UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

NAIR SILVA MACÊDO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DE EFLUXO: ESTUDO DOS BIOPRODUTOS DE *Tetragonisca angustula* E DO ÁCIDO *trans*-CINÂMICO

CRATO-CE

2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

NAIR SILVA MACÊDO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DE EFLUXO: ESTUDO DOS BIOPRODUTOS DE *Tetragonisca angustula* E DO ÁCIDO *trans*-CINÂMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Coorientadora: Prof.ª Dra. Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino

CRATO-CE

2026

Macêdo, Nair Silva

M141c CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DE EFLUXO: ESTUDO DOS BIOPRODUTOS DE Tetragonisca angustula E DO ÁCIDO trans-CINÂMICO / Nair Silva Macêdo. Crato-Ce, 2026.

175p. il.

Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha

Coorientador(a): Prof.ª Dr.ª Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino

1.Metabólitos secundários, 2.Resistência microbiana, 3.Meliponíneos, 4.Ácidos fenólicos, 5.Efluxo ativo; I.Título.

CDD: 572

NAIR SILVA MACÊDO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DE EFLUXO: ESTUDO DOS BIOPRODUTOS DE *Tetragonisca angustula* E DO ÁCIDO *trans*-CINÂMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Química Biológica.

Tese defendida e aprovada em: 25/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha
Orientador - Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof.ª Dra. Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino
Coorientadora – Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Membro Titular Interno – Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof.ª. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

Membro Titular Interno – Universidade Regional do Cariri - URCA

Profª. Drª. Márcia Vanusa da Silva

Membro Titular Externo - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Valker Araujo Feitosa

Membro Titular Externo - Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior

Membro Suplente Externo - Universidade Federal do Cariri – UFCA

Profª. Drª. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Membro Suplente Interno – Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico este trabalho à minha família, pelo amor, apoio e incentivo incondicionais ao longo de toda a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Regional do Cariri - URCA pelo apoio e pela estrutura disponibilizada, que foram fundamentais para o desenvolvimento das atividades ao longo do curso de doutorado. Agradeço à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro, mantendo a bolsa que foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica pela disponibilidade dos professores, que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica, e pelo apoio essencial nas atividades realizadas ao longo do curso.

Meus agradecimentos também se estendem ao Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA), em nome do professor Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha, pelo suporte e contribuição indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também a toda a equipe do Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos (LABSEMA) em nome de Zildene de Sousa, Cristina Rodrigues, Débora Menezes, Suieny Rodrigues, Henrique Bezerra, Josivânia Teixeira e Thais Ferreira que contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento das atividades.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), em nome do professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pela disponibilização da estrutura essencial para o desenvolvimento dos ensaios microbiológicos deste trabalho. Agradeço também ao Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri, em nome da professora Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga, pela disponibilização da estrutura necessária para a realização dos ensaios antifúngicos deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA), em nome do professor Dr. Galberto Martins e ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Análises da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pela disponibilização da estrutura indispensável para a realização da caracterização química dos extratos avaliados neste estudo. Agradeço ao professor Dr. Hélcio Silva dos Santos, da Universidade Vale do Acaraú, pela realização dos ensaios de docagem molecular que contribuíram de forma significativa para este trabalho.

Introdução Geral **Página**

Figura 1. Organização da estrutura da Tese 26

Figura 2. Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência bacteriana a antibióticos 39

Figura 3. Indivíduos de *Tetragonisca angustula* localizado na entrada do ninho 51

Figura 4. Estrutura química do ácido *trans*-cinâmico 52

CAPÍTULO I: Visitação floral, atividades fitoquímicas e biológicas de bioprodutos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): uma revisão

Figura 1: Principais famílias botânicas com espécies visitadas por *Tetragonisca angustula* encontradas em estudos da literatura 57

Figura 2: Estruturas químicas dos principais compostos encontrados em produtos derivados de abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* 63

Figura 3: Diagrama de fluxo PRISMA com representação do processo de triagem dos estudos identificados e selecionados na revisão. 80

Tabela 1: Composição química do mel, própolis, geoprópolis e pólen fermentado ("Saburá") de *Tetragonisca angustula* relatada na literatura 61

Tabela 2: Bioatividades descritas para o mel, própolis, geoprópolis e saburá da espécie *Tetragonisca angustula* 69

CAPÍTULO II: Caracterização química, atividade antibacteriana e antifúngica dos potes de mel e dos potes de pólen obtidos da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

Figura 1. Cromatograma do pico de base LC-Q-TOF-MS do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa 96

Figura 2. Cromatograma do pico de base LC-Q-TOF-MS do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa 97

Figura 3. Perfil CLAE dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides 100

Figura 4. Perfil CLAE do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* – EEPMTa com a presença de naringenina (pico 5) e apigenina (pico 7) 101

Figura 5. Perfil CLAE do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa com a presença de ácido cinâmico (pico 4) e apigenina (pico 7) 102

Figura 6. Avaliação da potenciação de antibióticos pelo Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de 103

Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa em estirpes bacterianas de *S. aureus*

Figura 7. Avaliação da potenciação de antibióticos do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa em estirpes bacterianas de *E. coli* 06 104

Figura 8. Avaliação da potenciação de antibióticos do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa em estirpes bacterianas de *P. aeruginosa* 24 105

Figura 9. Curva de viabilidade celular de fluconazol e do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa sobre cepas de *Candida albicans e Candida tropicalis* 107

Figura 10. Avaliação do efeito modificador da ação do fluconazol pelo Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa sobre cepas *Candida albicans* e *Candida tropicalis* 108

Tabela 1. Caracterização de compostos tentativamente identificados por CLAE-Q-TOF-MS/MS do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* – EEPMTa 98

Tabela 2. Caracterização de compostos tentativamente identificados por CLAE-Q-TOF-MS/MS do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa 99

Tabela 3. Quantificação por CLAE/DAD de ácidos fenólicos e flavonoides presentes no Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e no Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa 101

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima – CIM dos Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa sobre cepas padrões e multirresistentes de bactérias (μg/mL) 102

Tabela 5: Concentração Inibitória de 50 % (CI_{50}) de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (μg/mL) pelos extratos e fluconazol e a combinação destes 106

CAPÍTULO III: Avaliação da Atividade Antibacteriana e Inibitória de Efluxo do Ácido *trans*-Cinâmico em *Staphylococcus aureus*: Ensaios Experimentais e Modelagem *In silico*

Figura 1. Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelo ácido *trans*-cinâmico contra a estirpe *S. aureus* 1199B, em associação com Norfloxacina (A) e BrEt (B) 128

Figura 2. Avaliação da inibição das bombas de efluxo NorA pelo ácido *trans*-cinâmico. Avaliada pela medição da fluorescência de BrEt em *S. aureus* 1199B 129

Figura 3. Avaliação da ação do ácido *trans*-cinâmico a 100 μg/mL e 50 μg/mL sobre a permeabilidade da membrana bacteriana de *S. aureus* 1199B 130

Figura 4. (A) Visualização espacial da bomba de efluxo NorA (PDB 3WDO) com a superfície da cavidade do sítio de ligação do antígeno; e (B) superfície da cavidade do sítio de ligação dos ligantes do brometo de etidio - BrEt, norfloxacina, ácido *trans-cinâmico* e clorpromazina - CPZ, após o ciclo de simulações independentes de *docking* molecular 131

Figura 5. Visualização tridimensional das interações ligante–proteína para os ligantes (A) Brometo de etídio - BrEt e norfloxacina e (B) ácido *trans-cinâmico* e Clorpromazina - CPZ, na bomba de efluxo NorA (PDB 3WDO). 132

Figura 6. (A) Visualização espacial da bomba de efluxo NorA complexada a fragmentos sintéticos de ligação ao antígeno (Fab); (B) domínio transmembrana com a superfície da cavidade do sítio de ligação ao antígeno (PDB 7LO7); e (C) superfície da cavidade do sítio de ligação dos ligantes Brometo de etídio - BrEt, norfloxacina, ácido *trans-cinâmico* e Clorpromazina - CPZ, após o ciclo de simulações independentes de *docking* molecular. 133

Figura 7. Visualização tridimensional das interações ligante–proteína para os ligantes (A) Brometo de etidio - BrEt e norfloxacina e (B) ácido *trans-cinâmico* e Clorpromazina - CPZ no complexo NorA–Fab (PDB 7LO7). O mapa tridimensional inclui a análise das interações de ligações de hidrogênio (H-*bond*), interações hidrofóbicas e ligações de halogênio observadas ao final das simulações de *docking* molecular 134

Figura 8. Análises farmacocinéticas preditivas baseadas em (A) mapa de potencial de lipofilicidade molecular (MLP) e (B) alinhamento entre descritores de lipofilicidade (logP) e polaridade (TPSA) para estimar a viabilidade farmacocinética do ácido *trans-cinâmico* 137

Figura 9. (A) Teste de similaridade guiado por inteligência artificial (IA) com compostos depositados no banco de dados *DrugBank*®, considerando os descritores de permeabilidade celular efetiva ($logP_{app,A\rightarrow B}$ em células Caco-2) e depuração do fármaco no sistema de microssomos hepáticos humanos; e (B) predição consensual 139

multiplataforma dos descritores PAMPA expressos em $P_{app,A\rightarrow B}$ em células Caco-2.

Tabela 1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima do ácido *trans*-cinâmico (μg/mL) contra a cepa de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo NorA 126

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima - CIM do brometo de etidio em diferentes estirpes de *S. aureus* (μg/mL) 127

Tabela 3. Dados das simulações de *docking* molecular realizadas entre o ácido *trans-cinâmico* e os ligantes utilizados como controle, CPZ, BrEt e norfloxacina em relação à bomba de efluxo NorA, a partir dos PDBs 3WDO (modelo por homologia) e 7LO7 135

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do ácido *trans*-cinâmico calculadas e aplicadas aos critérios de classificação da Pfizer, Inc 137

Tabela 5. Propriedades farmacocinéticas expressas em descritores PAMPA: P_{app}, P_{eff} e $CL_{int,u}$, e descritores de metabolismo de fármacos, expressos em substratos CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 e descritor de lesão hepática induzida por fármacos (DILI). 140

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
ABC	ATP *Binding Cassette*
AIEC	*Escherichia coli* invasiva aderente
E_A	Energia de afinidade
ASF	Abelhas Sem Ferrão
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina Trifosfato
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CI_{50}	Concentração Inibitória Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-Q-TOF-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com Quadrupolo e Tempo de Voo em Tandem
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CPZ	Clorpromazina
DAEC	*E. coli* difusamente aderente
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EAEC	*E. coli* enteroagregativa
EEPMTa	Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*
EEPPTa	Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*
EHEC	*E. coli* enterohemorrágica
EIEC	*E. coli* enteroinvasiva

EPEC	*Escherichia coli* enteropatogênica
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigênica
Glu	Glutamato
IBEs	Inibidores de Bomba de Efluxo
Ile	Isoleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MATE	*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*
MDR	Multidrogas Resistentes
MFS	*Major Facilitator Superfamily*
MLP	Lipofilicidade molecular
MPO	Otimização Multiparamétrica
MRSA	Cepas de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACE	*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PAMPA	*Parallel Artifical Membrane Permeation Assay*
Phe	Fenilalanina
PKDM	*Pharmacokinetics and Drug Metabolism*
QAC	Compostos quaternários
RAM	Resistência a antimicrobianos
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RND	*Resistance Nodulation Division*
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
SMR	*Small Multidrug Resistance*
SNS	Sistema Nervoso Central
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica

Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

Item	Assunto	Página
1	**INTRODUÇÃO GERAL**	22
1.1	ESTRATÉGIAS DE PESQUISA	22
1.2	ESTRUTURA DO RELATÓRIO DE QUALIFICAÇÃO	26
2	**OBJETIVOS**	27
2.1.	OBJETIVO GERAL	27
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2.3	OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS	28
3	**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**	31
3.1	PATÓGENOS BACTERIANOS E FÚNGICOS	31
3.1.1	*Staphylococcus aureus*	32
3.1.2	*Pseudomonas aeruginosa*	33
3.1.3	*Escherichia coli*	34
3.1.4	*Candida albicans*	35
3.1.5	*Candida tropicalis*	37
3.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MICROBIANA	38
3.2.1	Efluxo ativo mediado pelas Proteínas de Efluxo	42
3.2.1.1	Bomba de efluxo NorA	44
3.3	BUSCAS POR PRODUTOS ANTIMICROBIANOS PARA O CONTROLE DE MICRORGANISMOS RESISTENTES	44
3.3.1	Inibidores de Bomba de Efluxo - IBEs	45
3.4	ABELHAS SEM FERRÃO – ASF	46
3.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS BIOPRODUTOS DERIVADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO	47
3.5.1	Mel	48

3.5.2 Própolis e Geoprópolis 49

3.5.3 Pólen fermentado (“Saburá”) 49

3.6 ESPÉCIE DE ABELHA SEM FERRÃO *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) 50

3.6.1 Ácido *trans*-cinâmico nos Bioprodutos de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) 51

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 53

4.1 CAPÍTULO I: Visitação floral, atividades fitoquímicas e biológicas de bioprodutos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): uma revisão 53

4.2 CAPÍTULO II: Caracterização química, atividade antibacteriana e antifúngica dos potes de mel e dos potes de pólen obtidos da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) 87

4.3 CAPÍTULO III: Avaliação da Atividade Antibacteriana e Inibitória de Efluxo do Ácido *trans*-Cinâmico em *Staphylococcus aureus*: Ensaios Experimentais e Modelagem *In silico* 117

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 155

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA 155

5.2 CONCLUSÕES GERAIS 156

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS 156

6 REFERÊNCIAS 158

Caracterização Química, Atividade Antimicrobiana e Inibição de Efluxo: Estudo dos Bioprodutos de *Tetragonisca angustula* e do Ácido *trans*-Cinâmico

