86,3 \pm 0,4$  % do número de colônias mutantes. Em relação à atividade antimicrobiana, o EHGP apresentou atividade bactericida e fungicida em todos os micro-organismos avaliados, inclusive contra cepas de origem hospitalar resistentes à ação de fármacos antimicrobianos. Em conclusão, este estudo demonstra pela primeira vez a composição química do extrato do geoprópolis de *M. orbignyi*, bem como suas atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana.

**Palavras-chave:** HPLC-DAD-MS/MS, compostos fenólicos, peroxidação lipídica, hialuronidase, mutação, micro-organismos resistentes



## ABSTRACT

Geopropolis is a resin mixed with mud, produced only by stingless bees. Despite being popularly known for its medicinal properties, few scientific studies have proven its biological activities. In this context, the objective of this study was to determine the chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of the *Melipona orbignyi* geopropolis. For this, the hydroalcoholic extract of geopropolis (HEGP) was prepared and its chemical composition determined by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). The antioxidant activity was determined by the direct capture of free radicals and inhibition of lipid peroxidation in human erythrocytes. The anti-inflammatory activity was evaluated by the inhibition of the hyaluronidase enzyme and the antimutagenic action was investigated by the method of induction of mitotic recombination and mutation in colonies of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. The antimicrobial activities were determined against bacteria and yeasts, isolated from reference strains and hospital origin. The chemical composition of the HEGP shows a presence of flavonoids aromadendrin, naringenin, methyl-aromadendrin and methyl naringenin, as well as derivatives of glycosylated phenolic acids (gallic, cumaric and cinnamic acids) and terpenoids (sesqui and di triterpenes). The HEGP showed high antioxidant activity, by direct capture of free radicals, exhibiting IC<sub>50</sub> of  $18.3 \pm 2.8$  and  $10.3 \pm 0.5$   $\mu\text{g} / \text{mL}$  for the free radicals DPPH and ABTS respectively, and for the reduction of  $93.2 \pm 0.83\%$  of oxidative hemolysis and  $89.7 \pm 2$  ,  $13\%$  of malondialdehyde levels, both at  $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ , superior results than the positive control, acid ascorbic. In addition, HEGP inhibited the activity of the inflammatory enzyme hyaluronidase in a concentration-dependent manner. The HEGP reduced the mutagenic effects in *S. cerevisiae*, reducing by  $27.5 \pm 2.5\%$  the conversion of genes and  $86.3 \pm 0.4\%$  of the number of mutant colonies. In relation to the antimicrobial activity, the HEGP presented bactericidal and fungicidal activity in all microorganisms evaluated including against strains of hospital origin resistant to the action of antimicrobial drugs. In conclusion, this study demonstrates for the first time the chemical composition of the extract of the geopropolis of *M. orbignyi*, as well as its antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities.

**Keywords:** HPLC-DAD-MS; phenolic compounds; lipid peroxidation; hyaluronidase; mutation; resistant microorganisms

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> (a) Estrutura química do ácido gálico (ácido fenólico), (b) estrutura química da quercetina (flavonoide).....	9
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ácido hialurônico.....	14
<b>Tabela 1.</b> Mecanismos de ação antimutagênicos evidenciados em diferentes extratos ou compostos.....	18
<b>Figura 3.</b> Geoprópolis produzida por <i>Melipona orbignyi</i> , coletada na região de Dourados, estado de Mato-Grosso-do-Sul.....	31
<b>Tabela 2.</b> Compostos bioativos, atividades biológicas e efeitos terapêuticos/mecanismos de ação relatados sobre geoprópolis de espécies de abelhas sem ferrão.....	32

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo thiazolina-6-ácido sulfônico)

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

$\cdot\text{OH}$  – Radical hidroxila

$^1\text{O}_2$  – Oxigênio singlete

AGP – Ácido graxo polinsaturado

AH – Ácido Hialurônico

*C. albicans* – *Candida albicans*

*C. neoformans* – *Cryptococcus neoformans*

CAT – Catalase

CD80 – Cluster of differentiation 80

CuZn-SOD – Super óxido dismutase cobre/zinco dependente

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

*E. coli* – *Escherichia coli*

*E. faecalis* - *Enterococcus faecalis*

EHGP – Extrato hidroetanólico de geoprópolis

EMS – Etil Metano Sulfonato

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutaciona peroxidase

GRd – Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona reduzida

GSSG – Glutaciona oxidada

HAS – Hyaluronic acid synthases

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HO<sub>2</sub>• – Radical hidroperoxila

HOCl – Ácido hipocloroso

HSV-1 – Herpes simplex vírus 1

IL-10 – Interleucina 10

IL-1B – Interleucina 1-beta

IL-4 – Interleucina 4

*M. orbigny* – *Melipona orbigny*

MDA – Malondialdeído

MMC – Mitomicina C

Mn-SOD – Super óxido dismutase manganês dependente

MNNG – N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

MRSA – *S. aureus* meticilina resistente

NO• – Óxido nítrico

NO<sub>x</sub> – Óxido de nitrogênio

ONOO – Peróxido nitrito

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

RMD – Resistência a múltiplas drogas

RO• – Radical alcoxila

ROO• – Radical peroxila

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*

SOD – Superóxido dismutase

TLR-4 – Receptor Toll-Like 4

TNF –α – Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Considerações gerais sobre espécies reativas e radicais livres.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Estresse oxidativo e seus efeitos.....	4
<b>2.2. Mecanismos de defesa antioxidante endógenos: não enzimáticos e enzimáticos.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Antioxidantes exógenos e seus benefícios.....	8
<b>2.3. Aspectos do processo inflamatório.....</b>	<b>11</b>
2.3.1. Ácido hialurônico e enzima hialuronidase.....	13
<b>2.4. Mutações e câncer.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5. Resistência microbiana.....</b>	<b>19</b>
2.5.1. Medicamentos Antimicrobianos.....	21
2.5.2. Antibacterianos.....	21
2.5.3. Antifúngicos.....	22
<b>2.6. Micro-organismos de importância médica resistentes a antimicrobianos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.1. Cocos gram-positivos.....</b>	<b>24</b>
2.6.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
2.6.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	25
<b>2.6.2. Bacilos gram-negativos.....</b>	<b>25</b>
2.6.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.6.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
<b>2.6.3. Fungos.....</b>	<b>27</b>
2.6.3.1. <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	27
2.6.3.2. <i>Candida albicans</i> .....	28
<b>2.7. Busca de compostos ativos em produtos naturais como alternativa a resistência microbiana.....</b>	<b>28</b>

<b>2.8. Geoprópolis</b> .....	29
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	33
3.1. Geral.....	33
3.2. Específicos.....	33
Referências.....	34
<b>4. ANEXOS</b> .....	60
Anexo I. Artigo Científico.....	60
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

Historicamente, os produtos naturais e seus derivados desempenharam um papel importante na medicina (PATRIDGE *et al.*, 2016), sendo utilizados há séculos para o tratamento e cura de diversas doenças (SINGH *et al.*, 2016) e por apresentarem entre seus constituintes, inúmeros compostos bioativos (DOTA *et al.*, 2011). Estes produtos ainda podem proporcionar uma diversidade estrutural única, oferecendo oportunidades para descoberta de novos compostos (DIAS *et al.*, 2012).

Durante os últimos anos, os produtos naturais e derivados têm sido avaliados no tratamento de doenças infecciosas, (antifúngicos, antibacterianos, antiparasitários e antivirais), neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, imunológicas, inflamatórias e cancerígenas (BUTLER *et al.*, 2014a). No tratamento do câncer, por exemplo, de 175 moléculas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA), 49 % são de origem natural ou derivados (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Dentre os produtos naturais, o geoprópolis é produzido por algumas espécies de abelhas nativas sem ferrão, presentes em zonas tropicais e subtropicais (BARTOLOMEU *et al.*, 2016), a partir de uma mistura de resinas vegetais, secreções mandibulares, cera de abelhas e terra (DUTRA *et al.*, 2014, BARTOLOMEU *et al.*, 2016). Este produto tem sido utilizado na medicina popular, como agente anti-séptico, no tratamento de dermatose e doenças respiratórias (BARTOLOMEU *et al.*, 2016). No Brasil, o geoprópolis tem sido utilizado por comunidades indígenas no estado do Maranhão (ARAÚJO *et al.*, 2015) e por comunidades indígenas e sítiantes da região amazônica, no tratamento de doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, como agente fortificante e bactericida (SOUZA *et al.*, 2004).

Recentemente, diversos trabalhos ampliaram os conhecimentos sobre as aplicações terapêuticas do geoprópolis, a partir de diferentes espécies de abelhas sem ferrão, com relatos sobre suas propriedades antimicrobiana (LIBÉRIO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2013a), antioxidante (SOUZA *et al.*, 2013; DUTRA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017a), anti-inflamatória (FRANCHIN *et al.*, 2012, 2013), gastroprotetora (RIBEIRO-JUNIOR *et al.*, 2015) antiviral (COELHO *et al.*, 2015) imunomodulatória (OLIVEIRA *et al.*, 2016), anticâncer (CINEGAGLIA *et al.*, 2013; BARTOLOMEU *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017a), e antimutagênica (SANTOS *et al.*, 2017b).

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão, a *Melipona orbignyi*, (Manduri-de-mato-grosso), produz própolis e geoprópolis (NOGUEIRA-NETO, 1997). Na literatura, foi evidenciada a composição química, atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica do extrato da própolis (CAMPOS *et al.*, 2014), entretanto, são inexistentes estudos que caracterizem a composição química e que comprovem os potenciais farmacológicos do geoprópolis desta espécie de abelha. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a composição química e propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana do geoprópolis produzido por *M. orbignyi*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Considerações gerais sobre espécies reativas e radicais livres**

Espécies reativas de oxigênio (ERO) é um termo que se refere a uma série de moléculas quimicamente reativas, que são derivadas do oxigênio (O<sub>2</sub>), enquanto (ERN) são espécies reativas derivadas do nitrogênio (YE *et al.*, 2015). Englobando ERO e ERN, podemos encontrar radicais livres e outras espécies reativas não-radicalares (POLJŠAK & DAHMANE, 2012).

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados, o que os torna reativos e instáveis, estes compostos reagem com outras moléculas, abstraindo elétrons destas, adquirindo assim estabilidade, através de oxirredução (PHANIENDRA *et al.*, 2015; POPRAC *et al.*, 2017). São substâncias resultantes de processos metabólicos celulares normais (VALKO *et al.*, 2007; PHANIENDRA *et al.*, 2015), tais como inflamação, fagocitose e respiração celular (LOBO *et al.*, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Também são gerados durante estados de isquemia, infecções e câncer (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

Os radicais livres particularmente os pertencentes às ERO e ERN possuem funções regulatórias em vários processos homeostáticos (FALOWO *et al.*, 2014), participam na sinalização de processos como morte celular programada, proliferação e diferenciação celular (YE *et al.*, 2015; MITTLER *et al.*, 2017), defesa contra microrganismos (VALKO *et al.*, 2007), regulação da expressão de genes (DEWHIRST *et al.*, 2008), regulação da pressão arterial, sistema imune, neurotransmissão e relaxamento muscular (VALKO *et al.*, 2015).



Em concentrações baixas ou moderadas as ERO e ERN podem funcionar na forma de sinais, promovendo atividades de proliferação, diferenciação celular e maturação de estruturas celulares, enquanto em níveis mais elevados podem auxiliar no sistema de defesa do organismo, em processos de apoptose e morte celular (YE *et al.*, 2015; MITTLER *et al.*, 2017). Os radicais livres podem ainda auxiliar na defesa contra agentes infecciosos (VALKO *et al.*, 2007), fagocitose, síntese de prostaglandinas (BAGCHI & PURI 1998; LOBO *et al.*, 2010) e possuem importância na atividade muscular e na transdução de sinais celulares (DRÖGE, 2002).

Os radicais livres podem ser produzidos endogenamente nas mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático, onde há um consumo elevado de oxigênio (PHANIENDRA *et al.*, 2015). A produção destes compostos pode ainda ser influenciada por fatores exógenos, tais como a exposição à radiação, tabagismo, poluentes, alguns tipos de drogas e produtos químicos industriais (VALKO *et al.*, 2007). Em nosso organismo, estes compostos exógenos podem ser decompostos ou metabolizados em radicais livres (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

Entre os radicais livres pertencentes às ERN encontram-se óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) e dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}\bullet_2$ ), e como espécies não radicalares podemos citar o peróxido nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e ácido nitroso  $\text{HNO}_2$  (PHANIENDRA *et al.*, 2015; WEIDINGER & KOZLOV, 2015). Contudo, os radicais livres mais importantes produzidos durante as reações metabólicas, são aqueles derivados do oxigênio, por sua vez, estes são os principais radicais que ocasionam danos biológicos (BULLON *et al.*, 2014; PHANIENDRA *et al.*, 2015).

As ERO compõem as espécies radicalares ânion superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2$ ), radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}\bullet$ ) (CAROCHO & FERREIRA, 2013), e não radicalares, como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), que é produzido por neutrófilos na defesa contra agentes patogênicos, com participação da mieloperoxidase, enzima que catalisa a reação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o cloreto (WINTERBOURN, 2002; YE *et al.*, 2015). As espécies não radicalares não possuem elétrons desemparelhados, mas são altamente reativas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Portanto, quando em concentrações exacerbadas, as ERO trazem malefícios, gerando o estresse oxidativo (BULLON *et al.*, 2014).

### 2.1.1. Estresse oxidativo e seus efeitos

Quando existe um desequilíbrio entre a produção de radicais livres provenientes de espécies reativas e as defesas antioxidantes, podem ser desencadeados o estresse oxidativo e estresse nitrosativo (LI *et al.*, 2013; PHANIENDRA *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo/nitrosativo é desenvolvido quando há um excesso na produção de ERO e ERN e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no organismo (PHAM-HUY *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013; Phaniendra *et al.*, 2015; Poprac *et al.*, 2017). Esta condição pode acarretar danos em biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (KRYSTON *et al.*, 2011; CRAFT *et al.*, 2012).

Todos os componentes celulares podem ser suscetíveis à ação das ERO (FERREIRA & MATSUBARA, 1997), membranas celulares, por exemplo, são vulneráveis a um processo de oxidação denominado peroxidação lipídica (KOHEN & NISKA, 2002; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Este processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade de membranas celulares (CATALA, 2015; VAN DER PAAL *et al.*, 2016), com formação de poros, pelos quais permitem a entrada de ERO nas estruturas intracelulares (VAN DER PAAL *et al.*, 2016).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que pode ser dividida em iniciação, propagação e término (KOHEN & NYSKA *et al.*, 2002). Na iniciação, ocorre o sequestro de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado (AGP), que pode ser realizado pelo radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) (CAROCHO & FERREIRA, 2013), formando um radical lipídico, sendo convertido em um dieno conjugado, que reage com o oxigênio formando o radical peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) (LOBO *et al.*, 2010).

Após a formação do radical  $\text{ROO}\cdot$ , este sequestra mais átomos de hidrogênio de AGP, formando novos radicais lipídicos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A formação de radicais  $\text{ROO}\cdot$  leva à produção de radicais hidroperóxidos que por sua vez, podem sequestrar átomos de hidrogênio de outros AGP, gerando a propagação destas ERO (CATALA, 2012).

O término desta reação ocorre quando antioxidantes como a vitamina E doam átomos de hidrogênio para os radicais  $\text{ROO}\cdot$ , formando produtos não-radicalares

(AYALA *et al.*, 2014), ou quando os radicais lipídicos e ROO<sup>•</sup> produzidos anteriormente, propagam-se até destruírem a si próprios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Durante o processo de peroxidação lipídica, são formados compostos como alcanos, isoprostanos e malondialdeído (MDA) (LOBO *et al.*, 2010), sendo este último amplamente utilizado como marcador deste processo (GONG, *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2015), além disto, este composto pode reagir com proteínas celulares e DNA, através da formação de adutos, resultando em danos biomoleculares (AYALA *et al.*, 2014).

Durante os efeitos do estresse oxidativo, o radical <sup>•</sup>OH também pode reagir com todos os componentes da molécula de DNA (KRYSTON *et al.*, 2011), incluindo bases purínicas e pirimidínicas, podendo levar a inativação ou mutação do DNA (ALTIERI *et al.*, 2008). Além disso, as ERO podem acarretar danos em cadeias laterais de aminoácidos e inativação de diversas proteínas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; Halliwell, 2011; LU *et al.*, 2010).

Neste contexto, danos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos estão fortemente relacionados ao desenvolvimento de doenças, incluindo as neurodegenerativas (BARNHAM *et al.*, 2004; HAUSER *et al.*, 2013), cardiovasculares (DUMITRASCU, 2013; HUTCHESON & ROCIC, 2012), câncer (REUTER *et al.*, 2010; WATSON, 2013) e diabetes (RAINS & JAIN, 2011; PONUGOTI *et al.*, 2012), além de induzir ao processo de envelhecimento precoce (PHAM-HUY, *et al.*, 2008; LOBO *et al.*, 2010).

## **2.2. Mecanismos de defesa antioxidante endógenos: não enzimáticos e enzimáticos**

Os radicais livres e espécies reativas operam em concentrações baixas e mensuráveis dentro das células, estas concentrações em estado estacionário são determinadas pelo equilíbrio entre sua produção e neutralização (VALKO *et al.*, 2007). O frágil equilíbrio entre os seus efeitos benéficos e prejudiciais é um aspecto importante em organismos vivos (BHAT *et al.*, 2015). Em condições fisiológicas, as células mantêm o equilíbrio redox através da geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (TRACHOOTAM *et al.*, 2008).

A homeostase redox é essencial para a manutenção de muitos processos celulares, onde nas células, esta homeostase é caracterizada pelo equilíbrio geral de

seus sistemas de oxidação e redução (AYER *et al.*, 2014). Desta forma, as células possuem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, com intuito de eliminar ou neutralizar as ERO e ERN para manutenção da homeostase redox celular (TRACHOOTAM *et al.*, 2008).

O acúmulo celular de ERO é controlado por sistemas de defesa antioxidante, de origem endógena enzimática e não enzimática (GOODMAN *et al.*, 2011; YE *et al.*, 2015). A este complexo sistema antioxidante que é atribuído à função de eliminação de espécies reativas e/ou minimização de seus efeitos (LUSHCHAK *et al.*, 2014).

Os “antioxidantes enzimáticos” operam neutralizando e removendo os radicais livres, em um processo de várias etapas, com auxílio de cofatores como cobre, zinco, manganês e ferro (NIMSE & PAL, 2015). Os antioxidantes endógenos mais importantes que impedem a formação ou neutralizam os radicais livres são as enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GRd) (PHAM-HUY *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2010; NIMSE & PAL, 2015; YE *et al.*, 2015).

Como primeira linha de defesa, a SOD catalisa a reação de dismutação do radical ânion superóxido em oxigênio e  $H_2O_2$  (RAHMAN *et al.*, 2007; YE *et al.*, 2015). Existem várias isoformas de SOD em diferentes compartimentos celulares (TRACHOOTAM *et al.*, 2008), em adição, estas isoformas estão presentes em todas as células eucarióticas (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009). Dentre estas isoformas, existem a cobre/zinco dependente (CuZn-SOD ou SOD-1), que está presente no citoplasma, núcleo e plasma, a isoforma manganês dependente (Mn-SOD ou SOD-2) localizada principalmente nas mitocôndrias, e a CuZn-SOD (EC-SOD ou SOD-3), presente no meio extracelular (Faraci & Didion, 2004; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

A CAT atua na decomposição do  $H_2O_2$  em água e oxigênio (RAHMAN *et al.*, 2007; LOBO *et al.*, 2010). Nos seres humanos, os níveis mais elevados de CAT são encontrados no fígado, rim e eritrócitos, onde decompõe a maioria do  $H_2O_2$  nas células. A CAT é freqüentemente restrita nos peroxissomos (LU *et al.*, 2010), no entanto, as mitocôndrias bem como o reticulo endoplasmático possuem certas quantidades desta enzima (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

A GPx atua na neutralização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outros peróxidos orgânicos (LOBO *et al.*, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013) através de reações utilizando a conversão de glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) (TRACHOOTHAM *et al.*, 2008). A GPx localiza-se no citoplasma e na matriz mitocondrial, onde esta enzima pode reduzir outros peróxidos, tais como hidroperóxidos de ácidos graxos (PHAM-HUY *et al.*, 2008). Completando este sistema, a glutatona redutase (GRd), reduz a forma oxidada da glutatona (GSSG) a sua forma reduzida (GSH), mantendo assim o ciclo de neutralização de ERO (CAROCHO & FERREIRA, 2013; LUSHCHAK *et al.*, 2014).

Os “antioxidantes não enzimáticos” são importantes, pois funcionam interrompendo as reações em cadeia dos radicais livres (NIMSE & PAL, 2015). Nesta categoria encontram-se o peptídeo glutatona, o composto ácido úrico, o fator de enzima Q10 ou coenzima Q10 (CAROCHO & FERREIRA *et al.*, 2013) e a melatonina (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; REITER *et al.*, 2016).

A glutatona é um tripeptídeo endógeno que protege a células contra ERO, quer doando um átomo de hidrogênio ou um elétron (CAROCHO & FERREIRA, 2013; NIMSE & PAL, 2015), este tripeptídeo é extensivamente utilizado como cofator para funcionamento de enzimas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2007; LUSHCHAK *et al.*, 2012). O ácido úrico é o produto final do metabolismo de nucleótidos de purina em humanos, pode ser encontrado no plasma (POLJŠAK & DAHMANE, 2012) e é conhecido por evitar a superprodução de oxidantes que resultam da reação da hemoglobina com peróxidos (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

A coenzima Q10 está presente em todas as células e membranas, atua prevenindo a formação de radicais peroxila lipídicos (CAROCHO & FERREIRA, 2013), sendo conhecida como ubiquinona na sua forma oxidada e ubiquinol em sua forma ativa reduzida (SARMIENTO *et al.*, 2016). Por último, a melatonina é um hormônio pineal (BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2010) e demonstra atividade antioxidante de maneira indireta, auxiliando a expressão de enzimas antioxidantes (RODRIGUEZ *et al.*, 2004), e de maneira direta, na captura de radicais livres (REITER *et al.*, 2014). Adicionalmente, é descrito que a melatonina ainda é capaz de quelar íons de Fe III e II, impedindo assim a formação de radicais •OH pela reação de Fenton (REITER *et al.*, 2016).

Deste modo, as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas endógenas possuem vital importância, pois fornecem proteção contra os radicais livres (LU *et al.*, 2010; POLJŠAK & DAHMANE, 2012). No entanto, em condições de estresse ambiental (LOBO *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2010) e disfunção celular (BHAT *et al.*, 2015), os níveis de espécies reativas podem elevar-se e causar danos celulares significativos, sendo assim, a ingestão de antioxidantes exógenos pode contribuir para manter a homeostase celular (LU *et al.*, 2010).

### **2.2.1. Antioxidantes exógenos e seus benefícios**

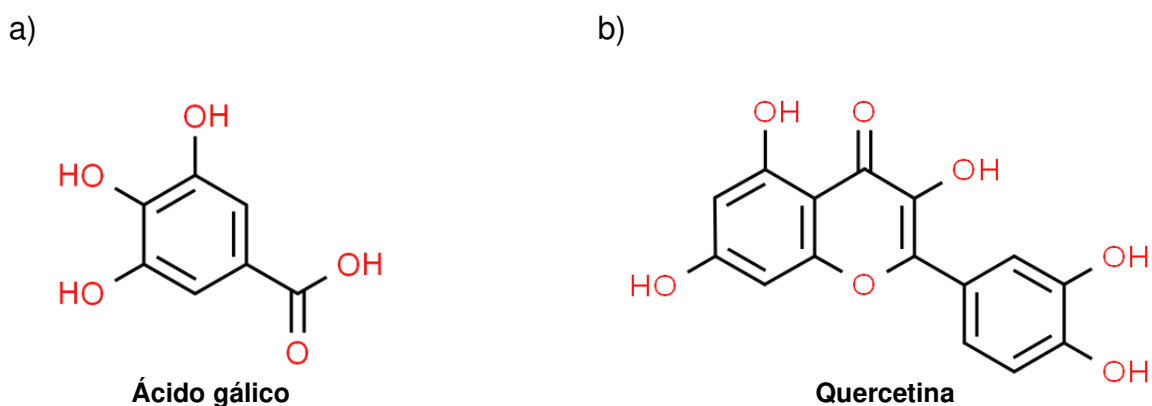
Antioxidantes exógenos são aqueles obtidos por meio da dieta ou como suplementos dietéticos, como por exemplo, derivados de extratos de açaí, uva, sementes, romã, goji, e substâncias como vitaminas e resveratrol (HENNING *et al.*, 2014). Alguns destes não neutralizam os radicais livres, mas modulam a atividade de enzimas antioxidantes (RAHMAN, 2007). Geralmente, antioxidantes naturais exógenos são provenientes de origem vegetal, como sementes (BIRASUREN *et al.*, 2013), plantas (ASGHARPOUR *et al.*, 2013) e frutas (BONOMO *et al.*, 2014), onde fazem parte da alimentação essencial ao organismo (GOODMAN, 2011), estes podem ser obtidos exógenamente também pela ingestão de chás (ZHU *et al.*, 2016) e vinho (DEL PINO-GARCÍA *et al.*, 2016).