Introdução: A atividade antimicrobiana dos subprodutos de abelhas sem ferrão está associada às resinas antimicrobianas usadas na construção de ninhos. Devido ao aumento da resistência bacteriana causada pelo uso inadequado de medicamentos, é fundamental investigar o potencial desses subprodutos no controle de agentes microbianos. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo determinar a composição química dos extratos etanólicos dos potes de mel (EEPMTa) e de pólen (EEPPTa) da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*, além de avaliar sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Também foi investigada a inibição da bomba de efluxo NorA de *S. aureus* pelo ácido *trans*-cinâmico, por meio de abordagens *in silico*, visando explorar as interações com essa bomba e suas propriedades farmacocinéticas. **Metodologia:** As amostras de potes de mel e potes de pólen de *T. angustula* de foram coletadas no mês de agosto de 2022 no município de Crato, Ceará, Brasil. A caracterização química foi determinada por CLAE-Q-TOF-MS/MS e CLAE-DAD, enquanto os ensaios antibacterianos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo. A avaliação de efeito antibacteriano foi realizada por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a atividade antifúngica dos extratos isolados e em associação com o fluconazol foi determinada pela avaliação da CI_{50}. A inibição da bomba de efluxo NorA foi avaliada pelo efeito combinado do ácido *trans*-cinâmico e inibidores padrão, além da associação com os antibióticos padrão e brometo de etídio (BrEt). Os ensaios de docagem molecular entre o ácido *trans*-cinâmico e a bomba de efluxo NorA e suas propriedades farmacocinéticas foram realizados *in silico*. **Resultados e discussões:** Foram identificados 11 compostos no EEPMTa e 9 no EEPPTa, incluindo cirsimaritina, 3′-prenilnaringenina, xantohumol, lespedezaflavanona B e ácido 19α-hidroxi-ursólico. O EEPMTa e EEPPT apresentaram uma CIM ≥ 1024 µg/mL para as cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli.* Quando os extratos foram associados a norfloxacina contra *S. aureus* foi verificado a potencialização do efeito do antibiótico (CIM de 256 para 128 µg/mL). Com gentamicina, o EEPMTa reduziu a CIM de 17,95 para 11,31 µg/mL, e o EEPPTa para 12,69 µg/mL. Apenas o EEPMTa foi eficaz com ampicilina, reduzindo sua CIM de 71,83 para 31,7 µg/mL. Contra *P. aeruginosa*, o EEPMTa potencializou a gentamicina (CIM de 8 para 4 µg/mL), enquanto o EEPPTa teve efeito antagônico. Frente a *E. coli*, apenas o EEPPTa reduziu a CIM de 64 para 57,01 µg/mL. O EEPMTa apresentou menores CI_{50} frente às leveduras (*C. albicans*: 65,47 µg/mL; *C. tropicalis*: 29,79 µg/mL) em comparação ao EEPPTa (*C. albicans*: 820,7 µg/mL; *C. tropicalis*: 809,9 µg/mL). O ácido *trans*-cinâmico não apresentou ação antibacteriana direta contra a cepa 1199B de *S. aureus*, mas potencializou a atividade da norfloxacina ao reduzir sua CIM. Quando combinado ao brometo de etídio (BrEt), reduziu a CIM de 128 µg/mL para 64 µg/mL, corroborando com o aumento da emissão de fluorescência do BrEt na cepa tratada. O composto também aumentou a permeabilidade da membrana de *S. aureus*, sugerindo que esse é um dos mecanismos de ação. Simulações de *docking* molecular indicam que o ácido *trans*-cinâmico pode inibir a bomba de efluxo NorA, com interações ligante-proteína

semelhantes às da clorpromazina, envolvendo os resíduos Tyr225 e Phe303. Os descritores PAMPA indicaram que o ácido *trans*-cinâmico apresenta alta permeabilidade celular, boa estabilidade metabólica e baixo efluxo, indicando elevada absorção intestinal e biodisponibilidade oral, com potencial para aplicação como agente antimicrobiano. **Conclusões:** Os resultados indicam que os subprodutos de *Tetragonisca angustula* e o ácido *trans*-cinâmico podem ser explorados como alternativas no controle a microrganismos resistentes.

Palavras-Chave: Metabólitos secundários; Resistência microbiana; Meliponíneos; Ácidos fenólicos; Efluxo ativo.

Agradecimentos: FUNCAP, CAPES e CNPq

Chemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Efflux Inhibition: Study of Bioproducts from *Tetragonisca angustula* and *Trans*-Cinnamic Acid

Introduction: The antimicrobial activity of stingless bee by-products is associated with the antimicrobial resins used in nest construction. Due to the increase in bacterial resistance caused by the inappropriate use of medications, it is essential to investigate the potential of these by-products in controlling microbial agents. **Objective:** This study aimed to determine the chemical composition of ethanolic extracts from honey pots (EEPMTa) and pollen (EEPPTa) of the stingless bee *Tetragonisca angustula*, in addition to evaluating their antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Candida tropicalis*. The inhibition of the NorA efflux pump of *S. aureus* by *trans*-cinnamic acid was also investigated using in silico approaches to explore interactions with this pump and its pharmacokinetic properties. **Methodology:** Samples of honey pots and pollen pots of *T. angustula* were collected in August 2022 in the municipality of Crato, Ceará, Brazil. Chemical characterization was determined by HPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC-DAD, while antibacterial assays were performed by the broth microdilution method. The antibacterial effect was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and the antifungal activity of the isolated extracts and in association with fluconazole was determined by evaluating the IC_{50}. The inhibition of the NorA efflux pump was evaluated by the combined effect of *trans*-cinnamic acid and standard inhibitors, in addition to the association with standard antibiotics and ethidium bromide (EtBr). Molecular *docking* assays between trans-cinnamic acid and the NorA efflux pump and their pharmacokinetic properties were performed *in silico*. **Results and Discussion:** Eleven compounds were identified in EEPMTa and nine in EEPPT, including cirsimaritin, 3′-prenylnaringenin, xanthohumol, lespedezaflavanone B, and 19α-hydroxyursolic acid. EEPMTa and EEPPT had a MIC ≥ 1024 µg/mL for *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* strains. When the extracts were combined with norfloxacin against *S. aureus*, the antibiotic effect was enhanced (MIC from 256 to 128 µg/mL). With gentamicin, EEPMTa reduced the MIC from 17.95 to 11.31 µg/mL, and EEPPTa reduced it to 12.69 µg/mL. Only EEPMTa was effective with ampicillin, reducing its MIC from 71.83 to 31.7 µg/mL. Against *P. aeruginosa*, EEPMTa potentiated gentamicin (MIC from 8 to 4 µg/mL), while EEPPTa had an antagonistic effect. Against *E. coli*, only EEPPTa reduced the MIC from 64 to 57.01 µg/mL. EEPMTa presented lower IC_{50} values against yeasts (*C. albicans*: 65.47 µg/mL; *C. tropicalis*: 29.79 µg/mL) compared to EEPPTa (*C. albicans*: 820.7 µg/mL; *C. tropicalis*: 809.9 µg/mL). *Trans*-cinnamic acid did not show direct antibacterial action against *S. aureus* strain 1199B, but it potentiated the activity of norfloxacin by reducing its MIC. When combined with ethidium bromide (EtBr), it reduced the MIC from 128 µg/mL to 64 µg/mL, corroborating the increase in EtBr fluorescence emission in the treated strain. The compound also increased the permeability of the *S. aureus* membrane, suggesting that this is one of its mechanisms of action. Molecular *docking* simulations indicate that *trans*-cinnamic acid may inhibit the NorA efflux pump, with ligand-protein interactions similar to those of chlorpromazine, involving the residues Tyr225 and Phe303. PAMPA descriptors indicated that *trans*-cinnamic acid has

high cell permeability, good metabolic stability, and low efflux, indicating high intestinal absorption and oral bioavailability, with potential for application as an antimicrobial agent. **Conclusions:** The results indicate that *Tetragonisca angustula* byproducts and *trans*-cinnamic acid may be explored as alternatives for controlling resistant microorganisms.

Keywords: Secondary metabolites; Microbial resistance; Meliponines. Phenolic acids; Active efflux.

Acknowledgments: FUNCAP, CAPES, and CNPq

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

Este trabalho destaca a importância das abelhas sem ferrão, como *Tetragonisca angustula*, conhecida popularmente como “Jataí”, não apenas para o equilíbrio ambiental, mas também para a saúde humana. Essas abelhas produzem produtos, como os mel, cera, própolis e pólen, ricos em compostos bioativos, entre eles o ácido *trans*-cinâmico, que demonstraram grande potencial no combate a microrganismos resistentes, incluindo bactérias e fungos. Em um cenário no qual a resistência microbiana compromete a eficácia dos medicamentos disponíveis, esses produtos naturais e sintéticos surgem como fontes promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Além dos benefícios à saúde, esses achados reforçam a necessidade de proteger as abelhas sem ferrão e seus habitats, uma vez que esses polinizadores desempenham papel essencial na polinização e na manutenção da biodiversidade. Assim, evidencia-se que a preservação dessas espécies pode gerar impactos diretos e positivos para a sociedade, integrando saúde pública, avanço científico e conservação ambiental em um mesmo objetivo.

1.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

A resistência microbiana (RAM) é uma das ameaças globais mais urgentes à saúde pública no século 21 (Ahmed *et al.*, 2024). O processo de resistência microbiana ocorre quando microrganismos, incluindo bactérias, fungos, parasitas e vírus, passam por processos evolutivos que os tornam resistentes a medicamentos, como antibiótico e antifúngicos, amplamente utilizados no tratamento de infecções (Tang; Millar; Moore, 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as principais causas da RAM incluem falta de higiene, uso indevido e excesso de antibióticos, resultando em desafios como o aumento das taxas de morbidade e mortalidade, custos elevados, prolongamento do tempo de internação hospitalar e na duração e complexidade do tratamento das doenças infecciosas. (Aghamohammad; Rohani, 2023). Dentre os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias estão: alteração da permeabilidade da membrana, modificação do alvo da droga, inativação da ação de uma droga, bem como, o efluxo ativo (Reygaert, 2018).

Compreender os tipos e os mecanismos de resistência microbiana é essencial para desenvolver estratégias de tratamento mais eficazes contra patógenos resistentes. Através desse conhecimento os pesquisadores podem projetar novos produtos com potencial antimicrobiano direcionados especificamente aos mecanismos de resistência bacteriana e fúngica, otimizando os resultados terapêuticos. Além disso, esse processo pode facilitar a vigilância e o monitoramento de bactérias resistentes, contribuindo para a identificação precoce de ameaças emergentes e a implementação de medidas adequadas de controle de infecções. Também orienta o uso racional de antimicrobianos, promovendo práticas que minimizem o desenvolvimento e a disseminação da resistência (Belay *et al.*, 2024).

A crise de resistência a antibióticos e antifúngicos exige estratégias inovadoras para aumentar a eficácia dos medicamentos e conter a resistência. Nesse contexto, os produtos naturais derivados de plantas e animais têm se destacado como alternativas promissoras, sendo amplamente estudados por suas propriedades antimicrobianas e sua capacidade de modificar a resistência a fármacos existentes (Coutinho *et al.*, 2008). Denominados adjuvantes, esses compostos, quando utilizados em combinação com medicamentos, potencializam a atividade antimicrobiana, representando uma abordagem eficaz no combate à resistência a múltiplos medicamentos (Kumar *et al.*, 2023).

Neste estudo, investigamos o potencial antimicrobiano de bioprodutos derivados da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*. Extratos etanólicos foram preparados utilizando os

potes de mel e de pólen da espécie, através da destilação do solvente em rotaevaporador a vácuo. O solvente utilizado foi o etanol 95%, amplamente empregado para a extração de compostos fenólicos (Sai-Ut *et al.*, 2023). Estudos sugerem que a concentração ideal de etanol varia entre 70% e 95%, além disso, a relação sólido-líquido desempenha um papel fundamental na eficiência da extração, sendo frequentemente ajustada para otimizar o rendimento (Bankova; Trusheva; Popova, 2021; Cacique *et al.*, 2020).

Para caracterizar quimicamente os extratos, foram empregadas as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Tempo de Voo com Quadrupolo (CLAE-Q-TOF-MS/MS) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). O CLAE-Q-TOF-MS/MS combina a eficiência de fragmentação de compostos da tecnologia de quadrupolo com a rápida análise e alta resolução de massa do tempo de voo (TOF), permitindo identificar com precisão uma ampla gama de compostos químicos (Allen; McWhinney, 2019).

A CLAE-DAD, por sua vez, é amplamente utilizado para identificar e quantificar polifenóis devido à sua robustez e custo acessível. Nessa técnica, a identificação baseia-se na comparação dos dados espectrais e dos tempos de retenção dos compostos com padrões comerciais disponíveis (Plaza *et al.*, 2018). A absorção de polifenóis ocorre em diferentes comprimentos de onda, dependendo da estrutura química: compostos fenólicos gerais são detectados entre 240-285 nm, flavonas e flavonóis entre 350-365 nm, e antocianinas entre 460-560 nm (Lorrain *et al.*, 2013).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é um dos principais parâmetros microbiológicos utilizados para avaliar a atividade antibacteriana de substâncias naturais ou sintéticas. Considerada o "padrão-ouro" para determinar a suscetibilidade microbiana a antimicrobianos, a CIM é amplamente empregada para validar e comparar o desempenho de outros métodos de suscetibilidade (Andrews, 2001). A CIM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento de um microrganismo após incubação, geralmente por 24 horas (Andrews, 2001).

A determinação da CIM foi realizada seguido a metodologia de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O procedimento consiste em inocular uma placa de microdiluição com a cultura bacteriana e adicionar várias diluições do produto avaliado nas fileiras da placa (Davis; Papich, 2014). Este método padronizado oferece alta precisão na avaliação da suscetibilidade bacteriana, sendo essencial para pesquisas e aplicações clínicas no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Kowalska-Krochmal; Dudek-Wicher, 2021).

Adicionalmente, foi adotado o método recomendado pelo CLSI (2015), com as

devidas modificações, para avaliar a capacidade adjuvantes dos extratos, verificando sua capacidade em potencializar as CIMs dos antibióticos avaliados. Essa potencialização pode ser observada tanto pelo aumento da atividade dos antibióticos quanto pela redução da CIM em concentrações específicas (Coutinho *et al.*, 2008; Lamut *et al.*, 2019).

As estratégias de pesquisa empregadas para determinação da atividade antifúngica dos extratos, incluíram a avaliação do crescimento fúngico, determinação da CI_{50} e da Concentração Fungicida Mínima - CFM, além da análise da interação dos extratos com fluconazol. Essas abordagens permitiram explorar o potencial antifúngico dos extratos e sua capacidade de potencializar a ação do fluconazol, utilizando métodos adaptados de protocolos previamente estabelecidos (Fonseca *et al.*, 2022; Morais-Braga *et al.*, 2016).

Avaliou-se também a atividade antibacteriana e inibidora de efluxo do ácido *trans*-cinâmico, um dos compostos mais frequentemente encontrados nos bioprodutos de *Tetragonisca angustula*, conforme apontado em estudos da revisão de literatura. A cepa bacteriana utilizada foi a 1199B de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo NorA.

Para avaliar a capacidade do composto em inibir o mecanismo de efluxo foi utilizado o brometo de etídio (BrEt) como substrato para a proteína de efluxo NorA (Rocha *et al.*, 2023). Para isso, nesse estudo utilizou inibidores padrão para estabelecer uma comparação com a substância avaliada, em associação com BrEt e o antibiótico específico para a bomba de efluxo. Um dos inibidores empregados foi o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um desacoplador de protonóforos inespecífico que dissipa a força próton-motriz, principal fonte de energia das células bacterianas, resultando na inibição da atividade das bombas de efluxo (Zoaiter *et al.*, 2023). Outro inibidor utilizado foi a clorpromazina (CPZ), que interfere no fluxo de potássio através da membrana, bloqueando diversos sistemas dependentes de energia (Grimsey *et al.*, 2020).

Também foi avaliada a capacidade da substância em aumentar a fluorescência do BrEt no interior da célula bacteriana. Nesse ensaio, a fluorescência das células foi medida antes e após a adição do corante, permitindo monitorar o acúmulo intracelular. O BrEt, um agente intercalante de DNA, apenas fluoresce quando ligado ao DNA, sendo amplamente utilizado nesses estudos. O nível de fluorescência observado corresponde ao acúmulo intracelular, permitindo avaliar a eficácia dos inibidores no bloqueio da atividade de efluxo (Blair *et al.*, 2015; Whittle *et al.*, 2019).

Além disso, avaliamos a capacidade da substância em atuar sobre a permeabilidade da membrana de *S. aureus*. Recentemente, métodos baseados na avaliação da permeabilidade da membrana celular utilizando SYTOX™ Green (SYTOX) têm ganhado destaque, sendo

aplicados em diferentes momentos antes e após o tratamento antimicrobiano. O SYTOX Green é uma sonda fluorescente capaz de penetrar apenas em membranas celulares danificadas, onde se liga ao DNA intacto, resultando em uma fluorescência verde intensa. Essa abordagem permite monitorar a integridade da membrana e os efeitos de agentes antimicrobianos de forma eficaz (McKenzie *et al.*, 2016).

O *docking* molecular tornou-se uma ferramenta essencial no desenvolvimento de medicamentos *in silico*, permitindo prever a interação entre pequenas moléculas e proteínas em nível atômico. Nesse estudo, avaliamos a interação da proteína de efluxo NorA com o ácido *trans*-cinâmico. Essa técnica possibilita o estudo detalhado do comportamento de compostos candidatos a adjuvantes de antibióticos, no sítio de ligação de proteínas-alvo, proporcionando o entendimento sobre os processos bioquímicos fundamentais que regem essas interações (Meng *et al.*, 2011; Sahoo *et al.*, 2022). O processo de *docking* molecular ocorre em duas etapas principais: a amostragem do ligante e a aplicação de uma função de pontuação. Os algoritmos de amostragem identificam as conformações energeticamente mais favoráveis do ligante dentro do sítio ativo da proteína, considerando o modo de ligação. Em seguida, essas conformações são classificadas com base em funções de pontuação, que avaliam a energia de ligação e a estabilidade do complexo formado (Agu *et al.*, 2023).

Para aprimorar o desenvolvimento da substância avaliada como potencial inibidora de efluxo, foram calculadas suas propriedades físico-químicas e parâmetros associados. O ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela (PAMPA) foi utilizado para avaliar as características de permeabilidade do ácido *trans*-cinâmico. Este modelo utiliza membranas artificiais não biológicas e foca exclusivamente na previsão da absorção celular passiva de fármacos, sendo amplamente empregado na indústria farmacêutica para identificar compostos com propriedades de permeabilidade inadequadas nas etapas iniciais do ciclo de desenvolvimento (Masungi *et al.*, 2008).

Como complemento à pesquisa *in vitro,* a metodologia de otimização multiparâmetro (MPO) foi aplicada (*in silico*), permitindo alinhar de forma probabilística, características semelhantes às de fármacos clínicos, aumentando a chance de identificar candidatos com perfis farmacocinéticos e de segurança ideais. Neste estudo, foi adotado o esquema OMP da Pfizer, baseado em propriedades físico-químicas fundamentais associadas à alta permeabilidade, baixo efluxo por P-$_{gp}$, baixa depuração hepática e elevada segurança (Perron *et al*., 2022).

1.2 ESTRUTURA DO RELATÓRIO DE QUALIFICAÇÃO

O relatório de qualificação inicia-se com uma introdução que contextualiza a problemática da resistência bacteriana e os principais mecanismos associados a esse fenômeno. A introdução também apresenta a justificativa para o uso dos métodos empregados neste estudo, seguida pelos objetivos do trabalho. Na sequência, a fundamentação teórica aborda os tópicos centrais do estudo, incluindo a resistência em espécies bacterianas do grupo ESKAPE-E e fungos do gênero *Candida*. Também são discutidos os mecanismos de resistência mediados por sistemas de bombas de efluxo, como o papel da proteína NorA na resistência bacteriana em *S. aureus*. Adicionalmente, a fundamentação explora a relevância dos produtos naturais, com ênfase nos bioprodutos derivados de abelhas sem ferrão, na mitigação da resistência aos antibióticos. Por fim, a estrutura do relatório inclui a produção científica, composta por três artigos publicados.

O primeiro estudo consiste em uma revisão sistemática que reúne e analisa trabalhos científicos sobre a composição química e as atividades biológicas de extratos obtidos a partir de bioprodutos da espécie *Tetragonisca angustula,* que está publicado na revista *Chemistry and Biodiversity* (Qualis A4). O segundo artigo, publicado na revista *Food and Chemical Toxicology* (Qualis A1), apresenta um estudo experimental que investigou a composição química e o potencial antibacteriano e antifúngico dos extratos etanólicos dos potes de mel e pólen de *T. angustula*. Já o terceiro estudo, está publicado na revista *Phytomedicine Plus* (Qualis A3), explora o potencial do ácido *trans*-cinâmico como inibidor da proteína de efluxo NorA em *S. aureus*. Por fim, o trabalho inclui as considerações finais, que descrevem os principais aspectos apresentados no estudo. A Figura 1 apresenta o organograma que contém a divisão da estrutura da tese.

Figura 1. Organização da estrutura da Tese



2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a composição química dos extratos etanólicos dos potes de mel e potes de pólen da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula,* investigar suas atividades antibacteriana e antifúngica frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e avaliar a atividade antibacteriana e inibidora de efluxo do ácido *trans*-cinâmico sobre a cepa de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo NorA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar de forma sistemática os dados disponíveis na literatura sobre a visitação floral, composição química e as bioatividades associadas aos produtos da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*;
- Determinar a composição química dos extratos etanólico de potes de mel e potes de pólen de *Tetragonisca angustula* através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas por Tempo de Voo com Análise Tandem (CLAE-Q-TOF-MS/MS) e da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD);
- Avaliar a atividade antibacteriana direta pelos extratos etanólico de potes de mel e potes de pólen de *Tetragonisca angustula* e destes em concentração subinibitória associados a antibióticos sobre cepas padrão e multirresistentes de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*;
- Avaliar o efeito antifúngico direto pelos extratos de potes de mel e potes de pólen de *Tetragonisca angustula* e destes em concentração subinibitória associados ao fluconazol sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- Avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico na reversão da resistência de *S. aureus* por inibição das bombas de efluxo NorA;
- Verificar a capacidade do ácido *trans*-cinâmico de aumentar a fluorescência do brometo de etídio e de atuar sobre a permeabilidade da membrana de *S. aureus*;
- Investigar as interações entre o ácido *trans*-cinâmico e a bomba de efluxo NorA, através de abordagens *in silico* de docagem molecular;

- Determinar as propriedades farmacocinéticas e toxicidade do ácido *trans*-cinâmico através da Otimização Multiparamétrica (MPO) e a previsão PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).

2.3 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

As Abelhas Sem Ferrão - ASF (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) são organismos eussociais, destacando-se como importantes polinizadores de plantas nativas e cultivadas nos trópicos e subtópicos, especialmente nos neotrópicos (Rasmussen, 2013). Com uma ampla distribuição, representam o maior grupo de abelhas eussociais, incluindo 259 espécies descritas no Brasil, sendo 40% endêmicas (Nogueira, 2023; Pedro, 2014).

As espécies de ASF caracterizam-se por apresentar um ferrão não funcional e venação das asas reduzidas, além da organização em colônias com uma única rainha e operárias que coletam néctar e pólen (Michener, 2013). A atividade de forrageamento dessas espécies é crucial para a biodiversidade e variabilidade genética das plantas, além de contribuir para a segurança alimentar e a conservação ambiental (Giannini *et al.*, 2017). Além de seu papel ecológico, as abelhas sem ferrão têm importância econômica pela produção de mel e subprodutos como própolis, geoprópolis, pólen fermentado ("saburá"), amplamente utilizados em comunidades locais e na medicina popular (Rocha *et al.*, 2023). Esses produtos meliponícolas são usados na dieta humana desde a antiguidade e inúmeros estudos na literatura demonstraram suas atividades biológicas (Assis *et al.*, 2021; Ramón-sierra *et al.*, 2019; Ranneh *et al.*, 2021).

Dentre as espécies de abelhas está *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), popularmente conhecida como "Jataí", é uma espécie de abelha indígena sem ferrão amplamente distribuída no Brasil. Caracteriza-se pelo pequeno porte, cor dourada e nidificação em troncos ocos ou muros de pedra (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984). Seus subprodutos, embora pouco explorados, apresentam propriedades biológicas significativas, como atividade antioxidante e propriedades antimicrobianas da própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estando essas atividades biológicas associadas a presença de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos em sua composição química (Barreiras *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2022).

A atividade antimicrobiana dos subprodutos das abelhas sem ferrão está relacionada às resinas vegetais coletadas durante atividade de forrageamento das espécies, as quais são utilizadas na construção de seus ninhos e apresentam efeitos antimicrobianos (Shanahan;

Spivak, 2021). Considerando o aumento da resistência bacteriana, produtos naturais derivados de plantas e animais têm sido investigados como alternativas terapêuticas. Além de suas propriedades antimicrobianas, os produtos naturais destacam-se por potencializar a eficácia de medicamentos existentes, atuando como adjuvantes no combate à resistência a múltiplos fármacos.

Na literatura, Bezerra *et al.* (2025a) demonstraram que os extratos etanólicos de geoprópolis, cera e própolis da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* potencializam a atividade dos antibióticos norfloxacina, amicacina e penicilina frente a *Staphylococcus aureus*. De forma semelhante, ensaios de modificação da ação antibiótica por meio da associação dos produtos de *Melipona rufiventris* frente à cepa multirresistente *S. aureus* 10 evidenciaram o efeito potencializador da norfloxacina e da gentamicina, quando associadas aos extratos etanólicos da cera e do pólen (Bezerra *et al.,* 2025b).

Dentre os microrganismos que apresentam resistência bacteriana, a Organização Mundial da Saúde (OMS) priorizou *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* como uma ameaça à saúde global, destacando a necessidade urgente de novas pesquisas e desenvolvimento de substâncias que apresentem potencial antibacteriano (WHO, 2024). *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva, apresenta-se como colônias de coloração amarelas ou brancas e capacidade aeróbica e anaeróbica facultativa, sendo responsável por causar infecções em ambientes nosocomiais, como infecções de pele, bacteremia, pneumonia e intoxicação alimentar (Gnanamani; Hariharan; Paul-Satyaseela, 2018; Grace; Fetsch, 2018).

Dentro do grupo das bactérias Gram-negativas, destaca-se *P. aeruginosa*, um patógeno multirresistente que causa infecções agudas e crônicas em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com COVID-19 (Rossi *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2021). Enquanto, *E. coli*, da família Enterobacteriaceae, é associada a infecções do trato urinário, sepse e gastrointestinais, além de estar associada a surtos alimentares em países desenvolvidos devido à contaminação de carnes, frutas e vegetais (Chen; Frankel, 2005; Mohamed; Habib, 2023).

Dentre as cepas fúngicas que apresentam resistência significativa aos antifúngicos que pertencem a classe dos azóis, especialmente ao fluconazol, agravando o desafio no tratamento dessas infecções, está *Candida albicans*, a espécie fúngica mais prevalente entre os patógenos fúngicos humanos, causando infecções sistêmicas conhecidas como candidíases (Urbanek *et al.*, 2022). Já *Candida tropicalis* é frequentemente isolada em pacientes de terapia intensiva, especialmente os submetidos a cateterismo prolongado, antibióticos de amplo espectro ou com câncer (Silva *et al.*, 2012).

Diante da relevância ecológica e do potencial bioativo dos produtos das abelhas sem ferrão, com destaque para *Tetragonisca angustula*, surge a necessidade de compreender quais

compostos químicos estão diretamente associados às atividades antimicrobianas observadas e de que forma esses compostos podem contribuir para o enfrentamento da resistência microbiana. Embora estudos indiquem que esses subprodutos sejam ricos em fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos, ainda há lacunas quanto à identificação de moléculas específicas responsáveis por tais efeitos e aos seus possíveis mecanismos de ação frente a bactérias e fungos clinicamente relevantes.

Nesse contexto, o ácido *trans*-cinâmico foi selecionado para investigação por ser um composto fenólico frequentemente associado aos bioprodutos de *T. angustula*, além de estar relacionado a atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana. Assim, este estudo busca compreender se os extratos etanólicos dos potes de mel e dos potes de pólen, bem como o composto relatado na literatura, o ácido *trans*-cinâmico, contribuem para a atividade antimicrobiana atribuída aos subprodutos de *T. angustula*, além de avaliar seu potencial frente a patógenos bacterianos e fúngicos, considerando tanto sua ação direta quanto sua possível atuação como agentes adjuvantes no combate à resistência microbiana.