Dentre os antioxidantes naturais encontrados em vegetais, os compostos fenólicos, são um dos grupos fitoquímicos mais abrangentes e abundantes na dieta (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; SCALBERT *et al.*, 2005), possuem grande importância em funções fisiológicas e morfológicas em plantas (BALASUNDRAM *et al.*, 2006) e exibem numerosas atividades biológicas, tais como anticancerígena, antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora, antiviral, vasodilatadora e antioxidante (DUTRA *et al.*, 2014).

A classe dos compostos fenólicos é constituída por subclasses como os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (BURGOS *et al.*, 2013) tais substâncias são caracterizadas por conferir atividade antioxidante, o que contribui para proteção das células do corpo contra a oxidação (HOSU *et al.*, 2014). Os ácidos fenólicos são classificados em hidroxicinâmicos, como o ácido gálico (**figura 1a**) e elágico, e hidroxibenzóicos (ácidos ferulico e p-coumarico) (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Os flavonoides são compostos naturais e metabólitos secundários de baixo peso molecular, são sintetizados em plantas e possuem estruturas fenólicas variáveis (KUMAR & PANDEY, 2013; LIU & MURRAY, 2016). Os flavonoides podem ser encontrados amplamente em plantas, frutos e desempenham múltiplos efeitos biológicos, tais como eliminação de radicais livres (NIMSE & PAL, 2015). Estas substâncias fenólicas hidroxiladas podem ser produzidas em variadas situações, incluindo decorrência de infecções microbianas (HASSAN & MATHESIUS, 2012), interações com simbioses fixadores de nitrogênio (LIU & MURRAY, 2016), proteção contra herbívoros, radiação ultra-violeta e calor (MIERZIAK *et al.*, 2014), além disso, são componentes importantes na coloração das flores (KATSUMOTO *et al.*, 2007).

Quimicamente, a estrutura básica dos flavonoides constitui-se por dois anéis benzeno ligados através de um anel heterocíclico pirano (**figura 1b**) (KUMAR & PANDEY, 2013), apresentando um ou mais grupos hidroxila nestes anéis (GELEIJNSE & HOLLMAN, 2008). Podem ser divididos em uma variedade de classes, como os flavonóis, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas e flavonas (CAROCHO & FERREIRA, 2013).



**Figura 1.** (a) Estrutura química do ácido gálico (ácido fenólico), (b) estrutura química da quercetina (flavonoide). Fonte: ChemSpider, 2018a; 2018b.

Estas classes diferem no grau de oxidação e no padrão de substituição de seus anéis pirano (HEIM *et al.*, 2002), onde a configuração, a substituição e o número total de grupamentos hidroxila influenciam substancialmente em vários mecanismos da atividade antioxidante, como eliminação de radicais e capacidade de quelação de íons metálicos de cobre e ferro (KUMAR & PANDEY, 2013).

A ação antioxidante destes compostos em sistemas biológicos são atribuídas à sua capacidade de transferir elétrons aos radicais livres (RAFIEIAN-KOPAEI *et al.*, 2013), quelação de metais catalisadores de radicais livres, ativação de enzimas antioxidantes e inibição de oxidases (HEIM *et al.*, 2002; CAROCHO & FERREIRA, 2013; BANJARNAHOR *et al.*, 2014).

Algumas vitaminas e minerais, tais como o ácido ascórbico (Vitamina C), tocoferól/tocotrienol (Vitamina E), zinco e selênio auxiliam na inibição de radicais livres e interrompem a propagação destes (GOODMAN *et al.*, 2011, CAROCHO & FERREIRA, 2013). A vitamina E pode ser encontrada em alimentos como grãos de cereais, (BRENNAN *et al.*, 2011), salmão (Olsvik *et al.*, 2015) e castanhas (DELGADO *et al.*, 2016). Por outro lado, a vitamina C é um importante componente de frutas e vegetais, presente em alguns exemplos de frutas cítricas, como o limão, tangerina e laranja (REKHA *et al.*, 2012).

O ácido ascórbico possui quatro grupos hidroxila, atua como um potente e mais importante antioxidante hidrofílico (BARROS *et al.*, 2011), sendo capaz de quelar metais catalisadores de radicais livres (BREWER, 2011), e sendo eficaz na eliminação de espécies reativas como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$  e óxido de nitrogênio (NOx) (GÜLÇIN, 2012).

A vitamina E é composta por oito isoformas, sendo quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis (CAROCHO & FERREIRA, 2013). São vitaminas lipossolúveis e apresentam atividade antioxidante (HERRERA & BARBAS, 2001). A  $\alpha$ -tocoferol é a isoforma antioxidante mais importante, pois protege as membranas celulares da peroxidação lipídica (TRABER & ATKINSON, 2007; BREWER, 2011).

Dentre os minerais que apresentam importante atividade antioxidante, estão o selênio e o zinco. O selênio pode ser obtido através de ingestão de plantas (alho, cebola, brócolis), frutas, nozes, carne de frango e peixe (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008; RAYMAN, 2012). Já o zinco pode ser encontrado no leite e seus derivados, frutas, vegetais, nozes, ovos e peixes (SOLOMONS *et al.*, 2001).

Estes minerais não agem diretamente sobre os radicais livres (CAROCHO & FERREIRA, 2013). O selênio é uma parte indispensável da maioria das enzimas antioxidantes (TABASSUM *et al.*, 2010). O zinco atua como cofator da SOD, competindo com íons de  $Fe^2$  e  $Cu^2$  catalisadores de radicais  $\cdot OH$ , e além disso produz a metalotioneína, um sequestrador de radicais  $\cdot OH$  (PRASAD *et al.*, 2014).



Além destes micronutrientes (vitaminas e minerais) desempenharem importantes funções antioxidantes, são extremamente importantes para o bom funcionamento do sistema imune (GODFREY & RICHARDSON, 2002).

Antioxidantes exógenos também podem ser encontrados em outros tipos de produtos naturais, como os produtos apícolas, dentre eles, o mel (SILVA *et al.*, 2013), própolis (NINA *et al.*, 2015) e geoprópolis de abelhas sem ferrão (LIBÉRIO *et al.*, 2011, DUTRA *et al.*, 2014; COELHO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017b).

### **2.3. Aspectos do processo inflamatório**

A inflamação é uma resposta protetora imune e fisiopatológica, decorrente de infecções e/ou danos teciduais (ORTEGA-GOMÉZ, 2013; KOTAS & MEDZHITOV, 2015). Este processo visa a eliminação e neutralização de patógenos (MEDZHITOV, 2008; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010) e a reparação de tecidos que foram danificados (MEDZHITOV, 2010; TAKEUCHI & AKIRA, 2010), para que desta forma, seja mantida a homeostase corporal (NORLING & SERHAN, 2010; ROSENBLAT *et al.*, 2014).

Classicamente, a inflamação pode ser evidenciada através de cinco sintomas: edema, calor, rubor, dor e perda de função do tecido (TAKEUCHI & AKIRA *et al.*, 2010). Podemos entender o processo inflamatório por meio de etapas ou fenômenos que podem ser denominados irritativos, vasculares, exsudativos, alterativos, resolutivos e reparativos (FILHO, 2011). Adicionalmente, a inflamação ainda pode ocorrer nas formas aguda e crônica (MURAKAMI & HIRANO, 2012), o que irá depender do tipo de estímulo e eficácia da reação inicial em eliminar o agente responsável pelo dano (KUMAR, 2010).

A inflamação aguda se inicia rapidamente e apresenta curta duração, poucos minutos a alguns dias (KUMAR, 2010). Este processo pode ocorrer por meio de estímulos diversos, tais como injúrias teciduais (traumas por contusão e perfuração), agentes físicos, agentes químicos, reações imunológicas, necrose tecidual e infecções (MEDZHITOV, 2008; PORTH & MATFIN, 2010).

Após o estímulo desencadeante (fenômeno irritativo), ocorre a vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar (fenômenos vasculares), (PORTH & MATFIN, 2010; FILHO, 2011), devido à infiltração de células do sistema imune inato, como neutrófilos (COUSSENS, 2002; FERRERO-MILLIANI, 2006), e a participação de

macrófagos residentes, granulócitos, (MEDZHITOV, 2008) e células do endotélio (KUMAR, 2010) na liberação de uma série de mediadores, como histamina, serotonina, citocinas, fator de ativação plaquetária (PAF), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), e óxido nítrico (NO) (FEGHALI & WRIGHT, 1997; COUSSENS, 2002; REUTER *et al.*, 2010; KUMAR, 2010; FILHO, 2011; ROSENBLAT *et al.*, 2014).

Devido aos eventos vasculares, ocorre o processo de direcionamento dos leucócitos e proteínas do plasma, como anticorpos, até o local lesionado ou que contém agentes invasores (fenômenos exsudativos) (KUMAR, 2010; FILHO, 2011). No processo inflamatório agudo também pode ocorrer degeneração e necrose (fenômenos alterativos) e ativação de mecanismos anti-inflamatórios naturais, que incluem liberação de glicocorticoides, modificações em receptores das células do exsudato e dos tecidos, apoptose e fagocitose (fenômenos resolutivos) (FILHO, 2011).

A resposta inflamatória aguda é normalmente encerrada quando o estímulo desencadeante é eliminado, a infecção é cessada e o tecido danificado é reparado (fenômenos reparativos) (MEDZHITOV, 2010; NORLING & SERHAN, 2010; FILHO, 2011). Porém, se a resposta falha em neutralizar o estímulo, a reação progride para a inflamação crônica (KUMAR, 2010; LANDSKRON *et al.*, 2014).

A inflamação crônica possui duração prolongada (semanas, meses e em alguns casos até anos), neste caso, o estímulo lesivo e tentativas de reparo estão agindo simultaneamente (FEGHALI & WRIGHT, 1997; KUMAR, 2010). Na inflamação crônica ocorre a infiltração de linfócitos T, células plasmáticas e o recrutamento de monócitos e macrófagos, onde a consequência final deste estado é a perda da função do tecido, devido à fibrose (FERRERO-MILIANI *et al.*, 2006). Além disso, infecções crônicas e doenças autoimunes são eventos relacionados ao desenvolvimento de inflamação crônica (MEDZHITOV, 2008).

Os efeitos deletérios da inflamação crônica incluem alterações no humor, sono, energia, cognição e motivação, todos os quais fazem parte de sintomatologia dos transtornos do humor (ROSENBLAT *et al.*, 2014). A inflamação excessiva e/ou inapropriada é causa do surgimento de diversas doenças, como artrite reumatóide, psoríase e doença inflamatória intestinal, além de contribuir fundamentalmente em

doenças cardiovasculares, diabetes (LUCAS *et al.*, 2006), doenças autoimunes, neurodegenerativas, síndrome metabólica e câncer (MURAKAMI & HIRANO, 2012).

Drogas não esteroidais anti-inflamatórias podem ser utilizadas no controle da inflamação (KESSEL *et al.*, 2014). Entretanto, podem ocasionar efeitos colaterais gastrointestinais (BJARNASON *et al.*, 1993; JARUPONGPRAPA *et al.*, 2013), complicações renais e cardiovasculares (HARIRFOROOSH *et al.*, 2013). Os glicocorticóides são utilizados no tratamento de inflamação aguda e crônica (COUTINHO & CHAPMAN, 2011), no entanto, não curam doenças crônicas, levando a tratamentos de longo prazo e efeitos colaterais, incluindo osteoporose, catarata, diabetes e supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NEWTON, 2013).

Em virtude do possível papel da inflamação crônica no desenvolvimento de diversas doenças, torna-se necessário a busca de novos compostos bioativos que apresentem eficácia ao inibir o processo inflamatório, com o mínimo de efeitos colaterais.

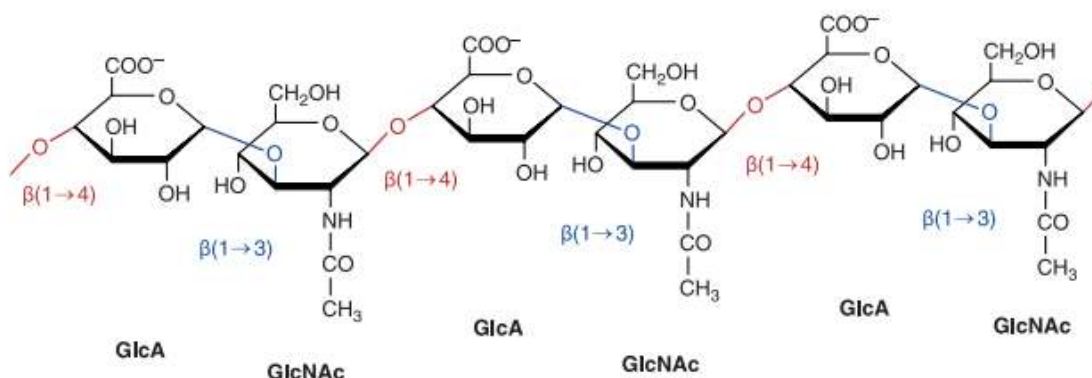
### **2.3.1. Ácido hialurônico e enzima hialuronidase**

O ácido hialurônico (AH) é um hidrato de carbono, mais especificamente um polissacarídeo, que ocorre naturalmente em todos os organismos vivos (NECAS *et al.*, 2008). É um dos principais componentes da matriz extracelular (PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2012; LITWINIUK *et al.*, 2016), e pode ser encontrado em altas concentrações em tecidos conectivos macios, incluindo a pele, cordão umbilical, líquido sinovial e humor vítreo (MENZEL & FARR, 1998; GIRISH & KEMPAJARU; 2007; NECAS *et al.*, 2008).

No corpo, auxilia na lubrificação de articulações e músculos, participa de processos de diferenciação e crescimento celular, progressão tumoral, inflamação (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013) e atua como um fator que modula ativamente a regeneração de tecidos (LITWINIUK *et al.*, 2016). Esta substância também pode reduzir os impulsos nervosos e sensibilidade nervosa associada à dor (NECAS *et al.*, 2008).

A molécula de AH é composta pela união do ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina, através das ligações glicosídicas  $\beta(1-3)$  e  $\beta(1-4)$  (**figura 2**) (NECAS *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2011; LITWINIUK *et al.*, 2016). Sua síntese é realizada por enzimas específicas denominadas Hyaluronic Acid Synthases (HAS1, HAS2, HAS3)

(PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2012; LITWINIUK *et al.*, 2016). Estas enzimas utilizam o ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina como substratos para sua produção (VIGETTI *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Estrutura química do ácido hialurônico. Fonte: Jiang *et al.*, 2011.

Por outro lado, a sua degradação ocorre pela ação de três enzimas, a hialuronidase, b-d-glucuronidase e  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase (NECAS *et al.*, 2008). Este grupo de enzimas distribui-se em todo o reino animal (GIRISH & KEMPAJARU, 2007). No corpo humano, as hialuronidases podem ser encontradas em órgãos (testículos, baço, pele, olho, fígado, rim, útero e placenta) e líquidos corporais (líquido lacrimal, sangue e esperma) (MENZEL & FARR, 1998).

As hialuronidases degradam o AH em fragmentos de tamanhos variáveis, através da hidrolização das ligações  $\beta(1-4)$  (PAPAKONSTANTINO *et al.*, 2012). Fragmentos de baixo peso molecular que são formados se ligam ao receptor CD44 nos leucócitos, promovendo seu recrutamento para os locais de inflamação (Kumar, 2010).

Além disto, fragmentos de baixo peso molecular de AH podem estimular a expressão de genes pró-inflamatórios e citocinas (RAYAHIN *et al.*, 2015). Por outro lado, fragmentos de AH de alto peso molecular, podem atuar protegendo o corpo dos efeitos das ERO, enquanto o AH na sua forma de polímero, exibe propriedades anti-inflamatórias e imunossupressivas (LITWINIUK *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, as hialuronidases receberam atenção e importância devido à sua função reguladora no metabolismo do AH (GIRISH & KEMPAJARU, 2007). O aumento na degradação do AH pode auxiliar no desenvolvimento de inflamação crônica, hipertensão pulmonar e câncer (ORMISTON *et al.*, 2010; SIRONEN *et al.*, 2011; SIMPSON, 2015). Adicionalmente, as hialuronidases podem desempenhar um

papel importante no processo de progressão tumoral (TOOLE *et al.*, 2004; SIRONEN *et al.*, 2010).

Neste sentido, diversos trabalhos com extratos de produtos naturais, tais como, plantas (MUHIT *et al.*, 2015), frutos (KIM *et al.*, 2016) mel (KOLAYLI *et al.*, 2015), própolis (CAMPOS *et al.*, 2015) e geoprópolis (SANTOS *et al.*, 2017b) tem avaliado o potencial anti-inflamatório pelo método de inibição da atividade da enzima hialuronidase.

#### **2.4. Mutações e câncer**

O DNA é a maior biomolécula presente nas células, conseqüentemente, pode estar sujeito a sofrer uma maior carga de danos (VERMEIJ *et al.*, 2014). Erros que podem ocorrer durante sua replicação, bem como danos ocasionados nesta biomolécula e que foram reparados erroneamente, são fatores que resultam em mutações (GREENMAN *et al.*, 2007; MARTINCORENA & CAMPBELL., 2015).

As mutações podem ser classificadas em germinativas, que ocorrem quando uma informação genética é passada para cada célula filha durante o desenvolvimento e divisão celular, e assim, indivíduos das próximas gerações podem herdar estas mutações e expressá-las durante algum momento de sua vida (HARRIS *et al.*, 2013; PODURI *et al.*, 2013). Enquanto mutações somáticas, são aquelas que devido a uma combinação de fatores, surgem após a fertilização e durante a produção de DNA, a medida que as células se dividem e se diferenciam em um determinado tipo celular, podendo distinguir-se das células geradoras (HARRIS *et al.*, 2013; MITCHELL, 2018). As mutações somáticas podem ocorrer nos genomas de todas as células em divisão (GREENMAN *et al.*, 2007).

Estas mutações ainda podem ser influenciadas pela exposição a agentes mutagênicos de origem exógena e endógena (GREENMAN *et al.*, 2007; MARTINCORENA & CAMPBELL, 2015). Como fontes exógenas citamos produtos químicos (VERMEIJ *et al.*, 2014), luz ultravioleta, fumaça proveniente de cigarros (HARRIS, 2013), infecções por patógenos, toxinas ambientais e radiações ionizantes (AYALA *et al.*, 2014). Endógenamente, substâncias produzidas durante o metabolismo celular normal como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (COOKE *et al.*, 2003), podem atuar de forma incessante gerando vários tipos de danos ao DNA (VERMEIJ *et al.*, 2014).

Estas lesões no DNA interferem em suas principais funções, como armazenamento seguro, transmissão e uso de informação genética (VERMEIJ *et al.*, 2014). Além disto, uma deficiência nas vias de reparo do DNA pode ocasionar a restauração incorreta destas lesões ou deixá-las sem reparação, levando a instabilidade genômica ou mutações que possam contribuir diretamente para uma grande variedade de doenças humanas, incluindo o câncer (JIN & ROBERTSON, 2013).

A carcinogênese é caracterizada como um estado descontrolado do crescimento celular (JEGGO *et al.*, 2016), em outras palavras, o câncer resulta da proliferação clonal de uma única célula anormal (MARTICORENA & CAMPBELL, 2015), esta doença pode ser decorrente de lesões oxidativas que ocasionam mutações (VERMEIJ *et al.*, 2014) que variam desde substituição de base simples a aberrações de grande escala, como translocações e alterações no número de cópias (COOKE *et al.*, 2003; HARRIS *et al.*, 2013).

O câncer também pode ser resultante de um acúmulo de mutações nos genes que controlam diretamente a divisão e morte celular (LENGAUER *et al.*, 1998). Adicionalmente, a exposição à agentes mutagênicos aumentam a frequência de mutações em células somáticas e germinativas humanas. A indução de mutações em células somáticas pode levar a aumento do risco de câncer (DUBROVA *et al.*, 2016).

O etil metanosulfonato (EMS) é um composto de alquilação utilizado em pesquisas para induzir mutações genéticas, através de lesões no DNA (HARTMAN *et al.*, 2014; MOHD-YUSOFF *et al.*, 2015), mais especificamente nos nucleotídeos guanina e adenina (HARTMAN *et al.*, 2014). Nestas mutações, as guaninas são alquiladas e as timinas desemparelhadas, gerando transições de G/C para A/T (MOHD-YUSOFF *et al.*, 2015).

O EMS tem sido utilizado em numerosos estudos de genotoxicidade (UYSAL *et al.*, 2012; MATIĆ *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2018), além disso, seus efeitos tem sido avaliados em plantas (TALEBI *et al.*, 2012), microalgas (KAWAROE *et al.*, 2015), células de linfócitos humanos (SOTTO *et al.*, 2010), ratos transgênicos (CAO *et al.*, 2014), nematóides (*Caenorhabditis elegans*) (SARIN *et al.*, 2010), insetos (HAELTERMAN *et al.* 2014), bactérias (ISHII *et al.*, 2015), e leveduras (GRUBER *et al.*, 2012). Adicionalmente, na literatura são reportados estudos com

extratos naturais que demonstram potencial antimutagênico, através da redução de mutações ocasionadas por agentes mutagênicos, incluindo o EMS (PASCOAL *et al.*, 2014; CARMONA *et al.*, 2016; GANAIE *et al.*, 2016; CARMONA *et al.*, 2017), Mitomicina C (MMC) (DI GIORGIO *et al.*, 2015) e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (DEL-TORO-SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

De acordo com Kada & Shimoi. (1987), o termo antimutagênico refere-se a compostos capazes de reduzir a taxa ou frequência de mutações, independentemente do mecanismo envolvido. Sejam mutações provenientes de eventos genotóxicos espontâneos ou induzidos (DURNEV, 2018). Além disso, os antimutagênicos podem ser compostos de origem natural ou sintética (MIKHAILOV *et al.*, 2015; MOHAMMED, 2016).

Um agente antimutagênico pode desempenhar ação no meio extracelular (desmutagênico), onde inativa agentes mutagênicos, ou ação intracelular (bio-antimutagênico), onde influencia processos de reparação, por exemplo (KADA & SHIMOI, 1987). Conforme o mecanismo de ação, podem ser classificados em diferentes classes: como antioxidantes, indutores de reparo, inativadores, bloqueadores ou compostos que afetam o metabolismo e transporte de mutagênicos, além de outros compostos com diferentes mecanismos de ação (SŁOCZYŃSKA *et al.*, 2014; GAUTAM *et al.*, 2016; DURNEV, 2018). Diversos mecanismos foram observados em compostos isolados e em extratos de origem natural, como ilustrado na **tabela 1**.

**Tabela 1.** Mecanismos de ação antimutagênicos evidenciados em diferentes extratos ou compostos.

Fonte de obtenção	Extrato ou Compostos	Mecanismo de ação	Referências
Própolis verde e <i>Baccharis dracunculifolia</i>	Extratos ricos em compostos fenólicos e flavonoides	Interação direta e inativação do mutagênico, captura de radicais livres	Roberto <i>et al.</i> (2016)
<i>Citrus latifolia</i> <i>Citrus sinensis</i>	Extrato rico em terpenos (Limoneno, $\beta$ -tujeno, $\alpha$ -mirceno, $\gamma$ -terpineno)	Captura de radicais livres e redução da ativação do pré-mutagênico	Toscano-Garibay <i>et al.</i> (2017)
Applied Chemical Co., Ltd.	Quitosana	Redução de mutações através de reação direta com formas ativas de mutagênicos	Chang <i>et al.</i> (2018)
<i>Peumus boldus</i> <i>Cryptocarya alba</i>	Flavonoides (Antocianinas)	Interação direta com agente mutagênico e bloqueio da alquilação do DNA	Carmona <i>et al.</i> (2017)
-	Selenometionina	Indução de reparo no DNA	Seo <i>et al.</i> (2002)
Extrasynthese Sigma-Aldrich	Flavonoides isolados/purificados (Flavonas e Flavonois)	Inibição do citocromo P4501A	Kanazawa <i>et al.</i> (1998)
Sigma-Aldrich TCI-Europe ChromaDex	Compostos fenólicos (Rutina, quercetina, mirecitina, Ácido rosmarínico, rutina)	Desalquilação de lesões no DNA, prevenção contra alquilação no DNA, formação de barreira protetora no DNA através de interações hidrofóbicas e eletroestáticas	Mladenović <i>et al.</i> (2013)
<i>Secale cereale</i>	Alquioresorcinóis	Aumento de apoptose em células com material genético danificado	Gasiorowski <i>et al.</i> (2001)
<i>Camellia sinensis</i>	Extrato rico em ácido gálico	Ligação ou inserção em transportadores da membrana, bloqueando a transferência de mutagênicos para o citoplasma,	Hour <i>et al.</i> (1999)
<i>Zingiber officinale</i>	Óleos essenciais	Inibição do citocromo P450, inibição dos níveis de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, aumento dos níveis de enzimas detoxificantes uridina 5'-difosfoglucuronil transferase e glutatona s-transferase	Jeena <i>et al.</i> (2013)

Estudos com extratos naturais antioxidantes de própolis e geoprópolis também tem sido avaliados frente ao seu potencial de impedir mutações (TOHAMY *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017b). Neste sentido, uma vez que a mutação no DNA é um passo crucial para o desenvolvimento do câncer (COOKE, 2003), necessita-se a busca de substâncias derivadas de produtos naturais que possam auxiliar na prevenção de mutações genéticas e conseqüentemente na prevenção do desenvolvimento do câncer.