3.1 PATÓGENOS BACTERIANOS E FÚNGICOS

As infecções nosocomiais podem ser causadas por diversos organismos, como bactérias, fungos, vírus, parasitas e outros agentes, podendo ter suas origens em fontes exógenas ou endógenas e são transmitidas por contato direto ou indireto entre pacientes, profissionais de saúde, visitantes, objetos contaminados ou fontes ambientais (Fürnkranz; Walochnik, 2021). O aumento no número de patógenos resistentes a antimicrobianos, frequentemente associados às infecções nosocomiais, representa um desafio significativo para os sistemas de saúde, implicando em altos custos econômicos globais, além de impactos como elevação das taxas de mortalidade e morbidade, aumento nos custos de tratamento e incertezas diagnósticas (Khan; Baig; Mehboob, 2017).

Dentre os organismos que causam infecções nosocomiais, as bactérias patogênicas *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. que constituem o grupo ESKAPE são consideradas como microrganismos que apresentam resistência intrínseca significativa e grande capacidade de adquirir resistência a múltiplos medicamentos (Miller; Arias, 2024). Alguns estudos na literatura ainda consideram que a bactéria *Escherichia coli* faça parte desse grupo, alterando a sigla para ESKAPE-E (Ayobami *et al.*, 2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) priorizou essas bactérias e espécies de fungos do gênero *Candida* como uma ameaça à saúde global, destacando a necessidade urgente de novas pesquisas e desenvolvimento de substâncias que apresentem potencial antibacteriano (WHO, 2022, 2024).

Os fungos são organismos entre os mais abundantes e diversos do mundo, encontrados na maioria dos seres humanos como parte do microbioma humano. No entanto, quando as barreias fisiológicas são rompidas, especialmente em indivíduos com sistema imunológico enfraquecido ou que têm internações frequentes com cuidados de saúde, esses microrganismos podem representar uma ameaça grave à saúde, causando infecções superficiais e sistêmicas (Lockhart; Chowdhary; Gold, 2023).

As estimativas indicam que, anualmente, mais de 6,55 milhões de pessoas são acometidas por doenças fúngicas imediatamente fatais, resultando em mais de 3,75 milhões de óbitos, dos quais aproximadamente 2,55 milhões são diretamente atribuídos a essas infecções. Entre as doenças mais frequentemente citadas nessas estimativas destacam-se a

aspergilose pulmonar crônica, a infecção por *Candida* na corrente sanguínea e a candidíase invasiva (Denning, 2024).

Embora a maioria das infecções fúngicas seja de caráter superficial, como onicomicose, dermatomicoses cutâneas e infecções mucosas, a exemplo da candidíase vulvovaginal, os fungos patogênicos do gênero *Candida* figuram entre os mais frequentemente isolados em infecções humanas (Henriques; Williams, 2020). Nesse contexto, as infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* configuram-se como um problema relevante de saúde pública, estando associadas a elevadas taxas de mortalidade e a altos custos médicos para governos e pacientes hospitalizados, sobretudo em decorrência do aumento de infecções sistêmicas invasivas e de quadros de septicemia, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Nami *et al.*, 2019).

O gênero *Candida* inclui uma variedade de patógenos com comportamento heterogêneo e características patogênicas distintas no hospedeiro humano. Por exemplo, *Candida glabrata* frequentemente infecta indivíduos idosos com idade ≥65 anos, enquanto *Candida parapsilosis* é frequentemente isolada de neonatos e bebês. *Candida albicans* é o patógeno mais versátil entre as espécies de *Candida* e pode causar infecções que afetam vários órgãos, incluindo pulmões e cérebro (Ibe; Pohl, 2024).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva responsável por causar diversas infecções em ambientes nosocomiais como infecções de pele, bacteremia, endocardite, pneumonia e intoxicação alimentar (Gnanamani; Hariharan; Paul-Satyaseela, 2018). Caracteriza-se por apresentar uma morfologia em forma esférica e geralmente suas células estão organizadas em aglomerados, suas colônias são caracterizadas por cores amarelas ou brancas e são organismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos (Grace; Fetsch, 2018).

As infecções causadas por *S. aureus* estão associadas a violação das células que compõem a camada epitelial protetora (Cheung; Bae; Otto, 2021). Esse organismo apresenta fatores de virulência que são responsáveis pelo estabelecimento e progressão das infecções, os quais ajudam na fixação tecidual das células bacterianas, pela invasão tecidual e determinam a resposta imune do hospedeiro. Além disso, contribuem para a aquisição de resistência a múltiplas classes de antibióticos (Zecconi; Scali, 2013).

Dentre os fatores de virulência que estão presentes em *S. aureus,* as proteínas de fibronectina e proteínas A são responsáveis pela facilidade de adesão epitelial desses

organismos, as enzimas proteases e lipases fazem a ligação das células bacterianas com as células do hospedeiro, a coagulase está associada à formação de biofilmes durante as infecções por *S. aureus*, além disso, as bombas de efluxo são responsáveis por conferir resistência a uma ampla gama de antibióticos (Gould *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2019).

Dentre as cepas de *S. aures* altamente resistentes a antibióticos estão as resistentes à meticilina (MRSA), sendo um dos principais patógenos que causam de infecções hospitalares, estando associado a infecções como bacteremia, endocardite, meningite, artrite, abscesso hepático e abscesso peridural espinhal, resultando em alta morbidade, alta mortalidade e aumento dos custos de tratamento (Algammal *et al.*, 2020; Enright *et al.*, 2002). A lista de patógenos bacterianos prioritários da OMS do ano de 2024 inclui *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) como um patógeno de prioridade alta à saúde pública (Rungelrath; Deleo, 2021; WHO, 2024).

3.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é bactéria Gram-negativa, heterotrófica, móvel, possuindo forma de bastonete com cerca de 1 a 5 μm de comprimento, sendo considerada aeróbia facultativa devido a capacidade de crescer tanto por respiração aeróbica quanto anaeróbica, utilizando nitrato como aceptor terminal de elétrons (Diggle; Whiteley, 2020).

Considerado um patógeno oportunista multirresistente (MDR), *P. aeruginosa* é capaz de causar infecções agudas ou crônicas em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística, câncer, queimaduras, sepse e pneumonia associada à ventilação mecânica, incluindo infecções causadas pela COVID-19 (Rossi *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2021).

Quando em estado de biofilme, *P. aeruginosa* pode sobreviver em ambientes extremamente hostis, como atmosferas hipóxias (Cendra; Torrents, 2021). Além disso, os tratamentos das infecções ocasionadas por *P. aeruginosa* são extremamente desafiadores devido a capacidade adaptativa dessa espécie possibilitar o surgimento de rápidas mutações, adquirindo resistência a antibióticos (Qin *et al.*, 2022). Segundo o relatório da OMS de 2024, *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos está classificada como um patógeno de "prioridade alta" para o desenvolvimento de estratégias de controle da resistência microbiana (WHO, 2024).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente estrutural fundamental da membrana externa (MO) da maioria das bactérias Gram-negativas e tem como função proteger o folheto externo e as células hospedeiras, e a endotoxicidade do lipídio A presente no LPS permite

causar danos aos tecidos, além de facilitar a fixação e o reconhecimento por receptores do hospedeiro (Park *et al.*, 2022). O LPS também está relacionado à tolerância a antibióticos e à formação de biofilmes (Chambers; Cherny; Sauer, 2017). Além disso, as proteínas de membrana externa (OMPs) desempenham um papel crucial na troca de nutrientes, adesão e resistência a antibióticos. A resistência antibiótica associada à formação de biofilmes também envolve estruturas como flagelos, pili e outras adesinas (Sabnis *et al.*, 2021).

As bactérias podem modular a resposta imune do hospedeiro por meio de sistemas de secreção, que permitem a liberação de fatores de virulência nas células hospedeiras, facilitando o escape imunológico e promovendo a colonização bacteriana (Rasko; Sperandio, 2010). Em *P. aeruginosa*, foram identificados seis tipos de sistemas de secreção (T1SS a T6SS). Esses sistemas são classificados em duas principais categorias, com base nas rotas de secreção das proteínas de transporte: sistemas de secreção de uma etapa (T1SS, T3SS, T4SS e T6SS) e sistemas de secreção de duas etapas (T2SS e T5SS) (Sharma *et al.*, 2016). O sistema de secreção de uma etapa secreta diretamente proteínas do citosol bacteriano para a superfície, enquanto o sistema de secreção de duas etapas envolve uma breve permanência das proteínas secretadas no periplasma, antes de serem liberadas para o ambiente externo da bactéria.

3.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertence à ordem Enterobacterales e à família Enterobacteriaceae (Chen; Frankel, 2005). As infecções causadas por *E. coli* patogênica podem se limitar à colonização de uma superfície mucosa ou se disseminar por todo o corpo, sendo associadas a infecções do trato urinário, sepse/meningite e infecções gastrointestinais (Chen; Frankel, 2005). Recentemente, uma preocupação crescente tem sido o aumento de epidemias transmitidas por alimentos em países de alta renda, causadas por *E. coli* nociva presente em carnes, frutas e vegetais contaminados (Mohamed; Habib, 2023).

Há uma extensa coleção de genomas sequenciados de *E. coli*, que apresentam diferentes tamanhos e diversidade genômica entre comensais e patógenos, evidenciando uma grande variação dentro da mesma espécie bacteriana. A diversidade de genomas inclui cepas não patogênicas, que atuam como comensais e integram a microbiota intestinal normal de humanos e muitos animais, bem como variantes patogênicas, divididas em patógenos diarreiogênicos e extraintestinais. Essas variantes incluem diferentes patótipos e várias cepas híbridas naturais, que podem ser patógenos facultativos ou obrigatórios (Braz; Melchior; Moreira, 2020).

Sete patótipos de *E. coli* patogênica entérica foram descritos, incluindo *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e o mais recente patótipo identificado, *E. coli* invasiva aderente (AIEC) (Kaper; Nataro; Mobley, 2004; Nataro; Kaper, 1998; Pakbin; Brück; Rossen, 2021). Muitos desses patótipos representam uma preocupação significativa para a saúde pública, pois são transmitidos por alimentos e têm causado surtos fatais tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (Yang *et al.*, 2017).

As cepas patogênicas de *E. coli* seguem um esquema de patogênese em várias etapas, semelhante ao de outros patógenos da mucosa, as quais incluem a colonização de um local da mucosa, a evasão das defesas do hospedeiro, a multiplicação e o consequente dano ao hospedeiro. Além disso, estudos recentes destacam a relação entre a resistência a antibióticos como amicacina, cefalosporinas, ciprofloxacina e gentamicina a formação de biofilmes por cepas de *E. coli* (Nasrollahian; Graham; Halaji, 2024).

E. coli também tem desenvolvido resistência as classes de antibióticos dos β-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e fosfomicina devido ao desenvolvimento das β-lactamases de espectro estendido (ESBL) (Pokharel; Dhakal; Dozois, 2023). Os genes que codificam as ESBLs estão localizados no plasmídeo bacteriano e são frequentemente transferidos horizontalmente para outras células, aumentando ainda mais a disseminação da resistência. *E. coli* adquiriu resistência aos antibióticos β-lactâmicos por meio da produção da enzima β-lactamase, que degrada o anel β-lactâmico presente na maioria dos derivados da penicilina, sendo essa atividade enzimática das β-lactamases a principal razão pela qual os medicamentos à base de penicilina falham em erradicar infecções causadas por *E. coli* (Jariremombe, 2023; Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

3.1.4 *Candida albicans*

O patógeno oportunista *Candida albicans* é responsável por infecções sistêmicas conhecidas como candidíases, sendo considerado a espécie fúngica mais prevalente entre os patógenos fúngicos humanos e listado pela OMS como patógeno prioritário de nível "crítico" para o desenvolvimento de pesquisas que visem estratégias de controle as infecções fúngicas e ao processo de resistência aos antifúngicos (Urbanek *et al.*, 2022; WHO, 2022). Todo o ciclo de vida de *C. albicans* ocorre em hospedeiros mamíferos, alterando-se entre formas de levedura unicelulares distintas e formas miceliais multicelulares (Noble; Gianetti; Witchley, 2017).

As leveduras, também chamadas de células "brancas", apresentam uma morfologia celular arredondada a oval, semelhante à de *Saccharomyces cerevisiae*. Na forma de levedura, as células se reproduzem por brotamento, com a divisão nuclear ocorrendo na junção entre a célula-mãe e a célula-filha. Em contraste, as células hifais têm uma forma fina e tubular, lembrando segmentos de uma “mangueira de jardim”. Nessas células, a divisão nuclear ocorre dentro das células-filhas das hifas, seguida pela migração de um núcleo progenitor de volta para as células-mãe (Noble; Gianetti; Witchley, 2017).

Como levedura, *C. albicans* é um comensal onipresente do microbioma humano, colonizando a pele, a boca, o trato gastrointestinal e o trato reprodutivo feminino de adultos saudáveis (Henriques; Williams, 2020). Em hospedeiros imunocomprometidos, incluindo aqueles que desenvolveram disbiose microbiana, o comportamento de *C. albicans* muda de comensal para patogênico. Essa transição possibilita uma mudança no tipo celular, de levedura benigna para invasiva, como a morfologia hifal, o que ocasiona o desenvolvimento de doenças que variam de infecções tópicas, relativamente fáceis de tratar (como pé de atleta e candidíase oral), a infecções sistêmicas que podem causar mortalidade, como candidíase disseminada (profunda), especialmente candidemia, sendo uma das quatro principais causas de infecções na corrente sanguínea (Katsipoulaki *et al.*, 2024).

Candida spp. apresenta elevada patogenicidade e é reconhecida como uma das principais causas de infecções invasivas, estando a candidíase frequentemente associada ao uso de dispositivos médicos de longa permanência, como implantes dentários, cateteres, válvulas cardíacas, enxertos de *bypass* vascular, lentes oculares, articulações artificiais e shunts do sistema nervoso central, que funcionam como substratos para o crescimento de biofilmes (Amann; Kissmann; Firacative, 2025).