## 2.5. Resistencia microbiana

Inúmeras doenças que acometem a saúde humana são ocasionadas por micro-organismos, embora estejam presentes na microbiota do corpo humano, em quantidades anormais, podem ser responsáveis pelo surgimento de graves infecções. Como forma de tratamento, são utilizados os medicamentos antimicrobianos, estes fármacos auxiliam na proteção da saúde humana, atuando no tratamento de infecções ocasionadas por micro-organismos (PAULA *et al.*, 2016; BANIN *et al.*, 2017; OMS., 2018).

Embora estes medicamentos tenham sido utilizados para fins preventivos ou terapêuticos, o surgimento de micro-organismos resistentes se tornou uma questão séria em hospitais de todo o mundo (GOLDMAN *et al.*, 1996; CAMPOS *et al.*, 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS., 2018), micro-organismos resistentes, incluindo bactérias e fungos, são aqueles capazes de resistir a drogas antimicrobianas, levando a ineficácia dos tratamentos e conseqüentemente persistência e propagação de infecções.

Esta resistência pode surgir em virtude de mecanismos intrínsecos ou adquiridos (PERCIVAL *et al.*, 2005). A resistência intrínseca refere-se à capacidade inata de resistir à ação do antibiótico como resultado de estruturas ou funções inerentes do micro-organismo (PERCIVAL *et al.*, 2005; BLAIR *et al.*, 2015). Por outro lado, a resistência adquirida pode surgir em consequência de mutações e/ou aquisição de genes de resistência provenientes de outros micro-organismos (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015). Além disso, esta resistência ocorre através de vários mecanismos moleculares, tais como bombas de efluxo, alteração da permeabilidade do fármaco, produção de enzimas modificadoras de antibióticos e formação de biofilmes (KHAN & KHAN, 2016; WRIGHT, 2016).

Os micro-organismos que desenvolvem resistência antimicrobiana, podem ser conhecidos como superbactérias (OMS.,2018), e podem apresentar resistência a múltiplas drogas antimicrobianas (RMD) (NORDMANN *et al.*, 2007; PAULA *et al.*, 2016; KHAN & KHAN, 2016). Dentre estes, alguns dos mais importantes são a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, (LISTER *et al.*, 2009; PETTY *et al.*, 2014; KHAN & KHAN, 2016).

A RMD também representa um grave problema no tratamento de infecções por fungos (COSTA *et al.*, 2014). Onde aproximadamente mais de 90% de todos os

óbitos relacionados a estes micro-organismos, são resultantes de espécies que pertencem aos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* (BROWN, 2012). Dentre estes, espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, possuem grande importância médica, além de apresentar RMD (BROWN, 2012; XIE *et al.*, 2014; CHOWDHARY *et al.*, 2017).

Em contrapartida ao problema de resistência por micro-organismos, o termo Sepsis, refere-se a uma resposta desregulada e deletéria do corpo humano devido a infecções, que acarreta disfunção de tecidos e órgãos (VINCENT *et al.*, 2015; SINGER *et al.*, 2016; OMS.,2018). Quando associada com disfunção de um ou mais órgãos, denomina-se sepsis grave, de outro modo, sepsis com hipotensão refratária à ressuscitação volêmica, denomina-se choque séptico, onde as chances de mortalidade são substancialmente aumentadas (CASTRO *et al.*, 2008; SINGER *et al.*, 2016).

De acordo com a OMS., (2018), a cada ano, mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por sepsis, com ocorrência de 6 milhões de óbitos. No Brasil, durante o período de 2002 a 2010, o número de mortes atingiu a escala alarmante de mais de nove milhões, 12,9% de todas as mortes neste período (TANIGUCHI *et al.*, 2014). Adicionalmente, estima-se que mais de 200,000 mil óbitos ocorrem por ano em UTI's brasileiras (MACHADO *et al.*, 2017).

A sepsis é a principal causa de morte em decorrência de infecções, especialmente se não diagnosticada e tratada com prontidão (SINGER *et al.*, 2016), sendo que muitas destas infecções são frequentemente resistentes a agentes antimicrobianos (OMS., 2018). Além disto, hospitais podem servir como reservatórios para a disseminação de agentes patogênicos resistentes a antimicrobianos (GOLDMANN, 1996).

A emergência a nível global de micro-organismos multirresistentes é um problema crescente, a prevalência desta resistência pode contribuir particularmente para o surgimento de infecções hospitalares (LOUREIRO *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2015). Patógenos resistentes possuem a capacidade de sobreviver em ambientes secos, por dias, semanas e até meses (BOYCE, 2007), com isto, pacientes em UTI's possuem alto risco de adquirir infecções, dependendo da gravidade da doença, imunossupressão ou fatores externos, tais como, ventilação mecânica e contato com cateteres (LAMBERT *et al.*, 2011). Adicionalmente, o ambiente hospitalar promove a

resistência de micro-organismos devido à realização de procedimentos invasivos e uso indiscriminado de antimicrobianos (PAULA, 2016).

### **2.5.1. Medicamentos Antimicrobianos**

Medicamentos antimicrobianos possuem a finalidade de eliminar micro-organismos que ocasionam o surgimento de infecções em seres humanos (OMS, 2018). Estes compostos atuam em níveis bioquímicos, moleculares e estruturais (KOHANSKI *et al.*, 2010), o que pode resultar na inibição do crescimento e da divisão ou morte celular de bactérias (medicamentos bacteriostáticos ou bactericidas) (NEMETH *et al.*, 2015) e fungos (medicamentos fungistáticos ou fungicidas) (ROEMER & KRYSAN, 2014). Adicionalmente, são classificadas em drogas de pequeno ou amplo espectro, sendo ativas contra poucos ou uma variedade de micro-organismos, respectivamente (LEVINSON, 2010).

### **2.5.2. Antibacterianos**

São utilizados no tratamento de infecções ocasionadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (STEENBERGEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006). Algumas das classes tradicionais e conhecidas destas drogas são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, glicopeptídeos e quinolonas (NIKAIDO, 2009; BLAIR *et al.*, 2015; BROWN, 2016). Cada antibiótico possui um determinado mecanismo de ação, tais como inibição da síntese da parede celular, síntese proteica e da síntese de ácidos nucleicos (KURTBÖKE, 2017).

Os  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de antibióticos caracterizados pela presença de um grupamento heterocíclico azetidionona denominado anel beta-lactâmico (TAVARES, 2014). Dentro da classe dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, citamos as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (BROWN, 2016). Estes antibióticos são bactericidas (ROEMER & KRYSAN, 2014), e atuam na síntese da parede celular das bactérias (KOHANSKI *et al.*, 2010) através da inibição das ligações cruzadas (transpeptidação) do peptidoglicano (LEVINSON, 2010).

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos bactericidas utilizados especialmente contra bacilos gram-negativo (LEVINSON, 2010). São formados por açúcares, grupamentos amina e possuem em sua estrutura molecular um grupamento aminociclitol (TAVARES, 2014). Alguns exemplos são a canamicina,

neomicina e gentamicina, estes são capazes de atuar na síntese proteica de microorganismos e contribuir para formação de ERO (KOHANSKI *et al.*, 2007; KOHANSKI *et al.*, 2010; BROWN, 2016).

Descobertas na década de 1940, as tetraciclinas, são produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008) e são antibióticos que bloqueiam a ligação do aminoacil-tRNA em seu sítio ribossômico, inibindo assim a síntese protéica (CHOPRA & ROBERTS, 2001). As tetraciclinas foram os primeiros antibióticos de amplo espectro (KURTBÖKE, 2017) e apresentam atividade bacteriostática contra uma variedade de bactérias gram-positiva e gram-negativa (LEVINSON, 2010).

Os glicopeptídeos são constituídos por complexas e grandes estruturas cíclicas, o que confere sua resistência à ação de enzimas proteolíticas  $\beta$ -lactamases (TAVARES, 2014). São antibióticos bactericidas derivados de actinomicetos, atuam na parede celular bacteriana e como exemplos citamos, a Vancomicina e  $\beta$ -avoparcin (BUTLER *et al.*, 2014b; BROWN, 2016; SUGIMOTO *et al.*, 2017). A Vancomicina, é utilizada no tratamento de infecções agudas por microorganismos patogênicos gram-positivos, é capaz de inibir a biossíntese do peptideoglicano (SINGH *et al.*, 2017), pois liga-se de forma direta com a porção D-alanil-D-alanina de pentapeptídeos, impedindo assim a ação de transpeptidases e inibe a ação de enzimas transglicosilases (LEVINSON, 2010).

As quinolonas são antibióticos bactericidas de origem sintética e são capazes de inibir a síntese de DNA em bactérias, atuando em DNA girases e topoisomerasas II e IV (KOHANSKI *et al.*, 2010; BROWN *et al.*, 2016). A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi isolada como subproduto da síntese da cloroquina e disponibilizada no tratamento de infecções urinárias (BRUNTON, 2011). Adicionalmente, pesquisadores aprimoraram as quinolonas, através da adição de flúor em suas estruturas, surgindo as fluoroquinolonas, como enoxacinas, perfloxacinas e ciprofloxacinas (KURTBÖKE, 2017).

### **2.5.3. Antifúngicos**

Infecções ocasionadas por fungos se tornaram cada vez mais comuns, onde pacientes portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e pacientes com as defesas imunológicas suprimidas são particularmente mais suscetíveis a

infecções fúngicas (BRUNTON, 2011). Como opções de tratamento podem ser utilizadas diferentes classes de fármacos antifúngicos, que incluem os azóis, polienos, equinocandinas e análogos de pirimidinas (SUCHER *et al.*, 2009; ROEMER & KRYSAN, 2014; LOHSE *et al.*, 2017).

Os azóis são compostos químicos heterocíclicos aromáticos que apresentam átomos de carbono substituídos por átomos de nitrogênio (TAVARES, 2014). São os mais utilizados e incluem exemplos como fluconazol, voriconazol e posaconazol (XIE *et al.*, 2014). Como mecanismo de ação, estes compostos atuam através da inibição competitiva da lanosterol 14-alfa-demetilase, a principal enzima de formação de esteroides, acarretando a depleção de ergosterol e acumulação de lanosterol, e consequentemente a inibição do crescimento fúngico (LEVINSON, 2010; BRUNTON, 2011; KURTBÖKE, 2017).

Os polienos são substâncias formadas por átomos de carbono com dupla ligação, são moléculas de característica anfipática e são produzidos por actinomicetos do solo (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; TAVARES, 2014; KURTBÖKE, 2017). Nesta classe, a anfotericina B é um exemplo bem conhecido de polieno que apresenta importante atividade antifúngica (BRUNTON, 2011; ROEMER & KRYSAN, 2014; TAVARES, 2014). Antifúngicos desta classe são capazes de se ligar ao ergosterol, o principal esteroide das membranas fúngicas, ocasionando a formação de poros, desestabilização da membrana e consequentemente indução do vazamento do conteúdo celular, até a letalidade (ODDS *et al.*, 2003; LOHSE *et al.*, 2017).

As equinocandinas são lipopéptdeos cíclicos e atualmente mais de vinte destes compostos naturais foram isolados (KURTBÖKE, 2017). Existem três equinocandinas que foram aprovadas pela Food and Drug Administration, são elas, a caspofungina, micafungina e anidulafungina (SUCHER *et al.*, 2009). Estes compostos inibem a síntese de  $\beta$ -1,3-glucano, que é importante para a formação da parede celular fúngica, esta inibição acomete a integridade da parede celular, provocando a lise osmótica da célula (LEVINSON, 2010; LOHSE *et al.*, 2017).

Os nucleotídeos timina, citosina e uracila são bases pirimidínicas e componentes essenciais que constituem ácidos nucleicos como DNA e RNA (SHARMA *et al.*, 2014). De acordo com a literatura, existem agentes farmacêuticos modernos que contêm fragmentos de pirimidina (ELGEMEIE *et al.*, 2017). A

flucitosina (5-FC) é um análogo de pirimidina fluorada, que foi sintetizada em 1957 como um análogo de citosina para o tratamento de leucemia, sendo que em 1963 foi evidenciada sua atividade antifúngica (ANDRIOLE, 1999). Esta atividade ocorre em função deste composto conseguir mimetizar nucleotídeos e se incorporar em ácidos nucleicos (DNA e RNA) de células fúngicas, interferindo assim na sua replicação de DNA e síntese proteica (LOHSE *et al.*, 2017).

## **2.6. Micro-organismos de importância médica resistentes a antimicrobianos**

### **2.6.1. Cocos gram-positivos**

#### **2.6.1.1. *Staphylococcus aureus***

A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* é uma bactéria comensal e patogêna humana (TONG *et al.*, 2015). É presente em regiões do corpo humano, como mãos, pescoço, faringe, axilas, abdômen e nariz (WERTHEIM *et al.*, 2005) e atua como uma das principais causas de bacteremia, endocardite infecciosa, infecções osteoarticulares, cutâneas, pleuropulmonares e pneumonia (DELEO *et al.*, 2010; TONG *et al.*, 2015). Além disso, espécies de *S. aureus* são responsáveis por 20,7% das sepses, 20% dos casos de pneumonia e 19,7% das infecções de pele e dos tecidos moles na América Latina (GALES *et al.*, 2012).

Nas décadas de 40 e 50, foram reportadas infecções hospitalares de *S. aureus* resistentes à penicilina e na década de 70 ao antibiótico meticilina (LIMA *et al.*, 2015). Durante os últimos anos, a *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) se espalhou globalmente, sendo presente na maioria de hospitais, onde podem atuar como uma importante fonte de infecções adquiridas (WERTHEIM *et al.*, 2005; NIKAIDO, 2009).

A maioria das cepas de *S. aureus* resistentes adquiriram um plasmídeo que codifica uma penicilinase ( $\beta$ -lactamase), enzima que inativa o antibiótico por hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, por sua vez, a resistência da *S. aureus* à meticilina se deve à aquisição do gene *mecA*, que codifica enzimas que interferem na ação deste antibiótico (LIMA *et al.*, 2015). Adicionalmente, a SAMR já possui importância em nível global (NIKAIIDO, 2009; HARRIS *et al.*, 2010), sendo que sua resistência a vancomicina também é um problema de saúde pública reportado há vários anos (CDC, 1995). SAMR e *S. aureus* resistente à vancomicina estão entre as 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana, ocupando o

segundo lugar na lista de alta prioridade para desenvolvimento de novas drogas (OMS., 2018).

### **2.6.1.2. *Enterococcus faecalis***

A bactéria gram-positivo *Enterococcus faecalis* é um micro-organismo anaeróbio facultativo (VIDANA *et al.*, 2010). Micro-organismos desta espécie são robustos, versáteis e possuem habilidades para sobreviver em condições adversas, como ambientes com altas concentrações de sal e temperaturas que variam desde 10° C a 45° C (ARIAS *et al.*, 2012).

*E. faecalis* são cocos e podem ocorrer de forma isolada, em pares ou como cadeias curtas, habitam a cavidade oral, são encontrados em fezes e principalmente no trato gastrointestinal humano, (STUART *et al.*, 2006; ARIAS *et al.*, 2012), sendo presentes em diversos ambientes, incluindo alimentos, água, solo e plantas (MATOS *et al.*, 2013). Infecções endodônticas (BEGANOVIK *et al.*, 2018), no trato urinário (SHAH *et al.*, 2018) e pericardites (NEHME *et al.*, 2017) que afligem a saúde humana, são ocasionadas por micro-organismos desta espécie.

Em termos de resistência, *E. faecalis* se mostra resistente a uma grande variedade de antibióticos, tais como, gentamicina, oxacilina, ampicilina, clindamicina, cefalosporinas, aminoglicosídeos e vancomicina, o que a caracteriza como uma bactéria resistente a múltiplas drogas (ARIAS *et al.*, 2012; OLI *et al.*, 2012). Além disso, possui resistência contra o antibiótico daptomicina através de alterações na interação da membrana (ARIAS *et al.*, 2012) Adicionalmente, esta espécie promove formação de biofilmes, o que contribui para infecções mais persistentes e resistência (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001; OLI *et al.*, 2012).

## **2.6.2. Bacilos gram-negativos**

### **2.6.2.1. *Escherichia coli***

Esta espécie gram-negativo é conhecida como um comensal inofensivo e essencial que ocorre naturalmente no trato gastrointestinal de animais e humanos (CABRAL *et al.*, 2010; CROXEN *et al.*, 2013). É capaz de crescer tanto aerobicamente e anaerobicamente (GONZALEZ *et al.*, 2017), e de preferência em ambientes a 37 ° C (WANG *et al.*, 2010).

A maioria de suas cepas não é patogênica (CABRAL *et al.*, 2010), entretanto, algumas cepas de *E. coli* podem divergir das cepas comensais, assumindo uma natureza patogênica (KAPER *et al.*, 2004), adicionalmente, estas cepas podem apresentar fatores específicos de virulência (fimbrias, cápsula e lipopolissacarídeo), o que contribui com sua capacidade de causar um amplo espectro de doenças (BIEN *et al.*, 2011).

Dentre as cepas patogênicas, podemos citar *E. coli* enteropatogênicas enterohemorrágicas, enterotoxigênicas, uropatogênicas, e extracelular patogênicas (KAPER *et al.*, 2004). Estas são relacionadas com infecções do trato urinário, sepses, meningite, lesões em células epiteliais intestinais e principalmente o desenvolvimento de diarreia (CABRAL *et al.*, 2010; CROXEN *et al.*, 2013).

A *E. coli* é uma bactéria RMD de grande importância (SÁENZ *et al.*, 2004; POIREL *et al.*, 2010). Cepas desta espécie podem possuir genes que codificam resistências múltiplas (KORZENIEWSKA *et al.*, 2013), dentre estas, a *E. coli* (ST131) é disseminada globalmente e está associada com infecções do trato urinário humano e sepse (PETTY *et al.*, 2014). Adicionalmente, esta cepa é a principal causa de infecções graves resistentes a múltiplos fármacos nos Estados Unidos (JOHNSON *et al.*, 2010).

Formas de resistência desta espécie incluem a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, conferindo resistência à antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (PITOUT *et al.*, 2012), produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, que confere sua resistência à antibióticos como cefalosporina (JOHNSON *et al.*, 2010) e bombas de efluxo (BLAIR *et al.*, 2015).

#### **2.6.2.2. *Pseudomonas aeruginosa***

A *P. aeruginosa* atua como um patógeno oportunista, é encontrada em plantas, animais e humanos (LISTER *et al.*, 2009), pode acarretar infecções pulmonares (LYCZAK *et al.*, 2000) e pneumonia (HIRSCH & TAM, 2010). Além disso, esta espécie expressa vários fatores de virulência como flagelos, pili e LPS que contribuem para sua patogênese (RAMACHANDRAN, 2014).

Esta espécie consegue sobreviver com exigências nutricionais mínimas e tolerar uma variedade de condições físicas, o que justifica sua persistência em ambientes hospitalares (LISTER *et al.*, 2009). Na América Latina espécies de



*Pseudomonas spp.* são responsáveis por 7,5% das sepSES, por 31,2% dos casos de pneumonia e por 13,8% das infecções de pele e dos tecidos moles (GALES *et al.*, 2012).

Este micro-organismo é intrinsecamente resistente a uma ampla gama de drogas (ZAVASCKI *et al.*, 2010). Na literatura é descrito que esta espécie apresenta resistência aos antibióticos cefalosporinas, penicilinas, aminoglicosídeos, quinolonas e carbapenêmicos, (FALAGAS *et al.*, 2006; ZAVASCKI *et al.*, 2010).

Esta RMD ocorre devido aos seus mecanismos de resistência, como produção de b-lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bombas de efluxo, modificação do sítio-alvo e alteração da membrana (HANCOCK, 1998; ZAVASCKI *et al.*, 2010; HIRSH & TAM, 2015). Além disso, a *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos possui prioridade crítica, ocupando segundo lugar no top 12 das bactérias que necessitam urgentemente do desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (OMS, 2018).

### **2.6.3. Fungos**

#### **2.6.3.1. *Cryptococcus neoformans***

A levedura *C. neoformans* é um fungo patogênico oportunista que surgiu como uma importante causa de morbidade e mortalidade em pessoas com deficiências imunológicas (GILES *et al.*, 2009). Este fungo tem uma distribuição mundial, e é freqüentemente encontrado em solos contaminados com excreção aviária (CASADEVALL *et al.*, 2003). O mesmo pode ocasionar meningite (BOULWARE *et al.*, 2014), infecções na laringe e possui certos fatores de virulência (cápsula de polissacarídeo, melanina e proteases), para contornar as defesas do hospedeiro, (CASADEVALL *et al.*, 2003; BERGERON *et al.*, 2015).

Nos casos de imunocompetência, estes fungos podem promover uma infecção latente que posteriormente se disseminará após uma imunossupressão futura (MUNSHI *et al.*, 2018), por exemplo, a maioria dos pacientes com AIDS infectados com *C. neoformans* desenvolve meningite (SAR *et al.*, 2004). Adicionalmente, estudos recentes revelam que anualmente surgem 278.000 mil casos de antigenemia criptocócica, com a meningite sendo a causa de 15% das mortes relacionadas à AIDS (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

Um fator importante que pode contribuir para sua alta taxa de morbidade é a resistência deste fungo a vários antifúngicos, tais como flucitosina (ALEXANDER & PERFECT, 1997), fluconazol (SMITH *et al.*, 2015; BONGOMIN *et al.*, 2018), equinocandinas (MALIGIE & SELITRENNIKOFF, 2005) e anfotericina B (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2013).

### **2.6.3.2. *Candida albicans***

Espécies de *Candida* comumente residem como organismos comensais, sendo parte do microbioma normal no intestino, cavidade oral ou vagina em aproximadamente 50% da população (MOYES & NAGLIK, 2011). Dispositivos médicos, como os cateteres intravasculares, podem se tornar colonizados com *Candida* sp., permitindo o desenvolvimento de estruturas de biofilme e disseminação de infecções (RAMAGE *et al.*, 2012).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, a *C. albicans* ocasiona infecções na mucosa oral e tratos genitais, em adição, este microrganismo é o segundo maior agente responsável por infecções fúngicas no mundo (BROWN *et al.*, 2012). Em indivíduos imunocomprometidos este fungo pode se proliferar exageradamente e acarretar o surgimento de patologias, sendo que em 42% dos casos é fatal (MOYES & NAGLIK, 2011; FORD *et al.*, 2015).

O fungo *C. albicans* ainda pode apresentar resistência a vários antifúngicos, tais como, fluconazol, flucitosina (ALEXANDER & PERFECT, 1997) pirimidina fluorada e anfotericina B (CANNON *et al.*, 2007). Esta espécie desempenha esta múltipla resistência através dos seguintes mecanismos: (1) indução de bombas de efluxo, codificadas pelos genes MDR1, CDR1, CDR2, (2) alteração do sítio-alvo, devido a mutações no gene (ERG11), (3) alteração de vias biosintéticas, prevenindo efeitos disruptivos na membrana, através de mutações no gene ERG3, (4) mutações em genes que codificam componentes da parede celular fúngica e (5) formação de biofilmes (SANGLARD & ODDS, 2002; PFALLER, 2012; LOHSE *et al.*, 2017).