A patogênese da candidíase está relacionada à expressão de múltiplos fatores de virulência, entre os quais se destacam a adesão às superfícies do hospedeiro, a transição fenotípica de levedura para hifas, a formação de biofilmes e a secreção de enzimas hidrolíticas. Os mecanismos citados atuam de forma coordenada, iniciando-se pela adesão, seguida pela mudança morfológica e pela liberação de hidrolisados, que possibilitam a invasão e a infecção dos tecidos do hospedeiro (Farhan *et al.*, 2024).

Além disso, os biofilmes atuam como reservatórios de células patogênicas resistentes a drogas e à resposta imune do hospedeiro, potencializando o risco de infecções sistêmicas. Essas infecções sistêmicas estão associadas a altas taxas de mortalidade clínica, variando de 30% a 40%, e representam um grande desafio para o diagnóstico e tratamento clínico (Fan *et al.*, 2022).

Entre os antifúngicos mais utilizados para tratar infecções causadas por *C. albicans*, estão os antifúngicos da classe dos azóis, como fluconazol e miconazol. Esses antifúngicos têm como alvo a enzima Erg11p, codificada pelo gene *ERG11*. Essa enzima é responsável por remover o grupo C-14α-metil do lanosterol na via de biossíntese do ergosterol. A interrupção dessa via reduz o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática, inibindo o crescimento do patógeno (Li *et al.*, 2025).

3.1.5 *Candida tropicalis*

De acordo com Lima, Ribeiro e Colombo (2022), as colônias de *Candida tropicalis* cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (SDA) apresentam coloração branca a creme, textura cremosa, aparência lisa e, ocasionalmente, bordas miceliais levemente enrugadas. *C. tropicalis* é frequentemente isolada de secreções respiratórias e urinárias, em razão de sua capacidade de formar biofilmes em tubos traqueais e cateteres urinários permanentes, sendo comumente identificada em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, especialmente aqueles submetidos a cateterismo prolongado, ou aqueles que estão em tratamento com o uso de antibióticos de amplo espectro ou com diagnóstico de câncer (Dos Santos; Ishida, 2023).

Há diferenças marcantes nos sintomas e nos fatores de risco em infecções causada por *C. tropicalis* em comparação com *C. albicans*. Os fatores de virulência de *C. tropicalis* incluem a formação de biofilmes, que está associada a estadias prolongadas na unidade de terapia intensiva, maiores taxas de resistência e infecções mais persistentes, o que sugere maior virulência e resistência aos antifúngicos comumente utilizados quando comparada a *C. albicans* (Keighley *et al.*, 2024).

Os fatores de virulência de *C. tropicalis* incluem adesão a células epiteliais e endoteliais bucais, secreção de enzimas líticas, como proteinases, fosfolipases e hemolisinas, além da capacidade de alternar fenótipos. Além disso, *C. tropicalis* é também uma forte produtora de biofilmes, o que contribui para sua patogenicidade (Pristov; Ghannoum, 2019; Zuza-Alves; Silva-Rocha; Chaves, 2017). Além disso, *C. tropicalis* apresenta resistência significativa aos azóis, especialmente ao fluconazol, o que agrava o desafio no tratamento dessas infecções (Pristov; Ghannoum, 2019; Zuza-Alves; Silva-Rocha; Chaves, 2017). Essa espécie também foi listada pela OMS como patógeno prioritário de nível "alto" para o incentivo ao desenvolvimento de pesquisas voltadas para estratégias de controle das infecções e resistência fúngica (WHO, 2022).

3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MICROBIANA

A Resistência a Antimicrobianos (RAM) é um importante problema de saúde pública global, assim como também se constitui uma grave ameaça ao bem-estar populacional, podendo estar presente em microrganismos como os fungos, vírus, parasitas e mais frequentemente em bactérias (WHO, 2024). A RAM é definida como a ineficiência de um determinado fármaco em inibir o crescimento e multiplicação de microrganismos, onde esses organismos não respondem mais a dose dos medicamentos que anteriormente eram sensíveis, dificultando assim o tratamento padrão de infecções (Dadgostar, 2019).

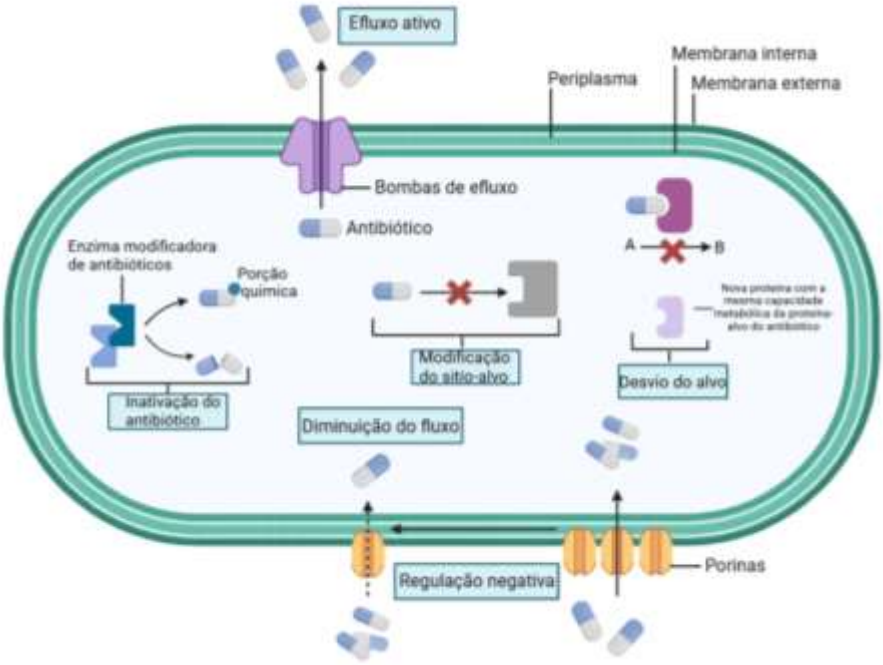
Existem inúmeros fatores que contribuem para o surgimento da resistência antibacteriana, dentre eles podemos destacar os seguintes: características biológicas e fisiológicas adquiridas pela evolução bacteriana através de mutações genéticas, o uso inadequado e excessivo de antibióticos, assim como também, o uso de fármacos na agricultura, além da insistência de medidas de controle de aquisição dessas drogas, como também, a falta de programas educacionais sobre os problemas da resistência microbiana (Chiș *et al.*, 2022; Dadgostar, 2019).

As bactérias podem adquirir resistência por meio de diversos mecanismos, como mutações, aquisição de genes de resistência exógenos, transferência de genes entre diferentes espécies bacterianas ou pela ativação de cascatas genéticas que levam à expressão de mecanismos de resistência (Chiș *et al.*, 2022). Os genes associados a esses mecanismos podem estar localizados nos cromossomos de bactérias do tipo selvagem ou em elementos extracromossômicos, como plasmídeos de resistência e transposons (Kumar; Schweizer, 2005; Munita; Arias, 2016).

Para identificar a suscetibilidade a resistência de um determinado microrganismo a um fármaco é realizado um ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), em que é verificada a concentração mínima do antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano (Reygaert, 2018; Kadeřábková; Mahmood; Mavridou, 2024). A resistência microbiana aos fármacos pode ocorrer de duas formas, a primeira é a resistência intrínseca, onde não é necessário que o microrganismo entre em contato com o antibiótico para desencadear esse tipo de resistência e não é adquirida pela transferência horizontal de genes, sendo essa característica representativa da espécie e controlada pelo genoma bacteriano (Fajardo *et al.*, 2008). A segunda é a resistência adquirida, a qual está presente em microrganismos que tiveram previamente o contato com antibióticos que antes eram susceptíveis, ou seja, as mutações ou os genes responsáveis por essa resistência não estavam presentes anteriormente nesses microrganismos (Duranti *et al.*, 2017; Malmir *et al.*, 2018).

Dentre os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias estão: alteração da permeabilidade da membrana, modificação do alvo da droga, inativação da ação de uma droga, bem como, o efluxo ativo, nos parágrafos seguintes serão descritos cada um deles (Reygaert, 2018). A Figura 2 apresenta uma visão geral dos mecanismos de resistência presentes em uma célula bacteriana.

Figura 2. Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência bacteriana a antibióticos



Fonte: elaborado pela autora, 2025

As alterações na permeabilidade da membrana a antibióticos são ocasionadas por modificações na constituição da superfície celular das bactérias, um exemplo, são as mudanças na expressão de proteínas que estão presentes na membrana externa desses organismos (Nishino *et al.*, 2021).

Alterações na estrutura das porinas foram identificadas como fatores importantes para a resistência aos antibióticos, evidenciando que essas estruturas não são evolutivamente estáticas. O avanço no entendimento da relação estrutura-função das porinas tem contribuído para esse conhecimento. A redução do influxo de antibióticos que ocorre devido a mudanças na estrutura da membrana pode estar associado com a regulação negativa das porinas, que são proteínas transmembranares responsáveis pelo transporte passivo de diversos compostos,

incluindo antibióticos, para o interior da célula bacteriana (Darby *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2023).

Outra estratégia bastante utilizada pelas bactérias para o desenvolvimento de resistência é a modificação do alvo das drogas, evitando assim a ação do antibiótico sobre o crescimento bacteriano. Essa modificação do alvo pode ocorrer através de mutações nos genes que codificam o local alvo ou através de alterações enzimáticas nos locais de ligação do antibiótico, as quais diminuem a afinidade da molécula da droga se ligar ao alvo (Vivekanandan *et al.*, 2025).

As bactérias podem tornar os antibióticos ineficazes por meio da modificação ou inativação enzimática da droga. Nesse processo, enzimas bacterianas podem hidrolisar grupos funcionais dos antibióticos ou promover modificações químicas por transferência covalente de grupos como acetil, metil ou fosfato, o que impede a ligação do fármaco ao seu alvo e elimina sua atividade antibacteriana sobre diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Darby *et al.*, 2023). Outro ponto importante é que grande parte desses antibióticos que são modificados enzimaticamente tem o seu alvo de ação nos ribossomos, os quais agem inibindo a síntese proteica (Wilson, 2014).

Já o mecanismo de efluxo ativo é caracterizado pela extrusão de substâncias que possuem estruturas quimicamente não relacionadas e é promovido por proteínas transmembrana chamadas de bombas de efluxo, as quais em geral utilizam energia para expulsar ativamente essas drogas que não sofrem alteração ou degradação (Kornelsen; Kumar, 2021).

Fungos também apresentam estratégias que comprometem a eficácia dos agentes antifúngicos, incluindo três tipos de resistência: primária ou intrínseca, observada antes da exposição aos antifúngicos; secundária ou adquirida, que surge após o contato com esses agentes e pode ser transitória, decorrente de adaptação temporária, ou persistente, resultante de alterações genéticas; e resistência clínica. Esta última é caracterizada pela incapacidade de eliminar uma infecção fúngica mesmo com o uso de um antifúngico que apresenta atividade *in vitro* contra o organismo, sendo essa falha resultado de uma combinação de fatores relacionados ao hospedeiro, ao antifúngico ou ao patógeno (Lee; Robbins; Cowen, 2023; Macedo; Dias, 2024; Vitiello *et al.*, 2023).

A levedura patogênica pode evitar a ação antifúngica por dois mecanismos principais: (1) alterações na interação entre o medicamento e seu alvo, que podem ocorrer devido a mudanças na sequência de aminoácidos da proteína alvo, alterando sua estrutura, ou pela superexpressão da proteína alvo e (2) pela redução da concentração citoplasmática do medicamento por meio de modificações na parede celular que diminuem sua absorção ou pela

superexpressão de bombas de efluxo, responsáveis por exportar as moléculas do medicamento para fora da célula (Czajka *et al.*, 2023; Garcia-Effron, 2021).

Dois tipos de transportadores de membrana desempenham um papel importante na resistência aos azóis: os transportadores da Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP) (ATP *Binding Cassette* - ABC) e os transportadores da Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* - MFS). Os ABC-Ts utilizam energia da hidrólise de ATP para facilitar o transporte de moléculas através das membranas, enquanto os MFS-Ts dependem de um gradiente de prótons na membrana plasmática para expulsar moléculas estranhas, incluindo azóis. Ambos os tipos de transportadores podem se ligar aos azóis como substrato, exportando o medicamento para fora da célula, o que reduz sua concentração intracelular e permite que a célula fúngica contorne os efeitos antifúngicos (Czajka *et al.*, 2023; Lee; Robbins; Cowen, 2023; Banerjee *et al.*, 2022; Sanglard *et al.*, 1996).

Para o tratamento de infecções antifúngicas, existem apenas três classes principais de medicamentos antifúngicos na prática clínica para o tratamento de doenças fúngicas invasivas (Li *et al.*, 2025). Os polienos, como a nistatina e anfotericina B, constituem a classe mais antiga de antifúngicos utilizada na prática médica para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e exercem atividade fungicida por meio de sua natureza anfipática, que lhes permite formar agregados extramembranosos e extrair o ergosterol essencial das bicamadas lipídicas da membrana plasmática, funcionando de maneira semelhante a uma "esponja de esterol" (Puumala *et al.*, 2024). Apesar de exibirem bioatividade de amplo espectro contra espécies de leveduras e fungos, a significativa toxicidade no hospedeiro limita seu uso clínico. No entanto, a anfotericina B permanece como tratamento de escolha em locais com recursos limitados, especialmente contra infecções por *Cryptococcus neoformans* (Roemer; Krysan, 2014).

A segunda classe são os azóis, como o fluconazol, os quais estão incluindo em uma classe de compostos heterocíclicos de cinco membros amplamente utilizados na clínica por décadas para tratar infecções fúngicas sistêmicas. Semelhantes aos polienos, os azóis têm como alvo a membrana celular fúngica, mas atuam de forma fungistática contra *Candida*, inibindo o citocromo P450 lanosterol 14-α-desmetilase (Erg11). Essa ação bloqueia a biossíntese de ergosterol e causa o acúmulo de um esterol tóxico intermediário produzido pela Δ-5,6-dessaturase (Erg3) (Vanreppelen; Wuyts; Dijck, 2023). Embora os azóis sejam geralmente bem tolerados, seu potencial para interferir no metabolismo de outros medicamentos devido à inibição do citocromo P450 de mamíferos é uma desvantagem significativa (Roemer; Krysan, 2014).