## **2.7. Busca de compostos ativos em produtos naturais como uma alternativa para resistência microbiana**

A diminuição da eficiência de antibióticos no tratamento de infecções comuns se acelerou nos últimos anos (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013). A resistência aos

antimicrobianos é uma das preocupações mundiais mais urgentes da medicina, tendo em vista que, patógenos resistentes são difíceis e mais caros de tratar (SLAMA, 2008; REDGRAVE *et al.*, 2014). Embora combinações de medicamentos existentes ainda possam ser mais eficazes se comparados à terapia isolada, são necessários novos e mais baratos medicamentos devido às dificuldades emergenciais de resistência (BROWN *et al.*, 2012).

Os produtos naturais têm sido tradicionalmente utilizados no tratamento de infecções, tendo em vista que são fonte de inúmeros compostos bioativos (DOTA *et al.*, 2011). Dentre estes, cumarinas, flavoides, alcalóides, acetilenos, iridoides, ligninas, xantonas e quinonas, possuem atividades antimicrobianas já descritas na literatura, desta forma, estas moléculas naturais possuem imensa importância terapêutica para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (SALEEM *et al.*, 2010).

Adicionalmente, várias classes destes compostos bioativos foram relatados em estudos que demonstram importante potencial antimicrobiano de produtos naturais, incluindo plantas (GHASHAM *et al.*, 2017), óleos essenciais (BEHBAHANI *et al.*, 2018) mel (TENÓRIO *et al.*, 2017), própolis (CAMPOS *et al.*, 2014) e geoprópolis de abelhas sem ferrão (CUNHA *et al.*, 2013a; SANTOS *et al.*, 2017b). Neste contexto, os compostos naturais se tornam uma alternativa essencial na descoberta de novos medicamentos antimicrobianos.

## 2.8. Geoprópolis

Algumas espécies de abelhas sem ferrão da tribo meliponini (NOGUEIRA-NETO, 1997; FRANCHIN *et al.*, 2013), com destaque para as espécies do gênero *Melipona* (LIBÉRIO *et al.*, 2011; CINEGAGLIA *et al.*, 2013; DUTRA *et al.*, 2014) produzem o geoprópolis (**figura 3**), uma mistura de resinas vegetais, secreções mandibulares e cera de abelhas, sendo adicionado terra em sua composição (DUTRA *et al.*, 2014). Estas espécies de abelhas armazenam grandes depósitos deste material dentro de suas colméias, utilizando-o como proteção mecânica, na vedação de frestas e para impedir a entrada excessiva de ar (NOGUEIRA-NETO, 1997).



**Figura 3.** Geoprópolis produzida por *Melipona orbigny*, coletada na região de Dourados, estado de Mato-Grosso-do-Sul.

No Brasil, o geoprópolis tem sido utilizada por populações indígenas no estado do Maranhão (ARAÚJO *et al.*, 2015) e por comunidades indígenas e ribeirinhas da Amazônia no tratamento de doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, como agente fortificante e bactericida (SOUZA *et al.*, 2004). Entretanto, apesar de seu uso na medicina popular, ainda são escassos os relatos científicos que investigam suas atividades biológicas e composição química. Apesar destes fatores, existem relatos importantes sobre seu emergente potencial terapêutico, como as atividades antimicrobiana (LIBÉRIO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2013a), anticâncer (CINEGAGLIA *et al.*, 2013; BARTHOLOMEU *et al.*, 2016), antioxidante (SOUZA *et al.*, 2013; DUTRA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017b), anti-inflamatória (FRANCHIN *et al.*, 2012, 2013), gastroprotetora (RIBEIRO-JUNIOR *et al.*, 2015) antiviral (COELHO *et al.*, 2015) e pró-inflamatória/imunomodulatória (OLIVEIRA *et al.*, 2016) (**tabela 2**), além destes há estudos sobre efeitos protetores sobre distúrbios associados à perda óssea, como a periodontite (CUNHA *et al.*, 2017) e efeitos antiproliferativos em células tumorais (SANTOS *et al.*, 2017a).

Este variado espectro de atividades biológicas do geoprópolis, pode ser associado à presença de seus compostos químicos bioativos. Atualmente já foram identificados fenilpropanoides, flavonoides (SOUZA *et al.*, 2013), ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis (DUTRA *et al.*, 2014), triterpenos, saponinas (DUTRA *et al.*, 2008), alcaloides (COELHO *et al.*, 2015), estirenos, benzaldeídos e monoterpenos (TORRES-GONZÁLEZ *et al.*, 2015) e terpenos (SANTOS *et al.*, 2017b).

**Tabela 2.** Compostos bioativos, atividades biológicas e efeitos terapêuticos/mecanismos de ação relatados sobre geoprópolis de espécies de abelhas sem ferrão.

Espécie	Substâncias químicas	Atividades biológicas	Efeitos terapêuticos/ Mecanismo de ação	Referências
<i>Melipona fasciculata</i>	Compostos fenólicos e flavonoides, triterpenos, ácido urônico e taninos hidrolisáveis	Antimicrobiana	Ação antimicrobiana em <i>Candida. albicans</i> e contra biofilmes de <i>Streptococcus. mutans</i>	Libério <i>et al.</i> (2011)
		Anti-inflamatória/ Imunomodulatória	Aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), <i>in vivo</i> .	Libério <i>et al.</i> (2011)
		Anticâncer	Efeito citotóxico sobre osteosarcoma canino, <i>in vitro</i> . Habilidade de recrutar macrófagos para o foco tumoral, com consequente indução de metabólitos tumorocidas. Indução de apoptose, apoptose/necrose tardia. Disrupção da membrana.	Cinegaglia <i>et al.</i> (2013) Bartholomeu <i>et al.</i> (2016)
		Antioxidante	Redução de ERO. Doação de átomos de hidrogênio.	Dutra <i>et al.</i> (2014)
<i>Melipona scutellaris</i>	Compostos fenólicos, benzofenonas	Pró-inflamatória e Imunomodulatória	Aumento na expressão de CD80 e TLR-4. Aumento na produção TNF- $\alpha$	Oliveira <i>et al.</i> (2016)
		Anti-inflamatória/ antinociceptiva	Diminuição de hipernocicepção mecânica através da inibição da produção de IL-1B e TNF- $\alpha$ Diminuição da migração de neutrófilos no processo inflamatório, dependente da via do óxido nítrico.	Franchin <i>et al.</i> (2012); Franchin <i>et al.</i> (2013)
		Antimicrobiana Antiproliferativa	Inibição do crescimento de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. mutans</i> e seus biofilmes. Inibição da aderência dos microrganismos.	Cunha <i>et al.</i> (2013a) Cunha <i>et al.</i> (2013b)
<i>Melipona subnitida</i>	Flavonoides e fenilpropanoides	Gastroprotetora	Aumento na produção de óxido nítrico e prostaglandinas.	Ribeiro-Junior <i>et al.</i> (2015)
<i>Melipona beecheii</i>	b-fencheno, estireno, benzaldeídos, mono-terpenos, terpenos	-	-	Torres-González <i>et al.</i> (2015)
<i>Scaptotrigona postica</i>	Alcaloides pirrolizidínicos e flavonas C-glicosil	Antiviral	Inibição da replicação do vírus herpes simples (HSV-1),	Coelho <i>et al.</i> (2015)
<i>Melipona mondury</i>	Terpenos, ácido gálico	Antioxidante Antibactericida Antiproliferativa	-	Santos <i>et al.</i> (2017a)
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Flavononas, terpenos, triterpenos, trigaloil, derivados de fenilpropanil heterosídeo	Antioxidante Anti-inflamatória Antimutagênica Antimicrobiana	Doação de átomos de hidrogênio. Inibição da enzima hialuronidase.	Santos <i>et al.</i> (2017b)

Dentre as espécies pertencentes à tribo meliponini, a *Melipona orbignyi* possui localização em regiões neotropicais da Argentina, Bolívia e Paraguai, sendo encontrada no Brasil, exclusivamente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso

do Sul (CAMARGO & PEDRO, 2017). Esta espécie é conhecida popularmente como Manduri-de-mato-grosso (NOGUEIRA-NETO, 1997). Na literatura existem estudos citogenéticos (ROCHA *et al.*, 2007) e comportamentais sobre esta espécie (BONACINA *et al.*, 2009).

Além destes, Campos *et al.* (2014) determinaram a composição química, atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica do extrato da própolis desta espécie, sendo comprovada a presença de compostos fenólicos e terpenos. No entanto, não existem estudos sobre a composição química e atividades biológicas da geoprópolis produzida por *M. orbignyi*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

O objetivo deste estudo foi investigar a composição química e propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana do geoprópolis produzido por *M. orbignyi*.

#### **3.2. Específicos**

- Quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato hidroetanólico de geoprópolis (EHGP) da espécie *Melipona orbignyi*;
- Determinar a composição química do EHGP por HPLC-DAD-MS/MS;
- Analisar o potencial antioxidante *in vitro* do EHGP, através da captura dos radicais livres 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzo thiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), inibição da hemólise oxidativa e produção de malondialdeído em eritrócitos humanos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do EHGP através da inibição da enzima hialuronidase;
- Avaliar ação antimutagênica do EHGP em colônias de *Saccharomyces cerevisiae* através da sobrevivência das leveduras, frequência de colônias conversoras triptofano e reversoras isoleucina;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do EHGP em bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras ATCC e resistentes a antibióticos provenientes de fluidos biológicos hospitalares;

## Referências

ALEXANDER, B. D., PERFECT, J. R. Antifungal resistance trends towards the year 2000. **Drugs**, v. 54, n. 5, p. 657-678, 1997.

ALTIERI, F., GRILLO, C., MACERONI, M., & CHICHIARELLI, S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 5, p. 891-938, 2008.

ANDRADE-SILVA, L., FERREIRA-PAIM, K., MORA, D. J., DA SILVA, P. R., ANDRADE, A. A., ARAUJO, N. E. SILVA-VERGARA, M. L. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 6, p. 635-640, 2013.

ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 151-162, 1999.

ARAÚJO, M. J. A. M., BÚFALO, M. C., CONTI, B. J., JR, A. F., TRUSHEVA, B., BANKOVA, V., SFORCIN, J. M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12-20, 2015

ARIAS, C. A., MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

ASGHARPOUR F., POURAMIR M., KHALILPOUR A., ASGHARPOUR ALAMDAR S., REZAEI M. Antioxidant activity and glucose diffusion relationship of traditional medicinal antihyperglycemic plant extracts. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 2, n. 4, p. 169, 2013

AYALA, A., MUÑOZ, M. F., ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.

AYER, A., GOURLAY, C. W., DAWES, I. W. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 60-72, 2014.

BAGCHI, K., PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. **EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal**, 4 (2), 350-360, 1998.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BANIN, E., HUGHES, D., KUIPERS, O. P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 450-452, 2017.



BANJARNAHOR, S. D., ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p. 239-44, 2014.

BARNHAM, K. J., MASTERS, C. L., BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 3, p. 205-214, 2004.

BARROS, A. I., NUNES, F. M., GONÇALVES, B., BENNETT, R. N., SILVA, A. P. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 165-172, 2011.

BARTOLOMEU, A. R., FRIÓN-HERRERA, Y., DA SILVA, L. M., ROMAGNOLI, G. G., DE OLIVEIRA, D. E., SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48-55, 2016.

BEGANOVIC, M., LUTHER, M. K., RICE, L. B., ARIAS, C. A., RYBAK, M. J., LAPLANTE, K. L. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 2, p. 303-309, 2018.

BEHBAHANI, B. A., YAZDI, F. T., VASIEE, A., MORTAZAVI, S. A. *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 449-452, 2018.

BERGERON, M., GAGNÉ, A. A., CÔTÉ, M., CHÊNEVERT, J., DUBÉ, R., PELLETIER, R. Primary larynx *Cryptococcus neoformans* infection: a distinctive clinical entity. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, v.2, p. ofv160, 2015

BHAT, A. H., DAR, K. B., ANEES, S., ZARGAR, M. A., MASOOD, A., SOFI, M. A., GANIE, S. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.

BIEN, J., SOKOLOVA, O., BOZKO, P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. **International journal of nephrology**, v. 2012, pp.1-15, 2012.

BIRASUREN B, KIM N.Y, JEON H.L, KIM M.R. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of *Agriophyllum pungens* seed extracts from Mongolia. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 18, n. 3, p. 188, 2013.

BJARNASON, I., HAYLLAR, J. MACPHERSON, A.J., ANTHONY, A.S. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. **Gastroenterology**, v. 104, n. 6, p. 1832-1847, 1993.

BLAIR, J. M., WEBBER, M. A., BAYLAY, A. J., OGBOLU, D. O., PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BONACINA, A.K.B, JUNIOR, V.A.J., NETTO, J.C. Response of the Stingless bee “Manduri do Mato Grosso” (*Melipona favosa orbigny*, Hymenoptera, Apidae) to variable concentrations of sucrose in artificial feeding sources of different colors. **Sociobiology**, v. 53, n. 1, p. 39-49, 2009.

BONGOMIN, F., OLADELE, R. O., GAGO, S., MOORE, C. B., RICHARDSON, M. D. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290-297, 2018.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D., COLLIN, F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. **Toxicology**, v. 278, n. 1, p. 55-67, 2010.

BONOMO, L.F, SILVA, D.N, BOASQUIVIS, P.F, PAIVA, F.A, GUERRA, J.F, MARTINS, T.A, TORRES A.G.J, PAULA I.T, CANESCHI, W.L, JACOLOT P, GROSSIN N, TESSIER F.J, BOULANGER E, SILVA M.E, PEDROSA M.L, OLIVEIRA R.P. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. **PLoS ONE**, v.3, pp.1-15, 2014.

BOULWARE, D. R., MEYA, D. B., MUZOORA, C., ROLFES, M. A., HUPPLER HULLSIEK, K., MUSUBIRE, A., RAJASINGHAM, R. Timing of antiretroviral therapy after diagnosis of cryptococcal meningitis. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 26, p. 2487-2498, 2014.

BOYCE, J. M. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. **Journal of hospital infection**, v. 65, p. 50-54, 2007.

BRENNAN, C., BRENNAN, M., DERBYSHIRE, E., TIWARI, B. K. Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 10, p. 570-575, 2011.

BREWER, M.S., 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

BROWN, G. D., DENNING, D. W., GOW, N. A., LEVITZ, S. M., NETEA, M. G., WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BROWN, E. D., WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

BRUNTON, L. L., CHABNER, B., KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. San Diego – California: Editora McGraw-Hill, 2011, 2109p.

BULLON, P., NEWMAN, H. N., & BATTINO, M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction?. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 139-153, 2014.

BURGOS, G., AMOROS, W., MUÑOZA, L., SOSA, P., CAYHUALLA, E., SANCHEZ, C., BONIERBALE, M. Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 1, p. 6-12, 2013.

BUTLER, M. S., ROBERTSON, A. A., COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014a.

BUTLER, M. S., HANSFORD, K. A., BLASKOVICH, M. A., HALAI, R., COOPER, M. A. Glycopeptide antibiotics: back to the future. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 9, p. 631-644, 2014b.

CABRAL, J. P. 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.

CAMARGO, J. M. F., PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region-online version**. 2017. Disponível em <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 17 de setembro, 2017.

CAMPOS, J.F, SANTOS, U.P, MACORINI, L.F.B, MELO, A.M.M.F, BALESTIERI, J.B.P, GAMERO, E.J.P, CARDOSO, C.A.L, SOUZA, K.P, SANTOS, E.L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374-380, 2014.

CAMPOS, J. F., SANTOS, U. P. D., ROCHA, P. D. S. D., DAMIÃO, M. J., BALESTIERI, J. B. P., CARDOSO, C. A. L., SANTOS, E. L. D. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

CANNON, R. D., LAMPING, E., HOLMES, A. R., NIIMI, K., TANABE, K., NIIMI, M., & MONK, B. C. *Candida albicans* drug resistance—another way to cope with stress. **Microbiology**, v.153, pp.3211-3217, 2007.

CAO, X., MITTELSTAEDT, R. A., PEARCE, M. G., ALLEN, B. C., SOETEMAN-HERNÁNDEZ, L. G., JOHNSON, G. E., HEFLICH, R. H. Quantitative dose–response analysis of ethyl methanesulfonate genotoxicity in adult gpt-delta transgenic mice. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 5, p. 385-399, 2014.

CARMONA, E. R., ESCOBAR, B., OBANDO, V. Antimutagenic activity of *Buddleja globosa* extracts in the *Drosophila* wing-spot test. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, n. 12a, p. 5758-5764, 2016.

CARMONA, E. R., REYES-DÍAZ, M., PARODI, J., INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. Antimutagenic evaluation of traditional medicinal plants from South America *Peumus boldus* and *Cryptocarya alba* using *Drosophila melanogaster*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 4, p. 208-217, 2017.

CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, pp.15-25, 2013.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J., GIUSIANO, G., EZKURRA, P. A., QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CASADEVALL, A., STEENBERGEN, J. N., NOSANCHUK, J. D. “Ready made” virulence and “dual use” virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 4, p. 332-337, 2003.

CASTRO, E. O. D., BORTOLOTTI, M. R. D. F. L., ZUGAIB, M. Sepsis e choque séptico na gestação: manejo clínico. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 12, p. 631-638, 2008.

CATALA, A. **Lipid peroxidation**. 1. ed. Rijeka – Croácia: Editora Intech Open Access Publisher, 2012, 546p.

CATALA, A. Lipid peroxidation modifies the assembly of biological membranes “The Lipid Whisker Model”. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 520, 2015.

CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, p. 1-13, 1995.

CHANG, S.H, WU, C.H TSAI, G.J. Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 1026-1032, 2018.

CHEN, J., ZENG, L., XIA, T., LI, S., YAN, T., WU, S., LIU, Z. Toward a biomarker of oxidative stress: a fluorescent probe for exogenous and endogenous malondialdehyde in living cells. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 16, p. 8052-8056, 2015.

CHOPRA, I., ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CHOWDHARY, A., SHARMA, C., MEIS, J. F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 2017.

CINEGAGLIA, N. C., BERSANO, P. R. O., ARAÚJO, M. J. A. M., BÚFALO, M. C., SFORCIN, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p.1-6, 2013.

COELHO, G. R., MENDONÇA, R. Z., VILAR, K. D. S., FIGUEIREDO, C. A., BADARI, J. C., TANIWAKI, N., NEGRI, G. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antih herpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-10, 2015.

COLLINS, M. N., BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262-1279, 2013.

COOKE, M. S., EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M., LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

COSTA, C., DIAS, P. J., SÁ-CORREIA, I., TEIXEIRA, M. C. MFS multidrug transporters in pathogenic fungi: do they have real clinical impact?. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 197, 2014.

COUSSENS, L. M., WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

COUTINHO, A. E., CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2-13, 2011.

CHEMSPIDER. **Search and share chemistry**. 2017a. Disponível em: <<https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.361.html?rid=583118d0-3b3a-42a7-a475-d9c1183d409a>> Acesso em: 17 de março, 2018.

CHEMSPIDER. **Search and share chemistry**. 2017b. Disponível em: <[https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.12269344.html?rid=ed898f59-e3bd-4980-b60b-5e355149de3d&page\\_num=0](https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.12269344.html?rid=ed898f59-e3bd-4980-b60b-5e355149de3d&page_num=0)> Acesso em: 17 de março, 2018

CRAFT, B. D., KERRIHARD, A. L., AMAROWICZ, R., PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148-173, 2012.

CROXEN, M. A., LAW, R. J., SCHOLZ, R., KEENEY, K. M., WLODARSKA, M., FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CUNHA, M. G., FRANCHIN, M., GALVÃO, L., DE RUIZ, A., DE CARVALHO, J. E., IKEGAKI, M., ROSALEN, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 23, 2013a.

CUNHA, M. G. D., FRANCHIN, M., GALVÃO, L. C. D. C., BUENO-SILVA, B., IKEGAKI, M., DE ALENCAR, S. M., ROSALEN, P. L. Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-7, 2013b.

CUNHA, M. G., RAMOS-JUNIOR, E. S., FRANCHIN, M., TAIRA, T. M., BEUTLER, J. A., FRANCO, G. C. N., ROSALEN, P. L. Effects of cinnamoyloxy-mammeisin from geopropolis on osteoclast differentiation and *porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1893-1899, 2017.

DEL PINO-GARCÍA, R., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L., RIVERO-PÉREZ, M. D., GARCÍA-LOMILLO, J., MUÑIZ, P. The effects of heat treatment on the phenolic composition and antioxidant capacity of red wine pomace seasonings. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1723-1732, 2017.

DELEO, F. R., OTTO, M., KREISWIRTH, B. N., CHAMBERS, H. F. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, 2010.

DELGADO, T., PEREIRA, J. A., RAMALHOSA, E., CASAL, S. Effect of hot air convective drying on the fatty acid and vitamin E composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) slices. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 8, p. 1299-1306, 2016.

DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L., BAUTISTA-BAUTISTA, N., BLASCO-CABAL, J. L., GONZALEZ-ÁVILA, M., GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M., ARRIAGA-ALBA, M. Antimutagenicity of methanolic extracts from *Anemopsis californica* in relation to their antioxidant activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-8, 2014.

DEWHIRST, M. W., CAO, Y., MOELLER, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 6, p. 425-437, 2008.

DI GIORGIO, C., BOYER, L., DE MEO, M., LAURANT, C., ELIAS, R., OLLIVIER, E. In vitro and in vivo antimutagenic effects of DIG, a herbal preparation of *Berberis vulgaris*, *Taraxacum officinale* and *Arctium lappa*, against mitomycin C. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 3, p. 267-277, 2015.

DIAS D.A., URBAN S., ROESSNER U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DOTA, K. F. D., CONSOLARO, M. E. L., SVIDZINSKI, T. I. E., BRUSCHI, M. L. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-8, 2011.

DUBROVA, Y. E. Mutation induction in the mouse and human germline. **Russian Journal of Genetics**, v. 52, n. 1, p. 17-28, 2016.

DUMITRASCU, R., HEITMANN, T., SEEGER, W., WEISSMANN, N., SCHULZ, R. Obstructive sleep apnea, oxidative stress and cardiovascular disease: lessons from animal studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

DURNEV, A. D. Antimutagenesis and Antimutagens. **Human Physiology**, v. 44, n. 3, p. 336-355, 2018.

DUTRA, R. P., NOGUEIRA, A. M. C., MARQUES, R. R. D. O., COSTA, M. C. P., RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.

DUTRA, R.P, ABREU, B.V.B, CUNHA, M.S, BATISTA, M.C.A, TORRES, L.M.B, NASCIMENTO, F.R.F, RIBEIRO, M.N.S, GUERRA, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2549-2557, 2014

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

ELGEMEIE, G. H., SALAH, A. M., ABBAS, N. S., HUSSEIN, H. A., MOHAMED, R. A. Pyrimidine non-nucleoside analogs: a direct synthesis of a novel class of N-substituted amino and N-sulfonamide derivatives of pyrimidines. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 36, n. 3, p. 213-223, 2017.

FALAGAS, M. E., KOLETISI, P. K., BLIZIOTIS, I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 1619-1629, 2006.

FALOWO, A. B., FAYEMI, P. O., MUCHENJE, V. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.

FARACI, F. M., DIDION, S. P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

FEGHALI, C. A., WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, n. 1, p. d12-d26, 1997.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRERO-MILIANI, L., NIELSEN, O. H., ANDERSEN, P. S., GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 227-235, 2007.

FILHO, B.G. **Bogliolo Patologia**. 8. ed. RJ – Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2011, 1501p.

FORD, C. B., FUNT, J. M., ABBEY, D., ISSI, L., GUIDUCCI, C., MARTINEZ, D. A., DELOREY, T., LI, B.I., WHITE, T.C., CUOMO, C., RAO, R. P., BERMAN, J., THOMPSON, D.A., REGEV, A. 2015. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **Elife**, v. 4, p. e00662, 2015.

FRANCHIN, M., DA CUNHA, M. G., DENNY, C., NAPIMOGA, M. H., CUNHA, T. M., KOO, H., ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 709-715, 2012.

FRANCHIN, M., DA CUNHA, M. G., DENNY, C., NAPIMOGA, M. H., CUNHA, T. M., BUENO-SILVA, B., LUIZ ROSALEN, P. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-9, 2013.

GALES, A. C., CASTANHEIRA, M., JONES, R. N., SADER, H. S. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

Ganaie, H. A., Ali, M. N., Ganai, B. A., Kaur, J., Ahmad, M. GC–MS analysis and evaluation of mutagenic and antimutagenic activity of ethyl acetate extract of *Ajuga bracteosa* wall ex. benth: an endemic medicinal plant of Kashmir himalaya, India. **The Journal of Clinical Toxicology**, v. 6, p. 0495-2161, 2016.

GASIOROWSKI, K., BROKOS, B., KULMA, A., OGORZAŁEK, A., SKORKOWSKA, K. Impact of four antimutagens on apoptosis in genotoxically damaged lymphocytes in vitro. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 6, n. 3, p. 649-675, 2001.

GAUTAM, S., SAXENA, S., KUMAR, S. Fruits and vegetables as dietary sources of Antimutagens. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v. 2, n. 3, p. 97-114, 2016.

GHASCHAM, A., AL MUZAINI, M., QURESHI, K. A., ELHASSAN, G. O., KHAN, R. A., FARHANA, S. A., ABDALLAH, W. E. Phytochemical Screening, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extract of *Ziziphus mauritiana* Lam. Leaves Collected from Unaizah, Saudi Arabia. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v. 6, n. 3, 2017.

GELEIJNSE, J. M., HOLLMAN, P. C. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms?. **The American Journal of Clinical Nutrition** v.88, pp.12-13, 2008.

GILES, S. S., DAGENAIS, T. R., BOTTS, M. R., KELLER, N. P., HULL, C. M. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491-3500, 2009.

GIRISH, K. S., KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sciences**, v. 80, n. 21, p. 1921-1943, 2007.

GODFREY, D., RICHARDSON, D. Vitamins and minerals for health. **British Food Journal**, v.104, p.913-933, 2002.



GOLDMANN, D. A., WEINSTEIN, R. A., WENZEL, R. P., TABLAN, O. C., DUMA, R. J., GAYNES, R. P., BURKE, J. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals: a challenge to hospital leadership. **Jama**, v. 275, n. 3, p. 234-240, 1996.

GONG, J., ZHU, T., KIPEN, H., WANG, G., HU, M., OHMAN-STRICKLAND, P., ZHANG, J. J. Malondialdehyde in exhaled breath condensate and urine as a biomarker of air pollution induced oxidative stress. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 23, n. 3, p. 322-327, 2013.

GONZALEZ, J. E., LONG, C. P., ANTONIEWICZ, M. R. Comprehensive analysis of glucose and xylose metabolism in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions by <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. **Metabolic Engineering**, v. 39, p. 9-18, 2017.

GOODMAN, R.M. BOSTICK, O. KUCUK, D.P. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1068-1084, 2011.

GREENMAN, C., STEPHENS, P., SMITH, R., DALGLIESH, G. L., HUNTER, C., BIGNELL, G., EDKINS, S. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 153-158, 2007.

GRIVENNIKOV, S. I., GRETEN, F. R., KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GRUBER, J. D., VOGEL, K., KALAY, G., WITTKOPP, P. J. Contrasting properties of gene-specific regulatory, coding, and copy number mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: frequency, effects, and dominance. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 2, p. e1002497, 2012.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

HAELTERMAN, N. A., JIANG, L., LI, Y., BAYAT, V., SANDOVAL, H., UGUR, B., CHARNG, W. L. Large-scale identification of chemically induced mutations in *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, v. 24, n. 10, p. 1707-1718, 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HANCOCK, R. E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. Supplement\_1, p. S93-S99, 1998.

HARIRFOROOSH, S., ASGHAR, W., JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 821-847, 2013.

HARRIS, S. R., FEIL, E. J., HOLDEN, M. T., QUAIL, M. A., NICKERSON, E. K., CHANTRATITA, N., EDGEWORTH, J. D. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 469-474, 2010.

HARRIS, R. S. Cancer mutation signatures, DNA damage mechanisms, and potential clinical implications. **Genome Medicine**, v. 5, n. 9, p. 87, 2013.

HARTMAN, P. S., BARRY, J., FINSTAD, W., KHAN, N., TANAKA, M., YASUDA, K., ISHII, N. Ethyl methanesulfonate induces mutations in *Caenorhabditis elegans* embryos at a high frequency. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 766, p. 44-48, 2014.

HASSAN, S., MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3429-3444, 2012.

HAUSER, D. N. HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 35-42, 2013.

HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HENNING, S. M., ZHANG, Y., RONTROYANNI, V. G., HUANG, J., LEE, R. P., TRANG, A., HEBER, D. Variability in the antioxidant activity of dietary supplements from pomegranate, milk thistle, green tea, grape seed, goji, and acai: effects of in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4313-4321, 2014.

HERRERA, E., BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 43-56, 2001.

HIRSCH, E. B., TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 10, n. 4, p. 441-451, 2010.

HOSU, A., CRISTEA, V. M., CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113-118, 2014.

HOUR, T. C., LIANG, Y. C., CHU, I. S., LIN, J. K. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 569-579, 1999.

HUTCHESON, R., ROCIC, P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p.1-13, 2012.

ISHII, K., TABUCHI, F., MATSUO, M., TATSUNO, K., SATO, T., OKAZAKI, M., HIRAMATSU, K. Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains developed from multiple clinical MRSA strains by in vitro mutagenesis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

JARUPONGPRAPA, S., USSAVASODHI, P., KATCHAMART, W. Comparison of gastrointestinal adverse effects between cyclooxygenase-2 inhibitors and non-selective, non-steroidal anti-inflammatory drugs plus proton pump inhibitors: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 7, p. 830-838, 2013.

JEGGO, P. A., PEARL, L. H., CARR, A. M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 35, 2016.

JEENA, K., LIJU, V. B., VISWANATHAN, R., KUTTAN, R. Antimutagenic potential and modulation of carcinogen-metabolizing enzymes by ginger essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 849-855, 2013.

JIANG, D., LIANG, J., NOBLE, P. W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 221-264, 2011.

JIN, B., ROBERTSON, K. D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. In: **Epigenetic Alterations in Oncogenesis**. Springer, New York, NY, v.754, p.3-29, 2013.

JIN, S. E., LEE, M. Y., SEO, C. S., HA, H., KIM, J. Y., SHIN, H. K. Genotoxicity evaluation of Hwanglyeonhaedok-tang, an herbal formula. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 202, p. 122-126, 2017.

JOHNSON, J. R., JOHNSTON, B., CLABOTS, C., KUSKOWSKI, M. A., CASTANHEIRA, M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 3, p. 286-294, 2010.

KADA, T., SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. **Bioessays**, v. 7, n. 3, p. 113-116, 1987.

KANAZAWA, K., YAMASHITA, T., ASHIDA, H., DANNO, G. I. Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 970-977, 1998.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KATSUMOTO, Y., FUKUCHI-MIZUTANI, M., FUKUI, Y., BRUGLIERA, F., HOLTON, T. A., KARAN, M., TAO, G. Q. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 11, p. 1589-1600, 2007.

KAWAROE, M., SUDRAJAT, A. O., HWANGBO, J., AUGUSTINE, D. Chemical mutagenesis of microalgae *Nannochloropsis* sp. using EMS (Ethyl Methanesulfonate). **Current Journal of Applied Science and Technology**, p. 494-505, 2015.

KESSEL, L., TENDAL, B., JØRGENSEN, K. J., ERNGAARD, D., FLESNER, P., ANDRESEN, J. L., HJORTDAL, J. Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops: a systematic review. **Ophthalmology**, v. 121, n. 10, p. 1915-1924, 2014.

KHAN, S. N., KHAN, A. U. Breaking the spell: combating multidrug resistant 'superbugs'. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 174, 2016.

KIM, W. B., PARK, S. H., KOO, K. Y., KIM, B. R., KIM, M., & LEE, H. Optimization of Hyaluronidase Inhibition Activity from *Prunus davidiana* (Carriere) Franch Fruit Extract Fermented by its Isolated *Bacillus subtilis* Strain SPF4211. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1527-1532, 2016.

KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J., HAYETE, B., LAWRENCE, C. A., COLLINS, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797-810, 2007.

KOHANSKI, M. A., DWYER, D. J., COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010.

KOHEN, R., NYSKA, A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KOLAYLI, S., SAHIN, H., CAN, Z., YILDIZ, O., SAHIN, K. Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 599-602, 2016.

KORZENIEWSKA, E., KORZENIEWSKA, A., HARNISZ, M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 91, p. 96-102, 2013.

KOTAS, M. E., MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

KRYSTON, T. B., GEORGIEV, A. B., PISSIS, P., GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

KUMAR, V, ABBAS, A.K., FAUSTO, N., ASTER, J.C. **Robbins & Cotran Patologia - Bases patológicas das doenças**. Tradução: Saunders. 8. ed. RJ – Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010, 1458p.

KUMAR, S., PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-17, 2013.

KURTBÖKE, I. **Microbial resources from functional existence in nature to applications**. 1. ed. Londres – Reino unido: Editora Academic Press, 2017, 354p.

LAMBERT, M. L., SUETENS, C., SAVEY, A., PALOMAR, M., HIESMAYR, M., MORALES, I., WOLKEWITZ, M. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 30-38, 2011.

LANDSKRON, G., DE LA FUENTE, M., THUWAJIT, P., THUWAJIT, C., HERMOSO, M. A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p.1-19, 2014.

LAXMINARAYAN, R., DUSE, A., WATTAL, C., ZAIDI, A. K., WERTHEIM, H. F., SUMPRADIT, N., GREKO, C. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEE, M. Y., SEO, C. S., HA, H., PARK, E., KIM, J. Y., SHIN, H. K. The genotoxicity of an aqueous extract of Gyejibokryeong-hwan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018.

LENGAUER, C., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-649, 1998.

LEVINSON, W. 2010. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10. ed. Porto Alegre – Rio Grande do Sul: Editora Artmed, 2010, 676p.

LI, J., NATION, R. L., TURNIDGE, J. D., MILNE, R. W., COULTHARD, K., RAYNER, C. R., PATERSON, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 589-601, 2006.

LI, H., HORKE, S., FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 313-319, 2013.

LIBÉRIO, S.A., PEREIRA, A.L.A., DUTRA, R.P., REIS, A.S., ARAÚJO, M.J.A.M., MATTAR, N.S., SILVA, L.A., RIBEIRO, M.N., NASCIMENTO, F.R., GUERRA, R.N., MONTEIRO-NETO, V., Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

LIMA, M. F. P., BORGES, M. A., PARENTE, R. S., JÚNIOR, R. C. V., OLIVEIRA, M. E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares—Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.

LIMÓN-PACHECO, J., GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

LISTER, P. D., WOLTER, D. J., HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

LITWINIUK, M., KREJNER, A., SPEYRER, M. S., GAUTO, A. R., GRZELA, T. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. **Wounds**, v. 28, n. 3, p. 78-88, 2016.

LIU, C. W., MURRAY, J. D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. **Plants**, v. 5, n. 3, p. 33, 2016.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LOHSE, M. B., GULATI, M., JOHNSON, A. D., NOBILE, C. J. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2017.

LOUREIRO, M. M., DE MORAES, B. A., MENDONÇA, V. L. F., QUADRA, M. R. R., PINHEIRO, G. S., ASENSI, M. D. *Pseudomonas aeruginosa*: study of antibiotic resistance and molecular typing in hospital infection cases in a neonatal intensive care unit from Rio de Janeiro City, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 387-394, 2002.

LU, J., LIN, P.H., YAO, Q., CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUCAS, S. M., ROTHWELL, N. J., GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S232-S240, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **Journal of Amino Acids**, v. 2012, p.1-26, 2012.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

LYCZAK, J. B., CANNON, C. L., PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1051-1060, 2000.

MACHADO, F. R., CAVALCANTI, A. B., BOZZA, F. A., FERREIRA, E. M., CARRARA, F. S. A., SOUSA, J. L., ZAJAC, S. R. The epidemiology of sepsis in

Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MALIGIE, M. A., SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins:(1, 3)  $\beta$ -glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2851-2856, 2005.

MARTINCORENA, I., CAMPBELL, P. J. 2015. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483-1489, 2015.

MATOS, R. C., LAPAQUE, N., RIGOTTIER-GOIS, L., DEBARBIEUX, L., MEYLHEUC, T., GONZALEZ-ZORN, B., SERROR, P. *Enterococcus faecalis* prophage dynamics and contributions to pathogenic traits. **PLoS Genet**, v. 9, n. 6, p. e1003539, 2013.

MATIĆ, S., KATANIĆ, J., STANIĆ, S., MLADENOVIĆ, M., STANKOVIĆ, N., MIHAILOVIĆ, V., & BOROJA, T. In vitro and in vivo assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 287-292, 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MENZEL, E. J., FARR, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Letters**, v. 131, n. 1, p. 3-11, 1998.

MIERZIAK, J., KOSTYN, K., & KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240-16265, 2014.

MIKHAILOV, V. F., SHISHKINA, I.M., VASILYEVA, L.V., SHULENINA, N.F., RAEVA, E.A., ROGOZHIN, M.I., STARSEV, M.I., ZASUKHINA, S.P., GROMOV, S.P., ALFIMOV, M.V. Comparative analysis of natural and synthetic antimutagens as regulators of gene expression in human cells under exposure to ionizing radiation. **Russian Journal of Genetics**, v. 51, n. 2, p. 130-137, 2015.

MITCHELL, M. **Molecular Pathology and the Dynamics of Disease**. 1. ed. London – United Kingdom: Editora Academic Press, 2018, 178p.

MLADENOVIĆ, M., MATIĆ, S., STANIĆ, S., SOLUJIĆ, S., MIHAILOVIĆ, V., STANKOVIĆ, N., KATANIĆ, J. Combining molecular docking and 3-D pharmacophore generation to enclose the in vivo antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 9, p. 1376-1396, 2013.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

- MOHAMMED, M. M. Structure antimutagenicity relationship of anthraquinones. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 4, n. 228, p. 2, 2016.
- MOHD-YUSSOFF, N. F., RUPERAO, P., TOMOYOSHI, N. E., EDWARDS, D., GRESSHOFF, P. M., BISWAS, B., BATLEY, J. Scanning the effects of ethyl methanesulfonate on the whole genome of *Lotus japonicus* using second-generation sequencing analysis. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 4, p. 559-567, 2015.
- MOYES, D. L., NAGLIK, J. R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p.1-10, 2011.
- MUHIT, M. A., IZUMIKAWA, M., UMEHARA, K., NOGUCHI, H. Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 121, p. 30-37, 2015.
- MUNSHI, M. A., GARDIN, J. M., SINGH, A., LUBERTO, C., RIEGER, R., BOUKLAS, T., DEL POETA, M. The role of ceramide synthases in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Cell Reports**, v. 22, n. 6, p. 1392-1400, 2018.
- MURAKAMI, M., HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 323, 2012.
- NAVARRO-ALARCON, M., CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1-3, p. 115-141, 2008.
- NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 8, p. 397-411, 2008.
- NEHME, F., GITAU, J., & LIU, J. Purulent pericarditis as a complication of bacteraemic *Enterococcus faecalis* urinary tract infection. **Case Reports**, v. 2017, p. bcr2017219498, 2017.
- NEMETH, J., OESCH, G., KUSTER, S. P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382-395, 2015.
- NEWMAN D.J., CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NEWTON, R. Anti-inflammatory glucocorticoids: changing concepts. **European journal of pharmacology**, v. 724, p. 231-236, 2013.
- NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.
- NIMSE, S. B., PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.



NINA, N., QUISPE, C., JIMÉNEZ-ASPEE, F., THEODULOZ, C., GIMÉNEZ, A., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2142-2153, 2015.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1. ed. São Paulo: Edição Nogueirapis, 1997, 447p.

NORDMANN, P., NAAS, T., FORTINEAU, N., & POIREL, L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 436-440, 2007.

NORLING, L. V., SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 1, p. 15-24, 2010.

ODDS, F. C., BROWN, A. J., GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OLI, A. K., RAJESHWARI, R.S., NAGAVANI, S., KELMANI, C.R. Biofilm formation by multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (mdef) originated from clinical samples. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 2, p. 284-288, 2012.

OLIVEIRA, L. P. G., CONTE, F. L., CARDOSO, E. D. O., CONTI, B. J., SANTIAGO, K. B., GOLIM, M. D. A., SFORCIN, J. M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1551-1558, 2016.

OLSVIK, P. A., BERNTSEN, M. H., SØFTELAND, L. Modifying effects of vitamin E on chlorpyrifos toxicity in Atlantic salmon. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119250, 2015.

OMS (**Organização Mundial da Saúde**). Disponível em: <<https://www.who.int/medicines/news/bacteria-antibiotics-needed/en/>> Acesso em: em 17 de setembro, 2017.

ORMISTON, M. L., SLAUGHTER, G. R., DENG, Y., STEWART, D. J., & COURTMAN, D. W. The enzymatic degradation of hyaluronan is associated with disease progression in experimental pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 298, n. 2, p. L148-L157, 2010.

ORTEGA-GÓMEZ, A., PERRETTI, M., SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013.

PAPAKONSTANTINO, E., ROTH, M., KARAKIULAKIS, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 253-258, 2012.

- PASCOAL, A., RODRIGUES, S., TEIXEIRA, A., FEÁS, X., ESTEVINHO, L. M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 233-239, 2014.
- PATRIDGE, E., GAREISS, P., KINCH, M. S., HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.
- PAULA, V. G., QUINTANILHA, L. V., DE ASSIS COUTINHO, F., DA ROCHA, H. F., SANTOS, F. L. (Enterobactérias produtoras de carbapenemase: reflexão sobre o surgimento de superbactérias em UTI's. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, 2016.
- PERCIVAL, S. L., BOWLER, P. G., RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2005.
- PETTY, N. K., ZAKOUR, N. L. B., STANTON-COOK, M., SKIPPINGTON, E., TOTSIKA, M., FORDE, B. M., ROGERS, B. A. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 15, p. 5694-5699, 2014.
- PODURI, A., EVRONY, G. D., CAI, X., WALSH, C. A. Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. **Science**, v. 341, n. 6141, 2013.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.
- PHAM-HUY, L. A., HE, H., PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008
- PHANIENDRA, A., JESTADI, D. B., PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.
- PITOUT, J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 9, 2012.
- POIREL, L., LAGRUTTA, E., TAYLOR, P., PHAM, J., & NORDMANN, P. Emergence of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4914-4916, 2010.
- POLJŠAK, B., DAHMANE, R. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, p. 1-4, 2012.
- PONUGOTI, B., DONG, G., GRAVES, D. T. Role of forkhead transcription factors in diabetes-induced oxidative stress. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

POPRAC, P., JOMOVA, K., SIMUNKOVA, M., KOLLAR, V., RHODES, C. J., VALKO, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592-607, 2017.

PORTH, C.M., MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2010, 911p.

PRASAD, A. S. Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 4, p. 364-371, 2014.

RAFIEIAN-KOPAEI, M., BARADARAN, A., RAFIEIAN, M. Plants antioxidants: From laboratory to clinic. **Journal of Nephropathology**, v. 2, n. 2, 2013.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAINS, J. L., JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.

RAJASINGHAM, R., SMITH, R. M., PARK, B. J., JARVIS, J. N., GOVENDER, N. P., CHILLER, T. M., BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 213-218, 2014.

RAMAGE, G., RAJENDRAN, R., SHERRY, L., WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

RAYAHIN, J. E., BUHRMAN, J. S., ZHANG, Y., KOH, T. J., GEMEINHART, R. A. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 1, n. 7, p. 481-493, 2015.

RAYMAN, M.P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, 2012.

REDGRAVE, L. S., SUTTON, S. B., WEBBER, M. A., PIDDOCK, L. J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 438-445, 2014.

REITER, R. J., TAN, D. X., GALANO, A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 377, 2014.

REITER, R. J., MAYO, J. C., TAN, D. X., SAINZ, R. M., ALATORRE-JIMENEZ, M., QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

REKHA, C., POORNIMA, G., MANASA, M., ABHIPSA, V., DEVI, P. J., KUMAR, V. H. T., KEKUDA, P. T. R. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of

fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. **Chemical Science Transactions**, v. 1, n. 2, p. 303-310, 2012.

REUTER, S., GUPTA, S. C., CHATURVEDI, M. M., & AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO-JUNIOR, J. A., FRANCHIN, M., CAVALLINI, M. E., DENNY, C., ALENCAR, S. M. D., IKEGAKI, M., & ROSALEN, P. L. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-5, 2015.

ROBERTO, M. M., MATSUMOTO, S. T., JAMAL, C. M., MALASPINA, O., MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 9-15, 2016.

ROCHA, M. P., POMPOLO, S. G., FERNANDES, A., & CAMPOS, L. A. O. MELIPONA: SIX DECADE OF CYTOGENETIC. **Bioscience Journal SUPPLEMENT**, v. 23, p.111-117, 2007.

RODRIGUEZ, C., MAYO, J. C., SAINZ, R. M., ANTOLIN, I., HERRERA, F., MARTIN, V., & REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004.

ROEMER, T., KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703, 2014.

ROSENBLAT, J. D., CHA, D. S., MANSUR, R. B., MCINTYRE, R. S. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 53, p. 23-34, 2014.

SÁENZ, Y., BRIÑAS, L., DOMÍNGUEZ, E., RUIZ, J., ZARAZAGA, M., VILA, J., TORRES, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3996-4001, 2004.

SALEEM, M., NAZIR, M., ALI, M. S., HUSSAIN, H., LEE, Y. S., RIAZ, N., JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 2, p. 238-254, 2010.

SANGLARD, D., ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANTOS, T. L. D., QUEIROZ, R. F., SAWAYA, A. C., LOPEZ, B. G. C., SOARES, M. B., BEZERRA, D. P., WALDSCHMIDT, A. *Melipona* mondury produces a geopropolis

with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2247-2259, 2017a.

SANTOS, C. M., CAMPOS, J. F., SANTOS, H. F., BALESTIERI, J. B. P., SILVA, D. B., PICOLI S.K., SANTOS, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017b.

SAR, B., MONCHY, D., VANN, M., KEO, C., SARTHOU, J. L., BUISSON, Y. Increasing in vitro resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 563-565, 2004.

SARIN, S., BERTRAND, V., BIGELOW, H., BOYANOV, A., DOITSIDOU, M., POOLE, R. J., NARULA, S., HOBERT, O. Analysis of multiple ethyl methanesulfonate-mutagenized *Caenorhabditis elegans* strains by whole-genome sequencing. **Genetics**, v. 185, n. 2, p. 417-430, 2010.

SARMIENTO, A., DIAZ-CASTRO, J., PULIDO-MORAN, M., KAJARABILLE, N., GUISSADO, R., J OCHOA, J. Coenzyme Q10 supplementation and exercise in healthy humans: a systematic review. **Current Drug Metabolism**, v.17, n. 4, p. 345-358, 2016.

SEO, Y. R., SWEENEY, C., SMITH, M. L. Selenomethionine induction of DNA repair response in human fibroblasts. **Oncogene**, v. 21, n. 23, p. 3663-3669, 2002.

SCALBERT, A., JOHNSON, I. T., SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 215S-217S, 2005.

SHAH, K. J., CHERABUDDI, K., SHULTZ, J., BORGERT, S., RAMPHAL, R., KLINKER, K. P. Ampicillin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus* spp (VRE): a single-center university hospital experience. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 57-61, 2018.

SHARMA, V., CHITRANSHI, N., AGARWAL, A. K. Significance and biological importance of pyrimidine in the microbial world. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2014, p. 1-31, 2014.

SILVA, I. A. A., SILVA, T. M. S., CAMARA, C. A., QUEIROZ, N., MAGNANI, M., NOVAIS, J. S., SOUZA, A. G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3552-3558, 2013.

SIMPSON, M. A., DE LA MOTTE, C., SHERMAN, L. S., WEIGEL, P. H. Advances in hyaluronan biology: Signaling, regulation, and disease mechanisms. **International Journal of Cell Biology**, v. 2015, p. 1-2, 2015.

SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., SEYMOUR, C. W., SHANKAR-HARI, M., ANNANE, D., BAUER, M., HOTCHKISS, R. S. The third international consensus

definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SINGH, A. K., SHARMA, N., GHOSH, M., PARK, Y. H., JEONG, D. K. Emerging importance of dietary phytochemicals in fight against cancer: role in targeting cancer stem cells. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3449-3463, 2016.

SINGH, M., CHANG, J., COFFMAN, L., KIM, S. J. Hidden mode of action of glycopeptide antibiotics: Inhibition of wall teichoic acid biosynthesis. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 16, p. 3925-3932, 2017.

SIRONEN, R. K., TAMMI, M., TAMMI, R., AUVINEN, P. K., ANTTILA, M., KOSMA, V. M. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 4, p. 383-391, 2011.

SLAMA, T. G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**, v. 12, n. S4, p. S4, 2008.

SŁOCZYŃSKA, K., POWROŹNIK, B., PEKALA, E., WASZKIELEWICZ, A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 2, p. 273-285, 2014.

SMITH, K. D., ACHAN, B., HULLSIEK, K. H., MCDONALD, T. R., OKAGAKI, L. H., ALHADAB, A. A., NIELSEN, K. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197-7204, 2015.

SOLOMONS, N. W. Dietary sources of zinc and factors affecting its bioavailability. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 22, n. 2, p. 138-154, 2001.