As equinocandinas compõem a terceira classe, como a caspofungina, são hexapeptídeos cíclicos com cadeias laterais lipídicas que têm como alvo a parede celular do fungo, inibindo a (1,3) -β-D-glucana sintase. Os antifúngicos dessa classe exercem atividade fungicida contra *Candida* e fungistática contra *Aspergillus*, tornando-se uma importante ferramenta no tratamento de infecções fúngicas invasivas (Roemer; Krysan, 2014).

3.2.1 Efluxo ativo mediado por Proteínas

As bombas de efluxo bacteriana são constituídas pela integração de várias proteínas que estão localizadas e inseridas na membrana plasmática das bactérias e tem como papel principal reconhecer substâncias nocivas que conseguem atravessar a parede celular das bactérias e chegar ao periplasma ou citoplasma, e então o mecanismo de efluxo funciona expulsando essas substâncias para o exterior da célula bacteriana, antes de atingirem os alvos pretendidos (Garcia *et al.*, 2022).

Além disso, as bombas de efluxo também tem como função proteger as bactérias do estresse ambiental, promovendo respostas ao estresse oxidativo, bem como participam da formação de biofilmes, são fatores de virulência e são responsáveis por mecanismos de resistência a antibióticos (Huang *et al.*, 2022). Esses transportadores podem estar presentes e expressos tanto em bactérias Gram-positivas como em bactérias Gram-negativas, bem como em células eucarióticas.

Proteínas do mecanismo de efluxo podem ser codificadas por genes que estão localizados em cromossomos ou em elementos genéticos móveis, podendo ser responsáveis pelo transporte apenas de uma determina substância ou mais de uma substância, tendo um espectro maior de resistência e sendo classificadas como bombas Multidrogas Resistentes (MDR). Dentre as substâncias as quais as bombas conferem resistência estão vários antimicrobianos como fluorquinolonas, tetraciclinas, aminoglicosídeos e polimixinas (Garcia *et al.*, 2022).

No que se refere a energia utilizada para o seu funcionamento, as bombas de efluxo podem utilizar duas fontes distintas de energia, a primeira é a força do gradiente eletroquímico de prótons através da membrana citoplasmática e o segundo, é a utilização da energia obtida a partir da hidrolise de Adenosina Trifosfato (ATP) (Siasat; Blair, 2023).

As bombas de efluxo são classificadas e agrupadas em seis famílias distintas com base em critérios como a organização estrutural, o número de regiões transmembrana, as fontes de energia utilizadas para o seu funcionamento e os tipos de substratos que são expulsos (Thakur; Uniyal; Tiwari, 2021). De acordo com essa classificação, reconhecem-se: (1) a Superfamília de Cassete de Ligação de Adenosina Trifosfato (ATP *Binding Cassette* – ABC),

(2) a Superfamília Facilitadora (*Major Facilitator Superfamily* – MFS), (3) a Família de Resistência a Multidrogas Pequena (*Small Multidrug Resistance* – SMR), (4) a Superfamília de Divisão de Nodulação de Resistência (*Resistance Nodulation Division* – RND), (5) a Família de Extrusão de Compostos Tóxicos e Multidrogas (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion* – MATE) e (6) a Família de Efluxo de Compostos Antimicrobianos de Proteobactérias (*Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* – PACE) (Du *et al.*, 2018; Piddock, 2006).

Os membros da família ABC utilizam como fonte de energia a hidrólise de ATP para expulsar uma variedade de compostos, como açucares, aminoácidos, polissacarídeos e antibióticos. A sua estrutura é composta por complexos multi-proteínas e por proteínas citoplásmicas que desenvolvem atividade ATPase, as quais promovem a hidrolise do ATP (Locher, 2009; Moussatova *et al.*, 2008).

Uma das famílias que possui uma variedade de membros sequenciados é a MFS, onde as bombas de efluxo inseridas nessa família utilizam a força de motriz de prótons e estão presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, exportando íons, açúcares, fosfatos de açúcar, antimicrobianos e aminoácidos (Bhaskar *et al.*, 2016). Os transportadores dessa família podem ser uniportadores (transportam um único substrato), simportadores (transportam um substrato em associação com um íon de acoplamento) ou antiportadores (transportam um substrato e um co-substrato em direções opostas) (Quistgaard *et al.*, 2016; Elbahnsi *et al.*, 2024).

As proteínas de efluxo incluídas na família SMR utilizam a força motriz de prótons e são constituídas por quatro transmembranas α-hélices, as quais possuem de 100-140 aminoácidos de comprimento (Burata *et al.*, 2022). Os compostos quaternários (QAC) e ceras lipofílicas são as substâncias transportadas por essas proteínas de efluxo (Lu *et al.*, 2024).

Os transportadores inseridos na família RND são considerados os mais importantes na resistência de antibióticos em bactérias Gram-negativas e possui uma grande especificidade de substratos (Klenotic *et al.*, 2021). Esses transportadores são caracterizados como um complexo tripartido, o qual é composto pela proteína da membrana interna, uma proteína de fusão de membrana e uma proteína presente na membrana externa, permitindo a formação de um canal contínuo por onde passam os substratos, utilizando a força do gradiente de prótons (Kavanaugh *et al.,* 2024).

A energia utilizada pelos membros da família MATE é adquirida através do gradiente de H^+ ou Na^+ para transportar drogas (Lu, 2016). As proteínas inseridas nessa família compartilham cerca de 40 % de similaridade na sequência de proteínas, as quais são agrupadas em duas subfamílias: NorM e DinF.

Adicionalmente foi descoberta a família PACE, cujo membros dessa família foi encontrado na bactéria Gram-negativa *Acinetobacter baumannii*, onde caracterizaram uma proteína de efluxo chamada de AceI. As proteínas inseridas nessa família podem conferir resistência a uma variedade de biocidas utilizados como desinfetantes e antissépticos (Hassan *et al.*, 2013, 2018).

3.2.1.1 Bomba de efluxo NorA

A proteína de efluxo NorA apresenta 388 aminoácidos distribuídos em 12 segmentos transmembrana e está inserida na Superfamília Maior Facilitadora (MFS). O gene *norA* codifica a bomba de efluxo NorA e foi identificado pela primeira vez isolados de *S. aureus* e está associado a resistência as fluoroquinolonas, vários antissépticos e desinfetantes (Costa *et al.*, 2019; Kaatz; Seo; Ruble, 1993)

A diversidade genética do gene *norA* é devido a presença de três alelos: *norAI*, *norAII* e *norAIII* (Kaatz; Seo; Ruble, 1993; Yoshida *et al.*, 1990). E a sua transcrição é regulada por um sistema composto de dois componentes ArlRS e por um regulador global de transcrição MgrA, sendo ArlRS responsável pela regulação de fatores como a adesão, autólise e atividade proteolítica do *S. aureus* (Deng *et al.*, 2012; Fournier; Aras; Hooper, 2000).

3.3 BUSCAS POR PRODUTOS ANTIMICROBIANOS PARA O CONTROLE DE MICRORGANISMOS RESISTENTES

A crescente crise da resistência aos antibióticos exige o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a eficácia dos medicamentos existentes e controlar o aumento da resistência. Nesse contexto, têm-se explorado novas abordagens terapêuticas, com destaque para os produtos naturais derivados de plantas e animais como alternativas no controle dessa resistência (Coutinho *et al.*, 2008). Esses produtos são investigados não apenas por suas propriedades antimicrobianas, mas também pelo potencial de modificar a resistência bacteriana associada a fármacos já disponíveis no mercado.

Os produtos naturais que apresentam esse efeito são conhecidos como adjuvantes e têm se destacado como uma estratégia promissora para combater a resistência a múltiplos medicamentos e restaurar a eficácia dos antibióticos disponíveis no mercado. Esses compostos, administrados em conjunto com antibióticos, potencializam a atividade antimicrobiana dos fármacos (Kumar *et al.*, 2023). Os produtos naturais que são caracterizados como adjuvantes possuem pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana

isoladamente, mas atuam inibindo os mecanismos de resistência, promovendo maior absorção do antibiótico através da membrana bacteriana, bloqueando bombas de efluxo e modificando a fisiologia das células resistentes, como a dispersão de biofilmes em células planctônicas (Mulani *et al.*, 2019).

Os produtos naturais apresentam atividade antibacteriana através de distintos mecanismos de ação, incluindo a capacidade de dissolver componentes das membranas bacteriana, como os lipídeos e as proteínas, causando modificações na sua estrutura, como a abertura de espaços na membrana, dificultando a execução de processos metabólicos essenciais para a sobrevivência das bactérias, como a geração de energia celular bacteriana através da cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, diminuindo a absorção de nutrientes e dificultando a atividade enzimática (Desbois; Smith, 2010; Pereira *et al.*, 2018).

Além disso, os produtos naturais podem inibir a síntese de ácidos nucleicos que também afetam o metabolismo energético das bactérias, inibir a expressão de proteínas, como também, inibir o funcionamento das bombas de efluxo presentes nesses organismos (Aldulaimi, 2017; Seukep *et al.*, 2020).

3.3.1 Inibidores de Bomba de Efluxo - IBEs

Substâncias que minimizam ou bloqueiam o transporte ativo de antibióticos para o exterior da célula bacteriana são denominadas Inibidores de Bomba de Efluxo – IBEs. O seu mecanismo de ação consiste em aumentar a concentração intracelular de drogas terapêuticas nas células bacterianas portadoras de bombas de efluxo (Shin; Prabhakaran; Kim, 2018).

Para inibir o mecanismo de ação das bombas de efluxo, os IBEs podem regular a expressão de genes que codificam a resistência a antibióticos mediada por bombas de efluxo, modificar a estrutura química da molécula dos antibióticos, tornando-os irreconhecíveis pelas bombas de efluxo, inibindo o processo de montagem das estruturas das bombas, alterando os mecanismos que geram energia para o funcionamento das bombas de efluxo (Divakar; Lama; Asad, 2019).

Diversas classes de substâncias sintéticas podem apresentar atividade antibacteriana, dentre estas estão as fenotiazinas, enquanto as fontes naturais incluem os flavonoides, terpenos, compostos fenólicos, podendo ser uma alternativa viável para a produção de novos medicamentos eficazes contra microrganismos multirresistentes (Menezes *et al.*, 2025; Silveira *et al.*, 2025).

3.4 ABELHAS SEM FERRÃO – ASF

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) são um grupo de insetos considerados altamente eussociais entre as abelhas nativas dos trópicos e subtópicos, especialmente nos neotrópicos (Rasmussen, 2013). Sua ampla distribuição reporta a sua importância no equilíbrio ecológico como polinizadores de plantas nativas e culturas silvestres.

São organismos generalistas, recolhendo néctar e pólen a partir de uma vasta variedade de espécies de plantas (Toledo-Hernández *et al.*, 2022). Esse grupo é considerado o maior grupo entre as abelhas eussociais na Terra. Para o Brasil, são registradas 259 espécies válidas de abelhas sem ferrão, distribuídas em 28 gêneros (Nogueira, 2023; Pedro, 2014). Entre as espécies de Meliponini registradas para a fauna brasileira, aproximadamente 103 espécies são endêmicas e correspondem a cerca de 40% das espécies de abelhas sem ferrão do Brasil (Nogueira, 2023).

As abelhas sem ferrão diferenciam-se de outras abelhas por características morfológicas específicas de suas asas, como veias cruzadas submarginais fracas ou ausentes e a segunda veia recorrente na asa anterior, além da presença do ferrão não funcional nessas espécies, característica que está associada a denominação que receberam (Michener, 2013). As espécies de abelhas sem ferrão vivem em colônias compostas por dezenas a centenas de milhares de operárias e, geralmente, uma única rainha, enquanto o número de machos presentes na colônia pode variar, oscilando entre nenhum e algumas dúzias. Os machos e operárias são geralmente semelhantes em tamanho e aparência, enquanto as rainhas apresentam diferenças morfológicas marcantes, tendo sua alimentação baseada em néctar e pólen coletados pelas operárias forrageiras (Michener, 2013; Toledo-Hernández *et al.*, 2022).

A relevância ecológica das abelhas está diretamente ligada ao serviço ecossistêmico que desempenham por meio da polinização das angiospermas, um fenômeno biológico essencial tanto em ambientes naturais quanto em áreas de cultivo. A polinização é fundamental para a manutenção da variabilidade genética das plantas, além de ser crucial para a conservação da biodiversidade e da vida no planeta (Giannini *et al.*, 2017). Contudo, as recompensas florais fornecidas pelas plantas durante o processo de polinização não são o único requisito necessário para que as abelhas ocupem e permaneçam em um ambiente, também é necessário a presença de substratos adequados para nidificação, condições climáticas favoráveis e outros fatores essenciais, tanto em ecossistemas naturais quanto em locais cultivados (Barros *et al.*, 2022; Ollerton, 2017).

Sob uma perspectiva ecológica, compreender a diversidade taxonômica e funcional das abelhas é indispensável para aprofundar o entendimento sobre o funcionamento dos ecossistemas, promovendo a conservação da biodiversidade, a segurança alimentar e a subsistência humana (Borges *et al.*, 2020; Campbell *et al.*, 2022). No entanto, as abelhas sem ferrão estão sofrendo os impactos decorrentes da devastação de seus habitats, mudanças climáticas globais e competição de recursos pela introdução de outras abelhas, como *Apis mellifera* (Jaffé *et al.*, 2019). Este declínio nas populações de espécies polinizadoras é preocupante porque pode levar a um declínio paralelo nas espécies de plantas (Toledo-Hernández *et al.*, 2022).

Além de desempenharem um papel fundamental na polinização, as abelhas sem ferrão também possuem importância econômica, uma vez que o mel produzido por elas é frequentemente comercializado em pequena e média escala por diversas comunidades. Além disso, essas abelhas produzem outros derivados como própolis, geoprópolis, "saburá", cerume e resinas, os quais são importantes na medicina popular.