SOTTO, A., MAZZANTI, G., CARBONE, F., HRELIA, P., MAFFEI, F. Inhibition by  $\beta$ -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 699, n. 1-2, p. 23-28, 2010.

SOUZA, R. C., PAIVA, L. K. O. Y. J., AGUIAR, L., PLÁCIDO, F., OLIVEIRA, M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 333-336, 2004.

SOUZA, S.A, CAMARA, C.A, SILVA, E.M.S, SILVA, T.M.S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

STEENBERGEN, J. N., ALDER, J., THORNE, G. M., TALLY, F. P. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 283-288, 2005.

STUART, C. H., SCHWARTZ, S. A., BEESON, T. J., OWATZ, C. B. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93-98, 2006.

SUCHER, A. J., CHAHINE, E. B., BALCER, H. E. Echinocandins: the newest class of antifungals. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 43, n. 10, p. 1647-1657, 2009.

SUGIMOTO, A., MAEDA, A., ITTO, K., ARIMOTO, H. Deciphering the mode of action of cell wall-inhibiting antibiotics using metabolic labeling of growing peptidoglycan in *Streptococcus pyogenes*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

TABASSUM, A., BRISTOW, R. G., VENKATESWARAN, V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing?. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 3, p. 230-234, 2010.

TAKEUCHI, O., AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TALEBI, A. B., TALEBI, A. B., SHAHROKHIFAR, B. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. **Scientific Research**, v. 2012, n. 3, p. 1661-1665, 2012.

TANIGUCHI, L. U., BIERRENBACH, A. L., TOSCANO, C. M., SCHETTINO, G. P., AZEVEDO, L. C. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014, 1-653.

TENÓRIO, E. G., ALVES, N. F., MENDES, B. E. P. Antimicrobial activity of honey of africanized bee (*Apis mellifera*) and stingless bee, tiuba (*Melipona fasciculata*) against strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In **Aip Conference Proceedings** (v. 1906, n. 1, p. 130010, 2017).

TOHAMY, A. A., ABDELLA, E. M., AHMED, R. R., AHMED, Y. K. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. **Cytotechnology**, v. 66, n. 2, p. 283-297, 2014.

TOLEDO-ARANA, A., VALLE, J., SOLANO, C., ARRIZUBIETA, M. J., CUCARELLA, C., LAMATA, M., LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001.

TONG, S. Y., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L., FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 528-539, 2004.

TORRES-GONZÁLEZ, A., LÓPEZ-RIVERA, P., DUARTE-LISCI, G., LÓPEZ-RAMÍREZ, Á., CORREA-BENÍTEZ, A., RIVERO-CRUZ, J. F. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by

headspace solid-phase microextraction. **Natural Product Research**, v. 30, n. 2, p. 237-240, 2015.

TOSCANO-GARIBAY, J. D., ARRIAGA-ALBA, M., SÁNCHEZ-NAVARRETE, J., MENDOZA-GARCÍA, M., FLORES-ESTRADA, J. J., MORENO-EUTIMIO, M. A., ESPINOSA-AGUIRRE, J.J., GONZÁLEZ-ÁVILA, M RUIZ-PÉREZ, N. J. Antimutagenic and antioxidant activity of the essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

TRABER, M. G., ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2007.

TRABULSI L.R, ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. SP - São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 1-760.

TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M. A., VALLE, N. R. D., HUANG, P. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

UYVAL, H., KIZILET, H., AYAR, A., TAHERI, A. The use of endemic Iranian plant, *Echium amoenum*, against the ethyl methanesulfonate and the recovery of mutagenic effects. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 1, p. 44-51, 2015.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M., JOMOVA, K., RHODES, C. J., KUČA, K., MUSÍLEK, K. Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 1-37, 2015.

VAN DER PAAL, J., NEYTS, E. C., VERLACKT, C. C., BOGAERTS, A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. **Chemical Science**, v. 7, n. 1, p. 489-498, 2016.

VERMEIJ, W. P., HOEIJMAKERS, J. H., POTHOF, J. Aging: not all DNA damage is equal. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 26, p. 124-130, 2014.

VIDANA, R., SULLIVAN, Å., BILLSTRÖM, H., AHLQUIST, M., LUND, B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals—host-derived or exogenous source?. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 109-115, 2011.

VIGETTI, D., KAROUSOU, E., VIOLA, M., DELEONIBUS, S., DE LUCA, G., PASSI, A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2452-2459, 2014.

VINCENT, J. L., OPAL, S. M., MARSHALL, J. C., TRACEY, K. J. Sepsis definitions: time for change. **Lancet (London, England)**, v. 381, n. 9868, p. 774, 2013.



WANG, P., ROBERT, L., PELLETIER, J., DANG, W. L., TADDEI, F., WRIGHT, A., JUN, S. Robust growth of *Escherichia coli*. **Current Biology**, v. 20, n. 12, p. 1099-1103, 2010.

WATSON, J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. **Open Biology**, v. 3, n. 1, p. 120144, 2013.

WEIDINGER, A., KOZLOV, A. V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472-484, 2015.

WERTHEIM, H. F., MELLES, D. C., VOS, M. C., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. A., NOUWEN, J. L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751-762, 2005.

WINTERBOURN, C. C. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. **Toxicology**, v. 181, p. 223-227, 2002.

WRIGHT, G. D. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 862-871, 2016.

XIE, J. L., POLVI, E. J., SHEKHAR-GUTURJA, T., COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

YE, Z. W., ZHANG, J., TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1607-1621, 2015.

ZAVASCKI, A. P., CARVALHAES, C. G., PICAIO, R. C., GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 1, p. 71-93, 2010.

ZHU, F., SAKULNAK, R., WANG, S. Effect of black tea on antioxidant, textural, and sensory properties of Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1217-1223, 2016.

## 4. ANEXOS

### Anexo I. Artigo científico

O artigo científico descrito neste item foi publicado na revista *International Journal of Molecular Sciences*, na seção de Bioativos e Nutracêuticos em Saúde Humana e Doenças, as normas para submissão neste periódico encontram-se disponíveis no endereço eletrônico: <http://www.mdpi.com/journal/ijms/instructions>

Objetivos: A revista *International Journal of Molecular Sciences* (ISSN 1422-0067, CODEN: IJMCFK; ISSN 1661-6596 para edição impressa) fornece um fórum avançado para estudos moleculares em biologia e química, com forte ênfase na biologia molecular e medicina molecular. O objetivo da revista é fornecer uma revisão rigorosa pelos pares e permitir a publicação rápida de pesquisas de ponta para educar e inspirar a comunidade científica em todo o mundo.

Escopo: Na revista *International Journal of Molecular Sciences*, as moléculas são objeto de estudo; Entre estes estudos, encontram-se:

- Problemas teóricos fundamentais de grande interesse em biologia, química e medicina;
- Avançado progresso técnico experimental de amplo interesse em biologia, química e medicina; e
- Aplicação de teorias e novas tecnologias a estudos e cálculos experimentais específicos.

**Fator de impacto:** 4,556

**Qualis-Capes:** Estrato B1 (área de avaliação Biodiversidade)

**Qualis-Capes:** Estrato A2 (área de avaliação Biotecnologia)



Article

# Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*

Helder Freitas dos Santos <sup>1</sup>, Jaqueline Ferreira Campos <sup>1</sup>, Cintia Miranda dos Santos <sup>1</sup>, José Benedito Perrella Balestieri <sup>1</sup>, Denise Brentan Silva <sup>2</sup>, Carlos Alexandre Carollo <sup>2</sup>, Kely de Picoli Souza <sup>1</sup>, Leticia Miranda Estevinho <sup>3,4</sup> and Edson Lucas dos Santos <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Research group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, 79804-970 Dourados, MS, Brazil; heldersp@gmail.com (H.F.d.S.); jcampos\_bio@yahoo.com.br (J.F.C.); cinty.santos94@gmail.com (C.M.d.S.); josebalestieri@ufgd.edu.br (J.B.P.B.); kelypicoli@gmail.com (K.d.P.S.)

<sup>2</sup> Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil; denisebrentan@gmail.com (D.B.S.); carloscarollo@gmail.com (C.A.C.)

<sup>3</sup> Polytechnic Institute of Bragança, Agricultural College of Bragança, Campus Santa Apolónia, E 5301-855 Bragança, Portugal; leticia@ipb.pt

<sup>4</sup> Centre of Molecular and Environmental Biology, Biology Department, Minho University, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

\* Correspondence: edsonsantosphd@gmail.com; Tel.: +55-67-3410-2210

Academic Editor: Maurizio Battino

Received: 4 April 2017; Accepted: 27 April 2017; Published: 3 May 2017

**Abstract:** Geopropolis is a resin mixed with mud, produced only by stingless bees. Despite being popularly known for its medicinal properties, few scientific studies have proven its biological activities. In this context, the objective of this study was to determine the chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of the *Melipona orbignyi* geopropolis. The hydroalcoholic extract of geopropolis (HEGP) was prepared and its chemical composition determined by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). The antioxidant activity was determined by the capture of free radicals and inhibition of lipid peroxidation in human erythrocytes. The anti-inflammatory activity was evaluated by the inhibition of the hyaluronidase enzyme and the antimutagenic action was investigated in *Saccharomyces cerevisiae* colonies. The antimicrobial activities were determined against bacteria and yeasts, isolated from reference strains and hospital origin. The chemical composition of HEGP included flavonoids, derivatives of glycosylated phenolic acids and terpenoids. HEGP showed high antioxidant activity, it inhibited the activity of the inflammatory enzyme hyaluronidase and reduced the mutagenic effects in *S. cerevisiae*. In relation to the antimicrobial activity, it promoted the death of all microorganisms evaluated. In conclusion, this study reveals for the first time the chemical composition of the HEGP of *M. orbignyi* and demonstrates its pharmacological properties.

**Keywords:** HPLC-DAD-MS 1; phenolic compounds 2; lipid peroxidation 3; hyaluronidase 4; mutation 5; microorganisms 6

## 1. Introduction

Geopropolis is an apicultural product used in popular medicine for the treatment of digestive, respiratory, visual, female fertility, and dermatosis problems, in addition to being antiseptic and

immunostimulatory [1,2]. In Brazil, it is used by indigenous communities in the Amazon region [3] and in the northeast of the country [4].

This material is exclusively produced by stingless bees (Hymenoptera, Apidae, and Meliponinae) [5–7] found in the Neotropical region [8]. To produce geopropolis, bees add their mandibular secretions and waxes to the exudates collected from plant materials and mix mud into the result, conferring unique characteristics to this product [7]. This material is used in the beehive to seal cracks, provide mechanical protection and prevent excessive entry of air [9].

In recent years, some scientific reports have described the therapeutic properties of the geopropolis produced by different species of stingless bees, such as antimicrobial [5], anticancer [2], antioxidant [7,10], anti-inflammatory [6,11], gastroprotective [12] and antiviral [13] activities.

Regarding its chemical composition, the presence of phenylpropanoids, flavonoids [10], phenolic acids, hydrolysable tannins [7], triterpenes, saponins [14] and alkaloids [13] have been described, compounds that may be related to the biological properties of this bee product. Despite the growing interest in the pharmacological properties of the geopropolis produced by the *Melipona*, the data in the literature remain very scarce compared to those on the propolis of the *Apis mellifera* species. In the Chemical Abstract database, only 35 studies involving geopropolis were found, while more than 4000 papers studied the chemical composition and biological properties of *Apis* propolis [15].

*Melipona orbignyi* is among the species of bees that produce the geopropolis (Guérin, 1844), popularly known in Brazil as Manduri-de-Mato-Grosso [9]. This species is found in South America, specifically in Argentina, Bolivia, Paraguay and Brazil, in the latter being restricted to the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul [8]. In addition to geopropolis, other bee products are also produced by this species, such as honey and propolis. Recently, Campos et al. [16] described the chemical composition and biological activities of the propolis produced by *M. orbignyi*, in the only study thus far reported on the products generated by this species.

In this context, the objective of this study was to investigate the chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial properties of the geopropolis produced by *M. orbignyi*.

## 2. Results

### 2.1. Chemical Analysis

#### 2.1.1. Determination of Phenolic Compounds and Flavonoids

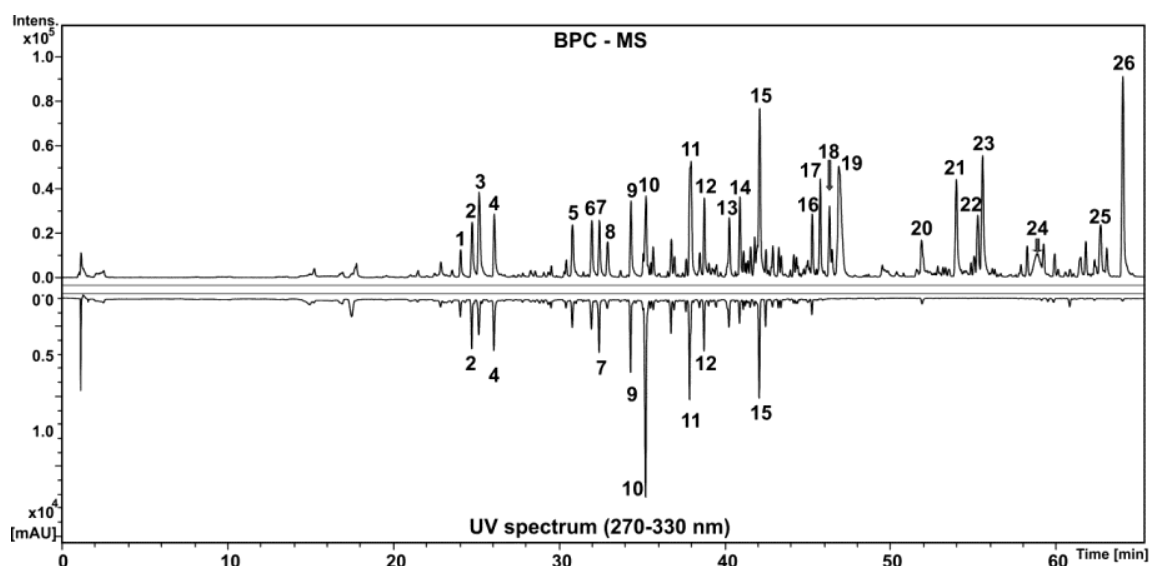
The content of phenolic compounds present in the *M. orbignyi* geopropolis extract was  $121 \pm 0.6$  mg expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of hydroalcoholic extract of geopropolis (HEGP), and the total flavonoid content was  $19.9 \pm 1.1$  mg expressed in mg of quercetin equivalent (QE)/g HEGP.

#### 2.1.2. Chemical Composition of HEGP by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array Detector and Mass Spectrometry (HPLC-DAD-MS)

A complex composition of HEGP was observed by HPLC-DAD-MS analyses (Figure 1). Several compounds exhibited UV absorption (Table 1, compounds 1–16) and thus conjugated chromophores, including flavanones, flavanonols and glycosylated phenolic acid derivatives. The identification of substances 3, 8, 10 and 13 was based on their UV spectra, which exhibited an absorption band centered at 290 nm, compatible with flavanones and flavanonols [17]. The molecular formulas were confirmed from deprotonated ions with accurate mass (Table 1). The structural characterizations were also based on fragment ions yielded from B-ring cleavages and the loss of CO, as well as the losses of radical methyl (15 u) for methylated compounds (Table 1). These fragmentation pathways are characteristic of flavonoids [18,19]. Thus, compounds 3, 8, 10 and 13 were identified as aromadendrin, naringenin, methyl aromadendrin and methyl naringenin, respectively. Flavonoids 3 and 8 were already identified from the geopropolis of *Melipona interrupta* and *Melipona seminigra* [20,21].

The glycosylated phenolic acid derivatives consisted of galloyl, cinnamoyl and coumaroyl substituents exhibiting two or three *O*-phenolic acids in the structures. The peaks of **1**, **2**, **4**, **5**, **6**, **9** and **12** showed a fragment ion at  $m/z$  169 ( $C_7H_5O_5$ )<sup>−</sup> in negative ion mode, confirming the presence of galloyl in the structures. In addition, compounds **4**, **6**, **9** and **12** also showed product ions at  $m/z$  313 ( $C_{13}H_{13}O_9$ )<sup>−</sup> and 163 ( $C_9H_7O_3$ )<sup>−</sup> related to the ions [M-H-coumaroyl-H<sub>2</sub>O]<sup>−</sup> and [M-H-galloyl-hexosyl]<sup>−</sup>, respectively. All this spectral information taken together allowed the putative identification of the compounds as *O*-coumaroyl *O*-galloyl-hexoside (**1**), *O*-coumaroyl *O*-galloyl-hexoside (**2**), di-*O*-galloyl *O*-coumaroyl-hexoside (**4**), *O*-cinnamoyl *O*-galloyl-hexoside (**5**), di-*O*-galloyl *O*-cinnamoyl-hexoside (**6**), di-*O*-coumaroyl-hexoside (**7**), di-*O*-coumaroyl *O*-galloyl-hexoside (**9**), *O*-cinnamoyl *O*-coumaroyl-hexoside (**10**) and *O*-cinnamoyl *O*-coumaroyl *O*-galloyl-hexoside (**12**). All the data were compatible with data previously published for these compounds [22].

The compounds at the end of the chromatogram did not absorb in the UV region and had a molecular constitution typical of terpene derivatives; they belong to the classes of sesquiterpenes (compound **19**), diterpenes (compounds **17**, **18** and **20**) and triterpenes (**21**, **22**, **23** and **25**), which are common in propolis and geopropolis [16,23–25]. Due to the huge variety in the skeleton arrangement of these classes and the lack of systematic information about fragmentation by ESI in the literature, these compounds were not completely identified.



**Figure 1.** Base peak chromatogram in negative ion mode and UV spectrum in the range of 270–300 nm of the *Melipona orbigny* geopropolis extract. Peaks 1 to 26 are identified in Table 1.

**Table 1.** Compounds identified from *Melipona orbignyi* geopropolis extract by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS).

Peak	Identification	Molecular Formula	RT (min)	UV (nm)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Error (ppm)	MS/MS m/z
1	O-coumaroyl O-galloyl-hexoside	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	24.1	289 and 309	477.1029	2.0	313 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> ) <sup>-</sup> , 271 (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup>
2	O-coumaroyl O-galloyl-hexoside	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	24.8	289 and 309	477.1022	3.4	313 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> ) <sup>-</sup> , 265 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup> , 235 (C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup> , 205 (C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup>
3	Aromadendrin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	25.2	289	287.0553	2.7	259 (C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup> , 177 (C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>
4	Di-O-galloyl Ocoumaroyl-hexoside	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> O <sub>16</sub>	26.1	286 and 308	629.1122	4.2	465 (C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub> ) <sup>-</sup> , 459 (C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> ) <sup>-</sup> , 313 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> ) <sup>-</sup> , 271 (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup>
5	O-cinnamoyl O-galloyl-hexoside	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	30.8	280	461.1085	1.0	211 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup> , 161 (C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
6	Di-O-galloyl O-cinnamoyl-hexoside	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub>	32	280	613.1186	2.1	465 (C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>13</sub> ) <sup>-</sup> , 313 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> ) <sup>-</sup> , 271 (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>-</sup> , 211 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup>
7	Di-O-coumaroyl-hexoside	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	32.4	299 and 311	471.1287	2.0	325 (C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>-</sup> , 307 (C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> ) <sup>-</sup> , 265 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup> , 163 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>-</sup> , 145 (C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
8	Naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	32.9	284	271.0614	0.9	-
9	Di-O-coumaroyl O-galloyl-hexoside	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	34.3	290 and 311	623.1405	0.2	459 (C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> ) <sup>-</sup> , 313 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> ) <sup>-</sup> , 271 (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>-</sup> , 211 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup> , 163 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>
10	Methyl aromadendrin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	35.3	290	301.0721	1.0	273 (C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup> , 240 (C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ) <sup>-</sup> , 179 (C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup> , 165 (C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>
11	O-Cinnamoyl-O-coumaroyl-hexoside	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	38	285 and 310	455.1359	2.5	163 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>-</sup> , 145 (C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
12	O-Cinnamoyl O-coumaroyl O-Galloyl-hexoside	C <sub>31</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	38.8	285 and 310	607.1462	0.8	461 (C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> ) <sup>-</sup> , 443 (C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> ) <sup>-</sup> , 313 (C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> ) <sup>-</sup> , 271 (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>8</sub> ) <sup>-</sup> , 211 (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup> , 169 (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sup>-</sup>
13	Methyl naringenin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	40.3	285	285.0777	2.9	165 (C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>
14	Unknown	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	40.9	293	421.1289	1.0	393 (C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup>
15	Unknown	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	42.1	295	421.1288	0.9	393 (C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>-</sup>
16	Unknown	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	45.3	288	405.1337	1.6	-
17	Diterpene	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	45.8	-	319.2260	3.4	-
18	Diterpene	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	46.3	-	319.2261	0.9	-
19	Sesquiterpene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	46.9	-	265.1454	3.3	-
20	Diterpene ester	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	51.9	280	361.2356	4.0	301 (C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>-</sup>
21	Triterpene	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	54	-	471.3459	4.4	-
22	Triterpene	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	55.3	-	471.3464	3.3	-
23	Triterpene	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	55.6	-	469.3305	3.9	-
24	Unknown	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	58.8	-	373.2736	3.3	329 (C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> O) <sup>-</sup>
25	Triterpene	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	62.7	-	467.3509	4.6	-
26	Unknown	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	64	-	371.2580	3.0	327 (C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> O) <sup>-</sup>

RT: retention time; -: non observed/detected means.

## 2.2. Antioxidant Activity

### 2.2.1. Capture of Free Radicals DPPH• and ABTS•+

HEGP inhibited 50% of the free radicals (IC<sub>50</sub>) at a concentration approximately six times higher than the ascorbic acid control, in both the DPPH• radical capture assay and the ABTS•+. In turn, it presented results similar to the reference antioxidant BHT in both trials (Table 2).

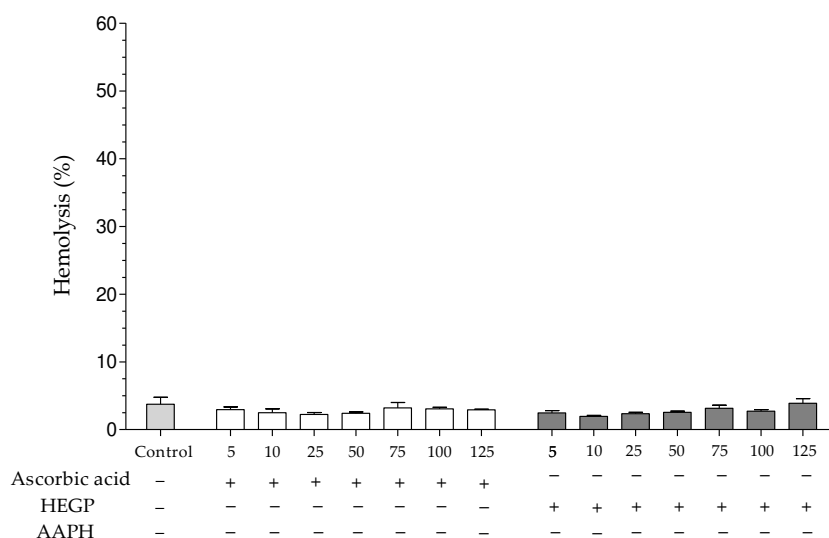
**Table 2.** IC<sub>50</sub> and maximum activity of reference antioxidants and treatments with HEGP.

Samples	DPPH•			ABTS•+		
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Maximum Activity		IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Maximum Activity	
		%	µg/mL		%	µg/mL
Ascorbic acid	3.2 ± 0.9	93 ± 2.1	10	1.8 ± 0.05	96 ± 2.4	5
BHT	20.3 ± 5.6	79 ± 2.6	50	8.1 ± 0.7	98 ± 0.2	50
HEGP	18.3 ± 2.8	95 ± 0.5	50	10.3 ± 0.5	98 ± 0.1	50

Values are means ± standard error of the mean (SEM).

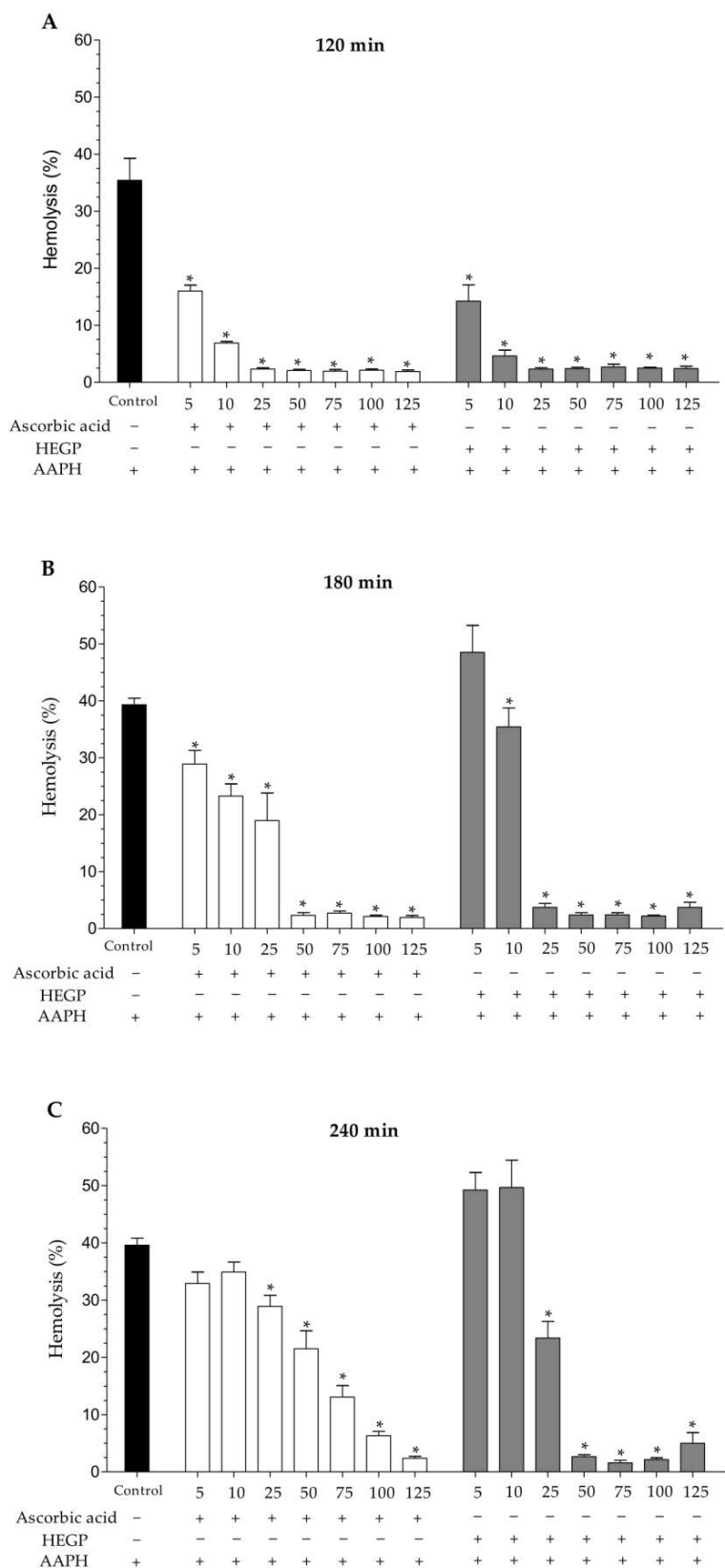
### 2.2.2. Hemolytic Activity and Inhibition of Oxidative Hemolysis

In this assay, the hemolytic activity of HEGP and its ability to protect erythrocytes against hemolysis induced by the oxidizing agent 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) were evaluated. When erythrocytes were incubated only with HEGP, in the absence of AAPH, no hemolysis was observed throughout the experimental period at the concentrations evaluated (Figure 2).



**Figure 2.** Hemolytic activity of ascorbic acid and HEGP (5–125 µg/mL), incubated with erythrocytes and 0.9% NaCl solution for 240 min, without the presence of AAPH. The control consists of erythrocytes incubated only with 0.9% NaCl solution. –: absence; +: presence.

In evaluating the extract's ability to protect erythrocytes against AAPH-induced hemolysis, HEGP was able to inhibit oxidative hemolysis for up to 240 min of incubation (Figure 3A–C). At concentrations of 25 and 50 µg/mL, the extract reduced hemolysis by 40.9% ± 8.0% and 93.2% ± 0.8%, respectively, after 240 min of incubation compared to the control incubated with the AAPH oxidizing agent alone. The HEGP presented higher anti-hemolytic action than the ascorbic acid control, which reduced hemolysis by 26.7% ± 4.9% (25 µg/mL) and 45.7% ± 8.0% (50 µg/mL) (Figure 3A–C).

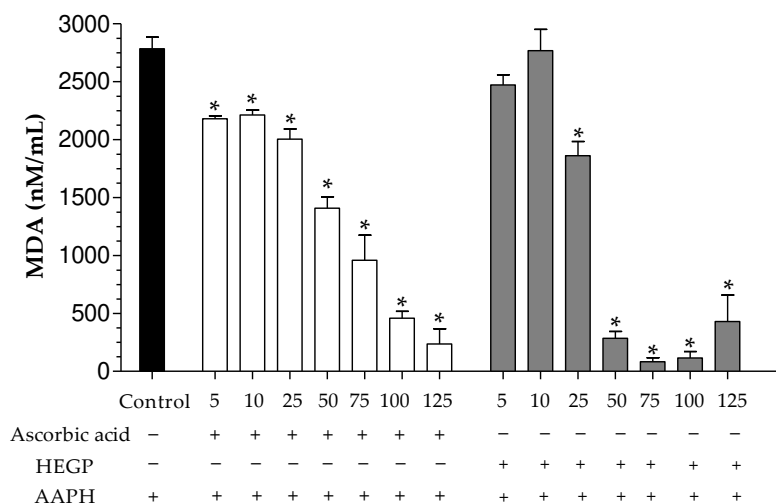


**Figure 3.** Anti-hemolytic activity of ascorbic acid and HEGP (5–125 µg/mL) incubated with erythrocytes and the oxidizing agent AAPH at: (A) 120 min; (B) 180 min; and (C) 240 min. The control consists of erythrocytes incubated only with AAPH solution (50 mM). \*  $p < 0.05$  when the treated groups were compared to the AAPH control group. -: absence; +: presence.



### 2.2.3. Dosage of Malondialdehyde

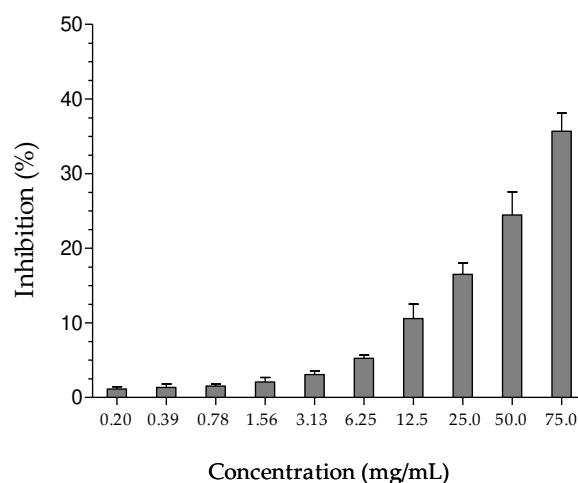
HEGP demonstrated the concentration-dependent reduction of MDA levels and presented better activity than the ascorbic acid control (Figure 4). At the concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the extract reduced MDA levels by  $89.75\% \pm 2.1\%$ , while the ascorbic acid control presented a reduction of only  $49.45\% \pm 3.5\%$  under the same conditions.



**Figure 4.** Concentration of malondialdehyde (nM/mL) in erythrocytes incubated with ascorbic acid and HEGP (5–125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 240 min. The control consists of erythrocytes incubated only with AAPH solution (50 mM). \*  $p < 0.05$  when the treated groups were compared to the AAPH control group. –: absence; +: presence.

### 2.3. Anti-Inflammatory Activity

The anti-inflammatory property of HEGP was assessed indirectly by its inhibition of the activity of the hyaluronidase enzyme. HEGP exhibited a concentration-dependent inhibition of enzyme activity, demonstrating inhibition of  $35.6\% \pm 2.4\%$  at the concentration of 75  $\text{mg}/\text{mL}$  (Figure 5).



**Figure 5.** Percentage inhibition of hyaluronidase enzyme activity by HEGP (0.2–75  $\text{mg}/\text{mL}$ ).

### 2.4. Antimutagenic Activity

HEGP was able to reduce the survival of *S. cerevisiae* D7 (ATCC 201137) by  $48.1\% \pm 1.1\%$  and  $60.3\% \pm 3.9\%$  at concentrations of 1.5 and 3.0  $\text{mg}/\text{mL}$ , respectively (Table 3). When yeasts were

incubated only with the mutagen EMS, there was an increase in the conversion of genes and in the quantity of mutant colonies. When incubated with HEGP in the presence of EMS, 14.6%  $\pm$  5.4% (1.5 mg/mL) and 27.5%  $\pm$  2.5% (3.0 mg/mL) reductions of gene conversion were observed. In addition, HEGP was able to reduce the amount of mutant colonies by 81.1%  $\pm$  1.1% (1.5 mg/mL) and 86.3%  $\pm$  0.4% (3.0 mg/mL) (Table 3).

**Table 3.** Effect of the hydroethanolic extract of geopropolis of *Melipona orbignyi* (HEGP) on the survival percentage of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* (diploid line D7 ATCC 201137), conversion of genes and mutant colonies.

Treatments		Survival (%)	Gene Conversion Colonies/10 <sup>5</sup>	Mutant Colonies/10 <sup>6</sup>
HEGP (mg/mL)	EMS (mg/mL)			
0.0	0.0	96.2 $\pm$ 2.35	0.77 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.01
0.0	5.0	85.2 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	51.3 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	391.3 $\pm$ 7.80 <sup>a</sup>
1.5	5.0	49.8 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup>	43.8 $\pm$ 2.79 <sup>b</sup>	73.7 $\pm$ 4.35 <sup>b</sup>
3.0	5.0	38.1 $\pm$ 3.79 <sup>c</sup>	37.2 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	53.2 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>

a, b, c: Means with different superscripts are significantly different for each attribute ( $p < 0.05$ ). Values are means  $\pm$  SEM. EMS, Ethyl methanesulfonate.

## 2.5. Antimicrobial Activity

HEGP demonstrated antimicrobial activity against all evaluated microorganisms. Gram-positive bacteria were more sensitive to the action of the extract than gram-negative bacteria. The inhibition observed against the evaluated microorganisms followed the sequence: *S. aureus* > *E. faecalis* > *E. coli* > *P. aeruginosa* > *C. neoformans* > *C. albicans*. HEGP also showed action against all microorganisms resistant to antimicrobial drugs, at concentrations similar to the reference strains. In addition to inhibitory activity, HEGP showed bactericidal and fungicidal activity against all microorganisms evaluated in this study, ranging from 8.50  $\pm$  0.28 mg/mL for *S. aureus* ATCC 6538<sup>TM</sup> to 36.1  $\pm$  0.50 mg/mL for amphotericin B-resistant *C. albicans* ESA 97 from biological fluid (Table 4).

**Table 4.** Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum fungicidal concentration (MFC) for HEGP from *M. orbignyi*.

Microorganisms	HEGP (mg/mL)		Gentamicin ( $\mu$ g/mL)
	MIC	MBC	MBC
<b>Gram-positive bacteria</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <sup>TM</sup>	6.13 $\pm$ 0.10	8.50 $\pm$ 0.28	2.00 $\pm$ 0.28
<i>S. aureus</i> ESA 175 Methicillin-resistant	6.42 $\pm$ 0.46	8.75 $\pm$ 0.62	2.67 $\pm$ 0.16
<i>S. aureus</i> ESA 159 Methicillin-resistant	6.92 $\pm$ 0.30	9.08 $\pm$ 0.58	2.50 $\pm$ 0.28
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 43300 <sup>TM</sup>	7.08 $\pm$ 0.58	10.5 $\pm$ 0.22	2.83 $\pm$ 0.30
<i>E. faecalis</i> ESA 201 Vancomycin-resistant	8.17 $\pm$ 0.44	10.9 $\pm$ 0.30	3.25 $\pm$ 0.14
<i>E. faecalis</i> ESA 361 Vancomycin-resistant	9.08 $\pm$ 0.08	11.2 $\pm$ 0.38	3.33 $\pm$ 0.16
<b>Gram-negative bacteria</b>			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29998 <sup>TM</sup>	10.5 $\pm$ 0.82	13.2 $\pm$ 0.52	4.58 $\pm$ 0.30
<i>E. coli</i> ESA 37 Cephalosporins-resistant	11.2 $\pm$ 0.32	13.8 $\pm$ 0.72	4.67 $\pm$ 0.22
<i>E. coli</i> ESA 54 Cephalosporins-resistant	11.5 $\pm$ 0.76	13.7 $\pm$ 0.90	4.92 $\pm$ 0.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 <sup>TM</sup>	12.9 $\pm$ 0.50	16.5 $\pm$ 0.30	5.00 $\pm$ 0.28
<i>P. aeruginosa</i> ESA 22 Imipenem-resistant	13.3 $\pm$ 0.60	17.0 $\pm$ 1.08	6.17 $\pm$ 0.16
<i>P. aeruginosa</i> ESA 23 Imipenem-resistant	13.5 $\pm$ 1.22	17.7 $\pm$ 1.02	6.50 $\pm$ 0.28
Microorganisms	HEGP (mg/mL)		Amphotericin-B ( $\mu$ g/mL)
Fungi	MIC	MFC	MFC
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32264 <sup>TM</sup>	19.3 $\pm$ 0.60	25.0 $\pm$ 1.04	0.13 $\pm$ 0.07
<i>C. neoformans</i> ESA 211 Amphotericin-B resistant	20.9 $\pm$ 0.79	26.0 $\pm$ 1.04	0.25 $\pm$ 0.14
<i>C. neoformans</i> ESA 105 Amphotericin-B resistant	21.4 $\pm$ 1.10	26.1 $\pm$ 1.58	0.38 $\pm$ 0.22
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <sup>TM</sup>	23.0 $\pm$ 1.06	34.0 $\pm$ 1.12	0.29 $\pm$ 0.16
<i>C. albicans</i> ESA 100 Amphotericin-B resistant	23.7 $\pm$ 1.29	35.0 $\pm$ 1.23	0.14 $\pm$ 0.08
<i>C. albicans</i> ESA 97 Amphotericin-B resistant	24.4 $\pm$ 1.83	36.1 $\pm$ 0.50	0.25 $\pm$ 0.14

Values are means  $\pm$  SEM.

### 3. Discussion

Geopropolis is a beehive material of complex composition, produced specifically by species of stingless bees of the Neotropical region and popularly known for its therapeutic properties. However, despite the great diversity of species of bees capable of generating this product, few studies have investigated and described its chemical and pharmacological properties.

In this study, when investigating the chemical composition of *M. orbignyi* HEGP, different compounds were identified from the ones found in geopropolis produced by other species of stingless bees, such as derivatives of glycosylated phenolic acids. The chemical composition of geopropolis from the *M. fasciculata* and *M. scutellaris* bees presented great differences from the composition observed in this work for the *M. orbignyi* species, including benzophenones, hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) and gallic and ellagic acid substances [7,26]. These differences in chemical composition suggest that *M. orbignyi* uses different plant sources of raw material to produce its geopropolis and/or that the production process significantly changes the composition of this material, as the genetic variability of bee species may influence this chemical composition [21]. Thus, these bioproducts from these stingless bees are unique, increasing the possibilities of identifying new bioactive compounds with pharmacological properties.

The total phenol content observed for HEGP was similar to the value obtained for the geopropolis of *M. scutellaris* ( $127 \pm 1.9$  mg GAE/g of extract) but higher than that for *M. fasciculata* ( $47.78 \pm 0.04$  mg GAE/g of extract) and that for *M. interrupt* and *M. seminigra* (419 to 4378  $\mu$ g GAE/g of extract) [7,11,21]. HEGP demonstrated potent antioxidant activity, being able to inhibit the free radicals DPPH $\bullet$  and ABTS $\bullet^+$ . The ethanolic extracts from the geopropolis of *M. interrupt* and *M. seminigra* exhibited almost 40 and 30 times higher total phenol content than those from HEGP ( $121 \pm 0.6$  mg GAE/g HEGP), but the antioxidant activities of DPPH $\bullet$  were  $10 \pm 0.5$  and  $26.3 \pm 3.9$   $\mu$ g/mL, respectively [21]. This result demonstrates the great antioxidant potency of the compounds of HEGP, even though it had a lower total phenol content, its antioxidant activity in DPPH $\bullet$  was  $18.3 \pm 2.8$   $\mu$ g/mL. In addition, as the chemical compositions of these geopropolis types and HEGP were different, especially with respect to the glycosylated derivatives of phenolic acids, this result demonstrates the importance of the structural characteristics of the constituents for this activity. The phenolic acids and flavonoids have hydroxyl groups in their rings [7], conferring the ability to stabilize unpaired electrons, which are typical of free radicals, thus acting as antioxidants [27].

In addition, HEGP presented in vitro antioxidant action in a human biological model by inhibiting lipid peroxidation in erythrocytes induced by an oxidizing agent. The extract showed better results than the standard antioxidant ascorbic acid, in terms of both anti-hemolytic action and the reduction of MDA levels, exhibiting a greater protective effect. This result can be attributed to the synergistic action of its compounds, including the different types of phenolic constituents, which offer excellent cellular protection against lipid peroxidation, acting as hydrogen donor agents, singlet oxygen reducers and superoxide radicals, antioxidant enzyme activators and metal chelators [27,28]. Some authors classify glycosylated derivatives of phenolic acids as a new type of hydrolysable tannin, similar to the ones described in plants such as *Balanophora harlandii* (Balanophoraceae) [29]. Among the phenolic compounds identified in the HEGP, tannins are described as acting as metal ion chelators [30] and have many hydroxyl groups in their phenolic rings, promoting the antioxidant activity of these compounds [31].

In addition, the terpenes constitute another class of compounds that display important antioxidant action. Triterpenes, one of the terpene subtypes identified in HEGP, are described as acting to capture free radicals, including superoxide anion and hydroxyl radical, and acting to protect against the lipid peroxidation process [32]. In addition, they are capable of modulating the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase [33]. Mechanisms similar to the ones described for sesquiterpenes [34], compounds also identified in HEGP.

The excess of free radicals in the body, without an efficient system to neutralize antioxidant agents, triggers the process of oxidative stress, which is responsible for damage to various cellular

biomolecules, such as nucleic acids, proteins and DNA [35]. This process is often related to the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, as well as cancer, diabetes, atherosclerosis [36] and chronic inflammation [37].

Inflammation is due to the action of several mediators that promote vascular and cellular events [38]. Inflammatory cells produce mediators, such as arachidonic acid metabolites, cytokines and chemokines, which aid in the production of reactive species [37]. Under normal physiological conditions, these oxidative and immunological processes aid in the response against stressors and pathogens [39]. However, the constant activation of these processes may lead to an increased risk of more serious diseases [37,39], such as diabetes [40] and obesity [41].

Natural products have been the objects of studies for the development of new anti-inflammatory drugs [6]. Among them, geopropolis has presented satisfactory results, such as the geopropolis extract of *Melipona scutellaris*, which promoted anti-inflammatory action through the inhibition of IL-1B and TNF- $\alpha$  [11] and decreased neutrophil migration in vivo [6]. In this study, HEGP demonstrated anti-inflammatory activity by inhibiting the enzyme hyaluronidase, reducing the degradation of hyaluronic acid. This polysaccharide performs important biological functions in the organism, such as cell proliferation, differentiation and tissue repair [42]. According to Pascoal et al. [43], the degradation of hyaluronic acid by the enzyme hyaluronidase can lead to bone loss, pain and inflammation.

Sesquiterpenes are among the compounds with anti-inflammatory potential reported in HEGP; they inhibit the pro-inflammatory transcription factors NF- $\kappa$ B and STAT3 [44]. In addition, phenolic compounds are described as anti-inflammatory agents because they modulate the expression of cytokines [45] and pro-inflammatory enzymes [46], such as nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 [47]. Of the phenolic compounds present in HEGP, aromadendrin exerts anti-inflammatory action by reducing the release of inflammatory factors MCP-1 and IL-8 in normal keratinocytes stimulated with interferon and histamine [48]. In addition, methyl aromadendrin (4'-methyl ether), a compound also present in HEGP and commonly found in green propolis produced by *Apis mellifera*, can reduce reactive species produced by neutrophil metabolism during the inflammatory process [49].

The reactive species generated during the process of chronic inflammation may contribute to the onset of mutagenesis and carcinogenesis [50]. In this way, the identification of compounds with antioxidant and antimutagenic properties may have great therapeutic importance. Substances with such activities have been found in many natural products, such as plants [51] and bee products [42].

In addition to antioxidant properties, *M. orbigny* HEGP demonstrated antimutagenic potential. In this study, the extract decreased the survival of yeast *S. cerevisiae*, which may be related to its fungicidal action. However, it was able to reduce the frequency of gene conversion and the amount of mutant colonies induced by the mutagenic agent EMS. Some studies suggest that the antimutagenic activity of *Apis mellifera* propolis is related to its antioxidant activity [52]. Phenolic compounds and terpenes are well known for their antioxidant properties as well as for acting as antimutagenic agents. In addition, their intake is related to the reduction of cancer risks [53]. Diterpenes are described as being capable of repairing DNA errors, also related to their anticancer activity [54].

Another biological activity presented by HEGP was antimicrobial action, including effectiveness against hospital strains resistant to antimicrobial drugs, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* gram-positive bacteria, cephalosporin-resistant *Escherichia coli* gram-negative bacteria, and amphotericin B-resistant *Candida albicans* yeast. Currently, the intensive use of antimicrobial drugs, both for therapeutic and prophylactic purposes, has resulted in the development of multiresistant strains, becoming a worldwide problem [55].

Antimicrobial resistance is a worrisome public health issue, especially in hospital environments [56]. The efficacy of antibiotics in the treatment of common infections has decreased in recent years [57], resulting in outbreaks of multiresistant strains [58]. Natural products are among the alternative agents against microbial action, considering the synergistic effects of their compounds [55].

Among the natural substances that present antimicrobial action, phenolic compounds act through the permeabilization of the microbial cytoplasmic membrane, inhibition of the synthesis of nucleic acids of gram-negative and gram-positive bacteria [59], inhibition of the synthesis of ATP and interruption of electron transport [60]. In addition to these mechanisms, flavonoids form complexes with proteins through hydrogen bonds, and their antimicrobial activity is related to the inhibition of microbial adhesins, enzymes and protein transport [28].

Among the flavonoids present in HEGP, flavanone naringenin promotes the inhibition of bacterial cytoplasmic membrane function, reducing its motility [59], even against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [28]. In addition, glycosylated phenolic derivatives are present in the extract and are described by some authors as new types of hydrolysable tannins, which exert antimicrobial action by breaking the permeability of the membrane of different microbial strains [61].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Preparation of the Hydroethanolic Extract of Geopropolis

Samples of geopropolis were obtained in Mato Grosso do Sul, Brazil (22°13'12" S–54°49'2" W). The hydroethanolic extract of geopropolis (HEGP) was prepared in the proportions of 240 mL of 70% ethanol for each 80 g of powder geopropolis. The solution was then kept shaking in a closed container for 24 h at room temperature. Subsequently, the extract was filtered, concentrated in a rotary evaporator (Gehaka, São Paulo, SP, Brazil) at 40 °C and lyophilized to obtain the dry extract. The yield of HEGP was 3.49%, and the final freeze-dried was stored at –20 °C protected from light.

### 4.2. Determination of Phenolic Compounds and Flavonoids

#### 4.2.1. Phenolic Compounds

The concentration of phenolic compounds present in HEGP was determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method. For this purpose, 0.5 mL of HEGP (100 µg/mL) was added to 2.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent and 2.0 mL of 14% sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) solution. Absorbance reading was performed at 760 nm after 2 h of incubation at room temperature in the dark. To produce the calibration curve, gallic acid (0.4–16 µg/mL) was used as a standard. The average of three readings was used to determine the content of phenolic compounds expressed in mg of GAE/g of HEGP.

#### 4.2.2. Total Flavonoids

To verify the concentration of flavonoids present in the extract, 0.5 mL of HEGP (100 µg/mL) was mixed with 4.5 mL of methanolic solution of aluminum chloride hexahydrate 2% (AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. After this period, absorbance reading was performed at 415 nm. To produce the calibration curve, quercetin (0.4–16 µg/mL) was used as a standard. The average of three readings was used to determine the flavonoid content expressed in mg of QE/g of HEGP.

### 4.3. HPLC-DAD-MS Analyses

The HEGP (1 mg/mL) was injected into an ultra-fast liquid chromatograph UFLC (LC-20AD, Shimadzu) coupled to a diode array detector operating at 240–800 nm and a mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) and the analyzers quadrupole–Time-of-Flight (QTOF) (micrOTOF-Q III, Bruker Daltonics) monitoring between *m/z* 120 and 1200 in negative and positive ion mode, equipped with a C-18 column (Kinetex, 150 × 2.2 mm id, 2.6 µm) and using an oven temperature of 50 °C. The mobile phase was deionized water (A) and acetonitrile (B), both with 0.1% formic acid (*v/v*), under the following gradient profile: 0–8 min 3% B, 8–30 min 3–25% B, and 30–60 min 25–80% B, followed by

washing and reconditioning of the column (8 min). The flow rate was 0.3 mL/min, and the injection volume was 1  $\mu$ L.