3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS BIOPRODUTOS DERIVADOS DE ABELHAS SEM FERRÃO

A prática da meliponicultura, que consiste na criação de abelhas sem ferrão para a produção de mel e outros subprodutos, é uma atividade realizada desde tempos antigos por comunidades tradicionais em regiões tropicais e subtropicais (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006; Delgado; Mejía; Rasmussen, 2020). Os produtos das abelhas sem ferrão, como mel, pólen fermentado ("saburá"), cera e própolis, têm sido utilizados tanto para alimentação quanto para fins terapêuticos tradicionais ao longo de séculos (Rocha, Vítor Moreira *et al.*, 2023; Pereira; Serrão, 2017).

Os bioprodutos das abelhas sem ferrão como o mel e a própolis, possuem alto valor comercial e são amplamente coletados por comunidades para utilização em alimentos, medicamentos, além de práticas religiosas e culturais (Goh *et al.*, 2023). Cada grupo indígena ou comunidade rural interage com as abelhas sem ferrão de forma única, refletindo uma diversidade de visões de mundo e práticas imersas em diferentes contextos culturais (Aldasoro Maya *et al.*, 2023).

A composição química desses produtos da meliponicultura incluem quantidades significativas de metabólitos secundários como fitoesteróis, compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos e outras substâncias biologicamente ativas (Popova *et al.*, 2021; Tran *et al.*, 2020), as quais estão associados a atividade antioxidante, anti-inflamatória (Lopes *et al.*, 2020),

antimicrobiana (Bonamigo *et al.*, 2017) e citotóxica (Arung *et al.*, 2021) já descritas na literatura.

3.5.1 Mel

Os méis pertencem a uma classe de substâncias naturais que têm despertado grande interesse devido ao seu alto potencial terapêutico. Historicamente, o mel tem sido amplamente utilizado pela humanidade não apenas como um nutriente, mas também como um remédio (Sousa *et al.*, 2016). Trata-se de uma substância doce e natural produzida pelas abelhas a partir da coleta do néctar de flores, secreções de partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas (Ngalimat *et al.*, 2020).

Diferentemente de outras abelhas, as que não possuem ferrão apresentam menor produtividade de mel quando comparadas a *Apis melífera*, além disso, outro diferencial é armazenamento do mel em potes verticais feitos de cerume (Abd Jalil; Kasmuri; Hadi, 2017; de Lima *et al.*, 2017). O cerume, por sua vez, é uma mistura semelhante à própolis, mas com a adição da secreção mandibular das abelhas sem ferrão durante sua construção (Nordin *et al.*, 2018).

Nos potes de cerume, o néctar passa por três processos distintos de transformação antes de se transformar em mel. O primeiro é uma transformação física, caracterizada pela evaporação de grande parte da água presente no néctar. Em seguida, ocorre uma transformação biológica, onde ocorre um processo de fermentação realizado por leveduras e bactérias. Esses microrganismos, oriundos de um microambiente adequado selecionado pelas abelhas, desempenham um papel simbiótico com a colônia (Anderson *et al.*, 2011; Menezes *et al.*, 2013). Entre os microrganismos presentes nas colmeias, destacam-se bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, que são reconhecidas por sua capacidade de prevenir a deterioração do mel ao inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (Ngalimat *et al.*, 2020).

Por último, há uma transformação química, na qual as abelhas operárias secretam enzimas de suas glândulas cefálicas, capazes de hidrolisar a sacarose do néctar em frutose e glicose (Menezes *et al.*, 2013). Embora seja evidente que as características do mel variam com a espécie de abelha, as fontes de néctar e o clima, uma característica notável do mel de abelha sem ferrão é seu elevado teor de umidade, maior acidez, menor composição de açúcar e menor atividade enzimática das abelhas sem ferrão em comparação com abelhas *Apis mellifera* (Abd Jalil; Kasmuri; Hadi, 2017; Nordin *et al.*, 2018).

Embora não sejam patogênicas, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* influenciam a composição química do mel ao assimilar compostos nutritivos presentes,

especialmente açúcares de fácil digestão, e produzir metabólitos como ácidos voláteis inferiores, álcoois e seus ésteres. Esses compostos, juntamente com os voláteis de origem vegetal, desempenham um papel essencial nas características organolépticas do mel, como sabor e o aroma, que impactam a aceitação do consumidor (Isidorov *et al.*, 2023). Além disso, a origem floral e as espécies de abelhas são fatores determinantes nas propriedades físico-químicas, organolépticas e nutracêuticas do mel (Silva *et al.*, 2017).

3.5.2 Própolis e Geoprópolis

A própolis, também conhecida como “cola de abelha", é um material pegajoso e viscoso de cor escura produzido pela mistura de secreções das abelhas, como saliva e cera, com resinas vegetais ativamente secretadas ou exsudadas pelas plantas. As abelhas sem ferrão, em particular, depositam resinas vegetais próximas à entrada dos ninhos para evitar invasões, além de armazená-las em grandes depósitos dentro dos ninhos, destacando a importância desse recurso para sua sobrevivência (Leonhardt; Blüthgen, 2009).

Como material essencial para a construção do ninho e para a saúde da colônia, a própolis é utilizada para selar a colmeia, impedir a entrada de ar e de visitantes indesejados, como cupins e formigas, além de atuar como agente antimicrobiano, prevenindo o crescimento de bactérias e fungos (Leonhardt; Blüthgen, 2009; Ngalimat *et al.*, 2020). De maneira geral, destaca-se como uma rica fonte de antioxidantes, característica que justifica a frequência com que sua atividade antioxidante é relatada na literatura cientifica. Além disso, outra propriedade amplamente avaliada da própolis de abelhas sem ferrão é sua atividade antimicrobiana (Popova; Trusheva; Bankova, 2021).

Algumas espécies de abelhas sem ferrão, como *Melipona scutellaris*, *Melipona marginata* e *Melipona quadrifasciata* produzem o geoprópolis, composto por própolis misturada ao solo. Assim como a própolis, a geoprópolis desempenha um papel importante na defesa e estruturação do ninho, mas apresenta características físicas e químicas distintas devido à adição de solo. Essa mistura confere maior rigidez ao material e resulta em perfis químicos específicos, como a composição mineral, diretamente relacionada ao tipo de solo presente na região onde é produzida (da Cruz Ferreira *et al.*, 2021; Popova *et al.*, 2021).

3.5.3 Pólen fermentado (“Saburá”)

O pólen fermentado, também conhecido como “pão de abelha”, “pólen de pote”, “pólen armazenado” ou “ambrosia”, é o pólen de abelha obtido a partir de grãos de pólen coletados pelas abelhas. Esses grãos são misturados com secreções das glândulas salivares ou

néctar antes de serem armazenados e submetidos a fermentação nos potes de armazenamento (Ngalimat *et al.*, 2020). No Brasil, esse produto é conhecido como "saburá" e pode alcançar um alto valor de mercado (Mohammad; Mahmud-Ab-Rashid; Zawawi, 2021).

Durante a coleta, as abelhas utilizam enzimas salivares, como amilase e glicosidase, e mel para umedecer, aglutinar e embalar o pólen em estruturas chamadas de corbículas, localizadas nas patas traseiras (Salma; Nor; Norhasnida, 2021). O pólen coletado, que é rico em proteínas, é essencial para a alimentação das abelhas jovens e das crias na colmeia. Contudo, ele é geralmente fornecido às crias na forma de pólen fermentado, que passa por um processo de fermentação natural após ser armazenado nas células do favo.

O pólen fermentado, altamente nutritivo, é composto por 55% de carboidratos, 35% de proteínas, 3% de minerais e vitaminas, 2% de ácidos graxos e 5% de outras substâncias antioxidantes, como beta-caroteno, licopeno, selênio, flavonoides e vitaminas C, E e K (Souza *et al.*, 2006). Seu sabor, característico de arbustos, mistura notas doces e azedas com um toque frutado, resultado das resinas vegetais usadas pelas abelhas na construção das colmeias e dos potes de pólen. O sabor pode variar ao longo do ano, dependendo das flores e árvores visitadas.

O pólen fermentado produzido pelas abelhas sem ferrão apresenta valores terapêuticos variados, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, atividade antitumoral e anti-hipertensiva (Mărgăoan *et al.*, 2019; Thakur; Nanda, 2020). Sua composição nutricional é influenciada por diversos fatores, como a origem botânica, a localização geográfica, as condições climáticas, o tipo de solo, as práticas apícolas e as espécies de abelhas envolvidas na sua produção, resultando em uma composição química diversa (Combey, 2017).

3.6 ESPÉCIE DE ABELHA SEM FERRÃO *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

Tetragonisca angustula (Latreille, 1811) é uma das espécies de abelhas indígenas sem ferrão neotropicais, conhecida popularmente como Jataí, tendo ampla distribuição em território brasileiro. A sua morfologia é caracterizada pelo seu tamanho pequeno, possuir uma cor dourada e pode ser encontrada em troncos ocos de árvores ou muros de pedra (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984). Foi relatado na literatura que *T. angustula* apresenta comportamento de defesa do ninho, visto que abelhas guarda foram observadas defendendo o seu ninho e evitando ataque de outras insetos (Wittmann, 1985). A Figura 3 mostra indivíduos de *T. angustula* na entrada do ninho. Devido à sua ornamentação e beleza, essa espécie é amplamente manejada na meliponicultura.

Figura 3. Indivíduos de *Tetragonisca angustula* localizados na entrada do ninho



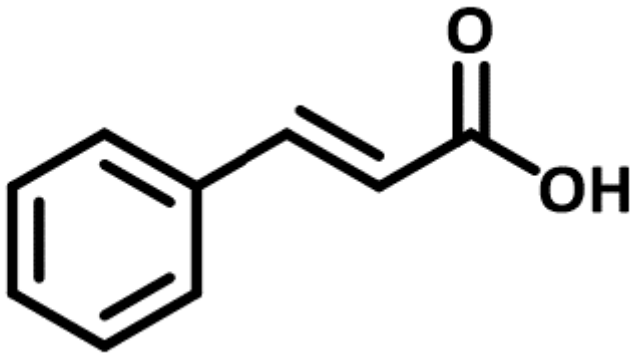
Fonte: elaborado pela própria autora, 2024

Os subprodutos dessa abelha sem ferrão têm sido pouco explorados quanto a suas propriedades biológicas e ao seu perfil químico. Entretanto existem estudos que relatam a atividade antioxidante do mel dessa espécie, propriedades antimicrobianas da própolis sobre cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Barreiras *et al.*, 2019; Lima, C. O. *et al.*, 2024). Essas atividades biológicas estão intimamente associadas a composição química desses subprodutos que tem apresentado altas concentrações de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos (Lima, J. S. *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2022). Nesse contexto, considerando a relevância dos ácidos fenólicos na atividade biológica atribuída aos bioprodutos de *T. angustula*, destaca-se o ácido *trans*-cinâmico, um composto frequentemente associado na literatura aos bioprodutos dessa espécie, cuja caracterização e importância são abordadas a seguir.

3.6.1 Ácido *trans*-cinâmico nos Bioprodutos de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

O ácido cinâmico é um polifenol bioativo da classe dos ácidos fenólicos e um dos metabólitos secundários vegetais mais abundantes. Quimicamente, é um ácido graxo de baixa toxicidade em humanos, composto por um anel fenil substituído por um grupamento ácido acrílico, que geralmente se apresenta na geometria *trans* (Figura 4) (De; Baltas; Bedos-Belval, 2011). É encontrado em diversas plantas, como canela, uva, chá, cacau, espinafre e aipo (Feng *et al.*, 2022). Além disso, têm sido relatados na literatura a sua presença em bioprodutos da abelha sem ferrão *T. angustula* (Macêdo *et al.*, 2023).

Figura 4. Estrutura química do ácido *trans*-cinâmico



Fonte: elaborado pela própria autora, 2025

Na biossíntese natural, o ácido t*rans*-cinâmico é sintetizado a partir da L-fenilalanina, que é produzida pela via do chiquimato, uma importante fonte de compostos aromáticos celulares. A L-fenilalanina é desaminada em ácido *trans*-cinâmico pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que catalisa a desaminação não oxidativa da amônia da L-fenilalanina (Bang *et al.*, 2018). Diversos estudos destacam o amplo espectro de atividades biológicas do ácido *trans*-cinâmico, incluindo suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e anticancerígenas (Adisakwattana, 2017; Sova, 2012; Yilmaz; Sova; Ergün, 2018). Além disso, ele apresenta alto potencial para aplicações na indústria alimentícia e cosmética, devido a seus efeitos benéficos relatados recentemente (Bang *et al.*, 2018).

4.1. CAPÍTULO I: Visitação floral, atividades fitoquímicas e biológicas de bioprodutos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Uma revisão

Artigo em português/ Revista: Chemistry & Biodiversity
Qualis: A4 | Situação: Publicado | DOI: 10.1002/cbdv.202301451

Nair Silva Macêdo[a*], Zildene de Sousa Silveira[b], Ângella Eduarda da Silva Sousa[c], Débora Menezes Dantas[a], Amanda Lins Bispo Monteiro[d], Helcio Silva dos Santos[e], Francisco Assis Bezerra da Cunha[a]

a. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica - PPQB da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brasil
b. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PPGCB da Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil
c. Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos – LBSA da Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, Ceará, Brasil
d. Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil
e. Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral, Ceará, Brasil

Resumo

Tetragonisca angustula (Latreille, 1811) é uma abelha indígena sem ferrão neotropical, conhecida popularmente como Jataí, tendo ampla distribuição em território brasileiro. *T. angustula* produz outros derivados como própolis, geoprópolis, pólen fermentado (saburá), cerume e resinas, os quais são importantes na medicina popular. Nessa revisão, o objetivo foi reunir as pesquisas sobre as principais espécies de plantas visitadas por *Tetragonisca angustula*, bem como, os estudos que verificaram a composição a química e as propriedades biológicas dos bioprodutos de *T. angustula*. O levantamento bibliográfico foi executado através de buscas nos bancos de dados Scopus, Web of Science, ScienceDirect e PubMed, abrangendo publicações de 2003 a fevereiro de 2023 referente as atividades biológicas, com destaque para a antibacteriana e antioxidante. Essas atividades biológicas são de grande

interesse científico, pois podem ter implicações significativas na saúde e bem-estar para os seres humanos. Foram encontrados 78 estudos que analisaram as interações entre *T. angustula* e espécies florais, sendo as espécies das famílias botânicas Fabaceae, Asteraceae, Malvaceae, Bignoniaceae, Solanaceae, Myrtaceae e Lamiaceae as mais relatadas como principais fontes de alimento para esta espécie. A presença de compostos pertencentes à classe dos flavonoides, ácidos fenólicos, terpenóides e alcalóides foi identificada através do estudo da composição química do mel, própolis, geoprópolis e pólen fermentado (saburá) em 21 estudos. Os dados recolhidos na literatura enfatizam que estes produtos de *T. angustula* têm propriedades biológicas notáveis, especialmente as suas atividades antibacterianas e antioxidantes.