#### 4.4. Antioxidant Activities

##### 4.4.1. DPPH $\bullet$ Free Radical Capture Activity

For this experiment, 200  $\mu$ L of the HEGP was mixed with 1800  $\mu$ L of 0.11 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH $\bullet$ ) radical solution in 80% ethanol. The final concentrations of the extract ranged from 0.1 to 200  $\mu$ g/mL. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance was measured at 517 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as reference antioxidants. As control, 200  $\mu$ L of the solvent (80% ethanol) was incubated with 1800  $\mu$ L of the DPPH $\bullet$  solution. Three independent experiments were performed in triplicate. The percent inhibition was calculated from the control using the following equation:

$$\text{Capture activity of DPPH}\bullet (\%) = (1 - \text{Abs}_{\text{sample}}/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100 \quad (1)$$

##### 4.4.2. ABTS $\bullet^{+}$ Free Radical Capture Activity

The 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS $\bullet^{+}$ ) radical was prepared from a mixture of 5 mL of ABTS (7 mM) and 88  $\mu$ L of potassium persulfate (140 mM) and incubated for 12–16 h at room temperature in the dark. After this period, the ABTS $\bullet^{+}$  radical solution was diluted in absolute ethanol until an absorbance of  $0.70 \pm 0.05$  at 734 nm was obtained in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Then, 20  $\mu$ L of HEGP was added to 1980  $\mu$ L of the ABTS $\bullet^{+}$  radical. The final concentrations of the extract ranged from 0.1 to 200  $\mu$ g/mL. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 6 min. The absorbance was evaluated at 734 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Ascorbic acid and BHT were used as positive controls. As control, 20  $\mu$ L of the solvent (80% ethanol) was incubated with 1980  $\mu$ L of the ABTS $\bullet^{+}$  radical. Two independent experiments were performed in triplicate. The percentage of ABTS $\bullet^{+}$  radical inhibition was calculated according to the following equation:

$$\text{Inhibition of the radical ABTS}\bullet^{+} (\%) = ((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100 \quad (2)$$

##### 4.4.3. Antioxidant Assays in Human Erythrocytes

###### Preparation of the Erythrocyte Suspensions

Human erythrocyte assays were performed after receiving approval from the Research Ethics Committee (Comit  de  tica em Pesquisa, CEP) of the University Center of the Grande Dourados (Centro Universit rio da Grande Dourados, UNIGRAN), Brazil (CEP process number 123/12). Peripheral blood from healthy donors was collected and placed in tubes containing sodium citrate. The tubes were then centrifuged at  $700 \times g$  for 10 min, and the blood plasma and leukocyte layer were discarded. The erythrocytes were washed three times with 0.9% sodium chloride (NaCl) solution, and then, a 10% erythrocyte suspension in 0.9% NaCl solution was prepared for the inhibition assays of oxidative hemolysis and malondialdehyde, determined using the method described by Campos et al. [62].

###### Inhibition of Oxidative Hemolysis

The protective effect of HEGP was evaluated according to the method described by Campos et al. [55]. Erythrocytes were pre-incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min in the presence of different concentrations of HEGP (5–125  $\mu$ g/mL). After this period, the samples received only 0.9% NaCl solution to investigate the hemolytic action of the extract or 50 mM AAPH to evaluate its anti-hemolytic activity. As a negative control, erythrocytes were incubated with ethanol at a final concentration of 1%,

and ascorbic acid was used as a positive control at the same concentrations as HEGP. The treatments were incubated at 37 °C with periodic homogenization. The hemolysis content was determined after 120, 180 and 240 min of incubation. Samples were centrifuged at 400 × g/10 min, and the supernatant was transferred to tubes containing 0.9% NaCl solution to perform the reading at 540 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). As a control of total hemolysis, human erythrocytes were incubated with distilled water. Three independent experiments were performed in duplicate. The percentage of hemolysis was calculated according to the following equation:

$$\text{Hemolysis (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{total hemolysis}}) \times 100 \quad (3)$$

#### Dosage of Malondialdehyde (MDA)

The ability of HEGP to inhibit the lipid peroxidation process was investigated in human erythrocytes incubated with the oxidizing agent AAPH, and the MDA concentration was determined as described by Campos et al. [55]. For this experiment, the erythrocytes were pre-incubated at 37 °C for 30 min with different concentrations of HEGP (5–125 µg/mL). Erythrocytes incubated with ethanol at the final concentration of 1% were used as a negative control, and ascorbic acid was used as a positive control at the same concentrations as HEGP. Then, AAPH solution (50 mM) was added and the samples incubated at 37 °C for 4 hours with periodic homogenization. After this time, the samples were centrifuged at 700 × g/10 min, and 0.5 mL of the supernatant was mixed with 1 mL of 10 nmol thiobarbituric acid (TBA) dissolved in 75 mM potassium phosphate monobasic buffer at pH 2.5. As a standard control, 0.5 mL of MDA solution (20 µM) was incubated with 1 mL of TBA. Samples were maintained at 96 °C for 45 min. After cooling the solution, 4 mL of *n*-butyl alcohol was added, followed by centrifugation at 1600 × g/5 min. The supernatant from the samples was analyzed at 532 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK). Two independent experiments were performed in duplicate. The MDA levels of the samples were expressed in nmol/mL, obtained by the following formula:

$$\text{MDA (nmol/mL)} = \text{ABS}_{\text{sample}} \times \left( \frac{20 \times 220.32}{\text{ABS}_{\text{standardMDA}}} \right) \quad (4)$$

#### 4.5. Anti-Inflammatory Activity—Hyaluronidase Assay

Inhibition of the activity of the hyaluronidase enzyme was determined using the method described by Silva et al. [63]. The reaction mixture consisted of 50 µL of HEGP (0.2–75 mg/mL) and 50 µL of the enzyme hyaluronidase (350 units) (type IV-S: bovine tests, Sigma, St. Louis, MO, USA) incubated at 37 °C for 20 min. Then, 1.2 µL of calcium chloride solution (2.5 × 10<sup>3</sup> M) was added to activate the enzyme and kept at 37 °C for 20 min. After this period, 0.5 mL of hyaluronic acid sodium salt substrate (0.1 M) was added and the solution incubated at 37 °C for 40 min. Subsequently, 0.1 mL of potassium tetraborate (0.8 M) was added and the solution incubated at 100 °C for 3 min. The solution was then cooled, and 3 mL of *p*-dimethylaminobenzaldehyde was added, followed by incubation at 37 °C for 20 min. Finally, the absorbance was measured at 585 nm in a T 70 UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK), using distilled water as a control. The experiments were performed in triplicate. The percentage of hyaluronidase enzyme inhibition was calculated according to the following equation:

$$\text{Inhibition of the enzyme hyaluronidase (\%)} = ((\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100 \quad (5)$$

#### 4.6. Antimutagenic Activity

To investigate the antimutagenic potential of HEGP, strains of *Saccharomyces cerevisiae* D7 diploid (American Type Culture Collection, ATCC 201137) were used, according to the method described by Pascoal et al. [43]. The *S. cerevisiae* colonies were evaluated for the frequency of spontaneous gene

conversions at the tryptophan locus and reverse mutations at the isoleucine locus, before experimental use. Culture cells with low spontaneous gene conversion and low reverse mutation frequency were cultured in liquid medium at 28 °C until they reached the stationary growth stage. They then underwent sedimentation and were resuspended in sterile potassium phosphate buffer (0.1 M), pH 7.4, until a final value of  $2 \times 10^8$  cells/mL was obtained. The mutagenic agent ethyl methanesulfonate (EMS) (5 mg/mL) was added together with HEGP, evaluated at concentrations of 1.5 and 3.0 mg/mL. The mixture was incubated with stirring for 2 h at 37 °C. After this period, the cells were plated in complete and selective medium to determine yeast survival, tryptophan converters and isoleucine reversers. The experiments were performed in triplicate.

#### 4.7. Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of HEGP was investigated in microorganisms collected from biological fluids at the Hospital Center and identified in the Microbiology Laboratory of Escola Superior Agrária (ESA) de Bragança, Portugal. Reference strains were obtained from the authorized ATCC distributor (LGC Standards SLU, Barcelona, Spain). The microorganisms used were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538<sup>TM</sup>, methicillin-resistant *S. aureus* ESA 175, methicillin-resistant *S. aureus* ESA 159, *Enterococcus faecalis* ATCC 43300<sup>TM</sup>, vancomycin-resistant *E. faecalis* ESA 201, vancomycin-resistant *E. faecalis* ESA 361, *Escherichia coli* ATCC 29998<sup>TM</sup>, cephalosporin-resistant *E. coli* ESA 37, cephalosporin-resistant *E. coli* ESA 54, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, imipenem-resistant *P. aeruginosa* ESA 22, imipenem-resistant *P. aeruginosa* ESA 23, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, amphotericin B-resistant *C. neoformans* ESA 211, amphotericin B-resistant *C. neoformans* ESA 105, *Candida albicans* ATCC 10231<sup>TM</sup>, amphotericin B-resistant *C. albicans* ESA 100 and amphotericin B-resistant *C. albicans* ESA 97.

The microorganisms were stored in Muller-Hinton medium supplemented with 20% glycerol at 70 °C prior to experimental use. The inoculum was then prepared by dilution of the cell mass in 0.85% NaCl solution, adjusted to 0.5 on the MacFarland scale, as confirmed by spectrophotometric reading at 580 nm for bacteria and 640 nm for yeast. Antimicrobial assays were performed as described by Silva et al. [63] using Nutrient Broth (NB) for bacteria or Yeasts Peptone Dextrose (YPD) for yeast in microplates (96 wells). The HEGP was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and transferred to the first well, followed by serial dilution. The inoculum was added to all wells ( $10^4$  Colony Forming Units (CFU)/mL), and the plates were incubated at 37 °C for 24 h for bacteria and at 25 °C for 48 h for yeast. Gentamicin and amphotericin B were used as antibacterial and antifungal controls, respectively. A negative control (medium only), a positive control (inoculated medium) and a DMSO control (DMSO with inoculated medium) were performed in each experiment. After the incubation period, the antimicrobial activity was detected by the addition of 20 µL of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchloride (TTC) solution (5 mg/mL). The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of HEGP that visibly inhibited the growth of microorganisms, as indicated by TTC staining, which marks viable cells.

To determine the minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC), 20 µL of the last well where growth was observed and from each well where no color changes were seen was seeded in NB or YPD and incubated for 24 h at 37 °C for bacteria growth and 48 h for yeast growth. The lowest concentration that did not result in growth (<10 CFU/plate) after this subculture process was considered the MBC or MFC. The experiments were performed in triplicate, and the results were expressed in mg/mL.

#### 4.8. Statistical Analyses

The data are shown as the mean  $\pm$  SEM and were analyzed for statistically significant differences between groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for the comparison of more than two groups using the Prism 5 GraphPad Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results were considered significant when  $p < 0.05$ .



## 5. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates the presence of bioactive compounds in the hydroethanolic extract of *M. orbignyi* geopropolis, as well as its antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from Foundation to Support to Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and PRODER, (24.073 – Â, Portugal).

**Author Contributions:** Helder Freitas dos Santos, Jaqueline Ferreira Campos, Cintia Miranda dos Santos, José Benedito Perrella Balestieri, Leticia Miranda Estevinho, Denise Brentan Silva, Carlos Alexandre Carollo, Kely de Picoli Souza and Edson Lucas dos Santos conceived and designed the experiments; Helder Freitas dos Santos, Jaqueline Ferreira Campos, Cintia Miranda dos Santos, Denise Brentan Silva, Carlos Alexandre Carollo, Leticia Miranda Estevinho, Kely de Picoli Souza and Edson Lucas dos Santos performed the experiments; Helder Freitas dos Santos, Jaqueline Ferreira Campos, Cintia Miranda dos Santos, José Benedito Perrella Balestieri, Leticia Miranda Estevinho, Denise Brentan Silva, Carlos Alexandre Carollo, Kely de Picoli Souza and Edson Lucas dos Santos analyzed the data; Carlos Alexandre Carollo, Kely de Picoli Souza, Leticia Miranda Estevinho and Edson Lucas dos Santos contributed reagents/materials/analysis tools; and Helder Freitas dos Santos, Jaqueline Ferreira Campos, Cintia Miranda dos Santos, José Benedito Perrella Balestieri, Leticia Miranda Estevinho, Denise Brentan Silva, Carlos Alexandre Carollo, Kely de Picoli Souza and Edson Lucas dos Santos wrote the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AAPH	2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ABTS* <sup>+</sup>	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butylated hydroxytoluene
DPPH <sup>•</sup>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EMS	Ethyl methanesulfonate
ESA	Escola Superior Agrária
GAE	Gallic acid equivalents
HEGP	Hydroalcoholic extract of geopropolis
MDA	Malondialdehyde
MBC	Minimum bactericidal concentration
MIC	Minimum inhibitory concentration
MFC	Minimum fungicidal concentration
<i>M. orbignyi</i>	<i>Melipona orbignyi</i>
NaCl	Sodium chloride
QE	Quercetin equivalents
SEM	Standard error of the mean
TBA	Thiobarbituric acid
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-Tetrazoliumchloride

## References

- Freitas, M.O.; Ponte, F.A.; Lima, M.A.S.; Silveira, E.R. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 532–535. [[CrossRef](#)]
- Bartolomeu, A.R.; Frión-Herrera, Y.; da Silva, L.M.; Romagnoli, G.G.; de Oliveira, D.E.; Sforcin, J.M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *81*, 48–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Souza, R.C.; Paiva, L.K.O.Y.J.; Aguiar, L.; Plácido, F.; Oliveira, M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazon.* **2004**, *34*, 1–4. [[CrossRef](#)]
- Araújo, M.J.A.M.; Búfalo, M.C.; Conti, B.; Junior, A.F.; Trusheva, B.; Bankova, V.; Sforcin, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, *4*, 12–20. [[CrossRef](#)]

5. Cunha, M.G.; Franchin, M.; Galvão, L.C.D.C.; Bueno-Silva, B.; Ikegaki, M.; Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 256287. [CrossRef] [PubMed]
6. Franchin, M.; Cunha, M.G.; Denny, C.; Napimoga, M.H.; Cunha, T.M.; Bueno-Silva, B.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P.L. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 907041. [CrossRef] [PubMed]
7. Dutra, R.P.; Abreu, B.V.B.; Cunha, M.S.; Batista, M.C.A.; Torres, L.M.B.; Nascimento, F.R.F.; Ribeiro, M.N.S.; Guerra, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2549–2557. [CrossRef] [PubMed]
8. Moure's bee catalogue. Available online: <http://moure.cria.org.br> (accessed on 11 November 2016).
9. Nogueira-Neto, P. Arquitetura dos ninhos. In *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*; Urna Edição Nogueirapis: Nogueirapis São Paulo, Brazil, 1997; pp. 47–60.
10. Souza, S.A.; Camara, C.A.; Silva, E.M.S.; Silva, T.M.S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 801383.
11. Franchin, M.; Cunha, M.G.; Denny, C.; Napimoga, M.H.; Cunha, T.M.; Koo, H.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P.L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 709–715. [CrossRef] [PubMed]
12. Ribeiro-Junior, J.A.; Franchin, M.; Cavallini, M.E.; Denny, C.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P.L. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 459846. [CrossRef] [PubMed]
13. Coelho, G.R.; Mendonça, R.Z.; Vilar, K.D.S.; Figueiredo, C.A.; Badari, J.C.; Taniwaki, N.; Namiyama, G.; Oliveira, M.I.; Curti, S.P.; Silva, P.E.; et al. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antihherpes simplex virus (HSV-1). *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 296086. [CrossRef] [PubMed]
14. Dutra, R.P.; Nogueira, A.M.C.; Marques, R.R.D.O.; Costa, M.C.P.; Ribeiro, M.N.S. Pharmacognostic evaluation of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith from Baixada Maranhense, Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 557–562. [CrossRef]
15. Chemical Abstract Service database. Available online: <https://scifinder.cas.org> (accessed on 15 January 2017).
16. Campos, J.F.; Santos, U.P.; Macorini, L.F.B.; Melo, A.M.M.F.; Balestieri, J.B.P.; Gamero, E.J.P.; Cardoso, C.A.L.; Souza, K.P.; Santos, E.L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *65*, 374–380. [CrossRef] [PubMed]
17. Markham, K.R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In *Techniques of Flavonoid Identification*; Academic Press: London, UK, 1982; pp. 36–51.
18. Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1–15. [CrossRef] [PubMed]
19. Justino, G.C.; Borges, C.M.; Florencio, M.H. Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: A re-examination. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 237–248. [CrossRef] [PubMed]
20. Bankova, V.; Christov, R.; Marcucci, C.; Popov, S. Constituents of Brazilian geopropolis. *Z. Naturforsch. C* **1998**, *53*, 402–406.
21. Costa da Silva, E.C.; Muniz, M.P.; Nunomura, R.C.S.; Nunomura, S.M.; Zilse, G.A.C. Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of Amazonian stingless bees. *Quim. Nov.* **2013**, *36*, 628–633.
22. Wang, J.B.; Qin, Y.; Kong, W.J.; Wang, Z.W.; Zeng, L.N.; Fang, F.; Jin, C.; Zhao, Y.L.; Xiao, X.H. Identification of the antidiarrhoeal components in official rhubarb using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1737–1743. [CrossRef]
23. Walker, P.; Crane, E. Constituents of propolis. *Apidologie* **1987**, *18*, 327–334. [CrossRef]
24. Patricio, E.F.L.R.A.; Cruz-Lopez, L.; Maile, R.; Tentschert, J.; Jones, G.R.; Morgan, E.D. The propolis of stingless bees: Terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. *J. Insect Physiol.* **2002**, *48*, 249–254. [CrossRef]
25. Marquez Hernandez, I.; Cuesta-Rubio, O.; Campo Fernandez, M.; Perez, A.R.; Porto, R.M.O.; Piccinelli, A.L.; Rastrelli, L. Studies on the constituents of yellow cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4725–4730. [CrossRef] [PubMed]

26. Cunha, M.G.; Rosalen, P.L.; Franchin, M.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Ransom, T.; Beutler, J.A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* **2016**, *82*, 190–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Carocho, M.; Ferreira, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 162750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wang, W.; Zeng, S.F.; Yang, C.R.; Zhang, Y.J. A new hydrolyzable tannin from *Balanophora harlandii* with radical-scavenging activity by scavenging activity. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1817–1822. [[CrossRef](#)]
30. Karamać, M. Chelation of Cu (II), Zn (II), and Fe (II) by tannin constituents of selected edible nuts. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 5485–5497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Figueroa-Espinoza, M.C.; Zafimahova, A.; Alvarado, P.G.M.; Dubreucq, E.; Poncet-Legrand, C. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. *Food Chem.* **2015**, *178*, 38–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ramachandran, S.; Prasad, N.R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *176*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ramachandran, S.; Prasad, R.; Pugalendi, K.V.; Menon, V.P. Modulation of UVB-induced oxidative stress by ursolic acid in human blood lymphocytes. *Asian J. Biochem.* **2008**, *3*, 11–18.
34. Shoaib, M.; Shah, I.; Ali, N.; Adhikari, A.; Tahir, M.N.; Shah, S.W.; Ishtiaq, S.; Khan, J.; Khan, S.; Umer, M.N. Sesquiterpene lactone! A promising antioxidant, anticancer and moderate antinociceptive agent from *Artemisia macrocephala* Jacquem. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 118–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mackay, C.R. Moving targets: Cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 988–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Rawdin, B.J.; Mellon, S.H.; Dhabhar, F.S.; Epel, E.S.; Puterman, E.; Su, Y.; Burke, H.M.; Reus, V.I.; Rosser, R.; Hamilton, S.P.; et al. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav. Immun.* **2013**, *31*, 143–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Agil, A.; Reiter, R.J.; Jiménez-Aranda, A.; Ibán-Arias, R.; Navarro-Alarcón, M.; Marchal, J.A.; Adem, A.; Fernández-Vázquez, G. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* **2013**, *54*, 381–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Fernández-Sánchez, A.; Madrigal-Santillán, E.; Bautista, M.; Esquivel-Soto, J.; Morales-González, Á.; Esquivel-Chirino, C.; Durante-Montiel, I.; Sánchez-Rivera, G.; Valadez-Veja, C.; Morales-González, J.A. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3117–3132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kogan, G.; Šoltés, L.; Stern, R.; Gemeiner, P. Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 17–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *63*, 233–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Formisano, C.; Sanna, C.; Ballero, M.; Chianese, G.; Sirignano, C.; Rigano, D.; Millán, E.; Muñoz, E.; Tagliatalata-Scafati, O. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Onopordum illyricum* L. (Asteraceae), an Italian medicinal plant. *Fitoterapia* **2017**, *116*, 61–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Terra, X.; Montagut, G.; Bustos, M.; Llopiz, N.; Ardèvol, A.; Bladé, C.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J.; Arola, L.; et al. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 210–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* **2005**, *579*, 200–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Costa, G.; Francisco, V.; Lopes, M.C.; Cruz, M.T.; Batista, M.T. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: Application for new anti-inflammatory drugs discovery. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2876–2900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Venditti, A.; Serrilli, A.M.; Rizza, L.; Frasca, G.; Cardile, V.; Bonina, F.P.; Bianco, A. Aromadendrine, a new component of the flavonoid pattern of *Olea europaea* L. and its anti-inflammatory activity. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *27*, 1–10.
49. Simões-Ambrosio, L.M.; Gregório, L.E.; Sousa, J.P.; Figueiredo-Rinhel, A.S.; Azzolini, A.E.; Bastos, J.K.; Lucisano-Valim, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 1102–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Choudhari, S.K.; Chaudhary, M.; Gadbail, A.R.; Sharma, A.; Tekade, S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncol.* **2014**, *50*, 10–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Cano-Lamadrid, M.; Marhuenda-Egea, F.C.; Hernández, F.; Rosas-Burgos, E.C.; Burgos-Hernández, A.; Carbonell-Barrachina, A.A. Biological activity of conventional and organic pomegranate juices: Antioxidant and antimutagenic potential. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2016**, *71*, 375–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Fernandes, F.H.; Guterres, Z.R.; Garcez, W.S.; Lopes, S.M.; Corsino, J.; Garcez, F.R. Assessment of the (anti) genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 20–26. [[CrossRef](#)]
53. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2157–2184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Islam, M.T.; Mata, A.M.O.F.; Aguiar, R.P.S.; Paz, M.F.C.J.; Alencar, M.V.O.B.; Ferreira, P.M.P.; Melo-Cavalcante, A.A.C. Therapeutic potential of essential oils focusing on diterpenes. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 1420–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Campos, J.F.; Santos, U.P.; Rocha, P.S.; Damião, M.J.; Balestieri, J.B.P.; Cardoso, C.A.L.; Gamero, E.J.P.; Estevinho, L.M.; Picoli Souza, K.; Santos, E.L. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 296186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M.J.; Simoes, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2013**, *19*, 256–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.; Wertheim, H.F.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance—The need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 1057–1098. [[CrossRef](#)]
58. Hawkey, P.M.; Jones, A.M. The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, i3–i10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2005**, *26*, 343–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Vattem, D.A.; Lin, Y.T.; Labbe, R.G.; Shetty, K. Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity against select food borne pathogens. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2004**, *5*, 81–91. [[CrossRef](#)]
61. Ekambaram, S.P.; Perumal, S.S.; Balakrishnan, A. Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 1035–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Campos, J.F.; Castro, D.T.H.; Damião, M.J.; Torquato, H.F.V.; Paredes-Gamero, E.J.; Carollo, C.A.; Estevinho, L.M.; Picoli Souza, K.; Santos, E.L. The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Silva, J.C.; Rodrigues, S.; Feás, X.; Estevinho, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 1790–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## **5. CONCLUSÕES GERAIS**

Este estudo demonstra que o geoprópolis da abelha sem ferrão *M. orbignyi* é uma fonte natural rica em diversos compostos bioativos que conferem suas propriedades farmacológicas.

O extrato hidroetanólico de geoprópolis demonstrou potente ação antioxidante, além do potencial anti-inflamatório e antimutagênico, ambas propriedades terapêuticas importantes no auxílio a prevenção e tratamento de diversas doenças.

A atividade antimicrobiana deste produto natural, revela novas possibilidades no desenvolvimento de medicamentos para o combate de infecções ocasionadas por micro-organismos resistentes.