Palavras-chave: Serviços ecossistêmicos; Interações planta-polinizador; Quimiodiversidade; Propriedades terapêuticas.

Introdução

As Abelhas Sem Ferrão (ASF) pertencem à família Apidae, ordem Hymenoptera e tribo Meliponini, e são caracterizadas pela atrofia no ferrão (Torres; Hoffmann; Lamprecht, 2007). Por não possuírem um ferrão como principal forma de defesa, essas abelhas desenvolveram outras estratégias de defesa como uma mordida forte, liberação de ácido fórmico presente nas glândulas mandibulares, a utilização de feromônios de alarme e bloqueio da entrada da colônia (Tran *et al.*, 2020; Zweden *et al.*, 2011).

Estima-se que os Meliponíneos constituem um grupo com cerca de 600 espécies de abelhas sem ferrão com ampla distribuição em regiões neotropicais, sendo difundida em Países da América do Sul (Roubik, 2023). A diversidade das espécies está representada na distribuição em mais de 36 gêneros (Cabe; Farina, 2010). O Brasil abriga cerca de 43% dessa diversidade de abelhas sem ferrão, com registros de cerca de 259 espécies de ASF distribuídas em 28 gêneros, das quais cerca de 40% são endêmicas do Brasil, num total de 103 espécies (Nogueira, 2023).

As abelhas sem ferrão desempenham um importante papel na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas naturais através do processo de polinização, sendo responsáveis por aproximadamente 40-90% da reprodução das espécies florais (Carvalho; Marchini; Ros, 1999; Koling; Moretto, 2010; Tran *et al.*, 2020). Além disso, os Meliponíneos produzem bioprodutos como mel, cera, própolis e geoprópolis, que são armazenados em potes separados e estrategicamente posicionados ao longo da colônia (Grüter; Kärcher; Ratnieks, 2011; Jones *et al.*, 2012). De acordo com os dados disponíveis na literatura, esses bioprodutos apresentam

atividades biológicas como atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antiprotozoária, e esses efeitos estão associados à presença de metabólitos secundários como flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides e alcaloides em sua composição (Maciel *et al.*, 2015; Velikova *et al.*, 2000; Villacrés-Granda *et al.*, 2021; Zamora *et al.*, 2014, 2015).

Dentre as inúmeras espécies de ASF, está T*etragonisca angustula* (Latreille, 1811) popularmente conhecida como "Jataí", sendo caracterizada pelo tamanho pequeno, medindo aproximadamente de 4-5 mm, de coloração amarela e marrom e hábito generalista (Barth *et al.*, 2011; Cabe; Farina, 2010; Oliveira *et al.*, 2004; Zweden *et al.*, 2011).

Estudos sobre a visitação floral desta espécie destacam que as principais famílias descritas na literatura são Fabaceae, Asteraceae, Malvaceae, Bignoniaceae, Solanaceae, Myrtaceae e Lamiaceae. Na literatura, estudos de caraterização química analisaram mel, própolis, geoprópolis e subprodutos do "saburá" (pólen fermentado) de *T. angustula* e verificaram a presença de ácidos fenólicos como os ácidos salicílico, p-cumárico, protocatecuico, ferúlico, vanílico e cafeico, flavonoides como a quercetina e a naringenina, além do diterpeno fenólico carnosol. (Biluca *et al.*, 2017; Conesa *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2020; Peter *et al.*, 2017).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi reunir em uma revisão as pesquisas sobre as principais espécies de plantas visitadas por *Tetragonisca angustula*, bem como os estudos que verificaram a composição a química e as propriedades biológicas dos bioprodutos de *T. angustula*. Fechamos a revisão com algumas perspectivas para melhor compreensão desses estudos e para realização de novas pesquisas.

Resultados e Discussão

A pesquisa e análise nas bases de dados demonstraram a presença de 763 artigos sobre a espécie de ASF estudada, *T. angustula*. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos para a seleção dos estudos que iriam compor essa revisão foram selecionados 78 artigos, os quais abordavam aspectos sobre a visitação floral, composição química dos subprodutos da abelha, como também, avaliação de suas atividades biológicas.

Como mostra a Figura S1, o número de publicações relacionadas à visitação floral, composição química e atividades biológicas dos bioprodutos de *T. angustula* apresenta um aumento gradativo ao longo dos anos, com oscilações em alguns anos. Nesse sentido, o aumento do número dessas publicações sugere um crescente interesse da comunidade científica em compreender melhor as aplicações dos produtos dessas abelhas como mel, própolis, pólen fermentado ("saburá") e geoprópolis na medicina tradicional, bem como avaliar suas aplicações para fins terapêuticos e nutricionais para validação científica de seus efeitos biológicos.

Espécies vegetais visitadas por *T. angustula*

A Abelha Sem Ferrão (ASF) *Tetragonisca angustula* possui ampla distribuição nas regiões Neotropicais, apresentando hábito de forrageamento generalista, contribuindo para a eficiência dos processos de dispersão e polinização de espécies vegetais (Torres; Hoffmann; Lamprecht, 2007). Esta espécie visita uma grande variedade de plantas na sua procura de alimento, uma caraterística que reflete a adaptabilidade da espécie a diferentes recursos disponíveis no ambiente. As espécies vegetais são elementos importantes no ambiente, as quais estão associadas a recuperação de áreas degradas, manutenção da diversidade da flora nativa e áreas de flora ruderal, as quais atuam como recurso alimentar para as abelhas (Barth; Freitas, 2022).

Nesse sentido, a palinologia é uma ferramenta crucial na compreensão dos vínculos tróficos, ecológicos e evolutivos entre as abelhas e os grupos vegetais. A palinologia consiste no estudo dos grãos de pólen e esporos presentes em diferentes amostras, como sedimentos, solos, alimentos e até mesmo nas estruturas de abelhas, como colmeias e em estruturas morfológicas especializadas para coleta de grãos de pólen, como as corbículas (De Novais; Absy, 2014).

A riqueza das espécies vegetais representadas pelo espetro polínico recolhido de uma determinada espécie de abelha pode variar em função dos seguintes fatores (a) aspectos

fenológicos da flora local; (b) mudanças sazonais no fluxo de néctar; (c) presença de várias espécies de abelhas na mesma região; (d) necessidades proteicas da colónia; e (e) efeitos ambientais e antropogênicos (Imperatriz-Fonseca et al., 1998).

Na presente revisão foram encontrados 44 artigos que investigam a diversidade floral visitada por *T. angustula*. Na Tabela S1 contém as principais famílias botânicas, gêneros e espécies que foram encontradas nesses estudos, as quais estão distribuídas em 88 famílias, sendo a família Fabaceae a mais representativa em termos de número de espécies 39 espécies, enquanto a família Asteraceae foi a mais representativa em número de gêneros de espécies botânicas, apresentando 18 gêneros. A Figura 1 traz um panorama geral das principais famílias botânicas com as suas respectivas espécies.

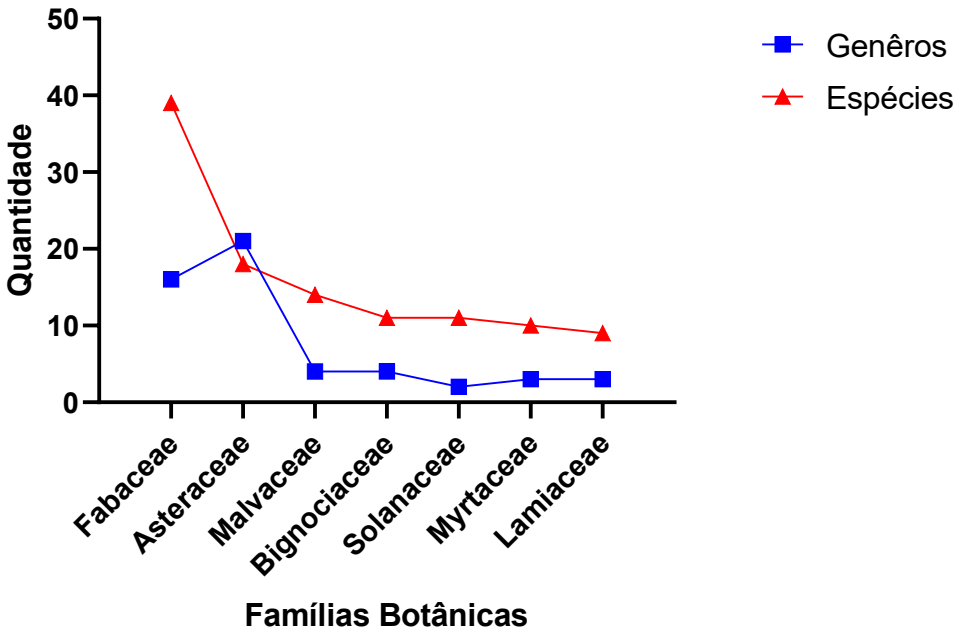


Figura 1: Principais famílias botânicas com espécies visitadas por *Tetragonisca angustula* encontradas em estudos da literatura

O mel é um importante bioproduto utilizado para identificar a origem botânica das espécies vegetais visitadas por abelhas sem ferrão a partir da análise dos tipos de pólens presente na sua composição. No estudo realizado por Lima et al. (2024) para verificar a composição floral do mel coletado na região nordeste do Brasil foram encontrados a presença de 19 tipos de pólen multifloral, sendo a família mais predominante na análise a Anacardiaceae e os pólens mais representativos foram das espécies dos gêneros *Tapirira* Aubl. e *Schinus* L.

Vieira et al. (2020) identificaram a presença de 78 tipos de pólens em amostras de mel e do pólen fermentado armazenado nas colmeias das abelhas, conhecido como “saburá” em um estudo também realizado no Brasil, no estado de Minas Gerais. Nesse estudo foram

caracterizadas espécies de 37 famílias botânicas distribuídas em 64 gêneros. As principais famílias botânicas encontradas nesse estudo foram Fabaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Amaranthaceae, Moraceae, Myrtaceae, Poaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Solanaceae, além disso, foram observados ainda a representação de 46 plantas nectaríferas, tendo como principais gêneros botânicos o *Alchornea* Sw., *Baccharis* L., *Casearia* Jacq., Eucalyptus L'Hér., *Ricinus* L., *Schefflera* J.R.Forst. & G.Forst., *Schinus* L., *Symplocos* Jacq. e *Vernonia* Schreb. (Vieira *et al.*, 2020).

O estudo realizado para identificar o espectro polínico de amostras de mel coletadas na região da Baixa Amazônia no estado do Pará, Brasil identificaram diferentes tipos de grãos de pólen. As famílias botânicas mais representativas encontradas no espectro polínico das amostras de mel foram Fabaceae, Amaranthaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae e Rubiaceae, entre outras. Entre essas famílias, a subfamília Papilionoideae pertencente à família Fabaceae se destacou com seis tipos diferentes de pólen identificados, descritos a seguir: *Clathrotropis nitida* (Benth.) Harms, *Cratylia* Mart. ex Benth., *Crotalaria* L., *Desmodium* Desv., *Zollernia paraensis* Huber e *Zornia* J.F.Gmel. (De Novais; Absy, 2015).

A riqueza das espécies vegetais representada pelo espectro polínico coletado através de uma determinada espécie de abelha pode variar de acordo com os seguintes fatores: (a) aspectos fenológicos da flora local; (b) mudanças sazonais no fluxo de néctar; (c) presença de várias espécies de abelhas em uma mesma região; (d) necessidade proteica da colônia e (e) efeitos ambientais e antrópicos (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1998).

T. angustula é considerada uma espécie generalista, o que significa que ela não está restrita a uma única espécie de planta para a coleta de néctar e pólen. Essa espécie visita uma variedade de plantas em sua busca por alimento, senda essa característica reflexo da adaptabilidade da espécie a diferentes recursos disponíveis no ambiente. O estudo de Radaeski and Bauermann (2021), referente a visitação botânica de *T. angustula* demonstraram que as famílias botânicas melhor representadas no espectro polínico das amostras coletadas foram Apiaceae, Bignoniaceae, Moraceae e Fabaceae. Cada uma dessas famílias botânicas é associada a espécies específicas de plantas. Por exemplo, a família Apiaceae está representada pelo gênero *Eryngium* L., a família Bignoniaceae por *Handroanthus* Mattos, a família Moraceae por *Sorocea bonplandii* (Baill.) W.C.Burger, Lanj. & Wess.Boer e a família Fabaceae por *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Saraiva-Nava et al. (2018), sendo as famílias botânicas Fabaceae, Sapindaceae e Araliaceae, seguidas por Euphorbiaceae, Malpighiaceae, Rubiaceae, Asteraceae, Anacardiaceae, Bignoniaceae, Boraginaceae e Urticaceae as mais representadas pela visitação de *T. angustula*. Cada uma dessas famílias

botânicas contém plantas que são visitadas pela Jataí para coleta de néctar e pólen, sendo os seguintes tipos de pólen identificados como os mais frequentemente coletados por essa espécie: *Didymopanax* Decne. & Planch., *Anadenanthera* Speg., *Astronium* Jacq., *Senna* Mill. e *Banisteriopsis* C.B.Rob.

As preferências florísticas de *T. angustula* estão relacionadas aos diferentes períodos climáticos e às características específicas das plantas durante esses períodos, o que está associado à disponibilidade de néctar e pólen, bem como à estratégia reprodutiva das plantas e dessa espécie de abelha. No estudo de Prado et al. (2021) foi verificado que durante os períodos de seca, *T. angustula* mostrou preferência por flores das espécies *Miconia prasina* (Sw.) DC. e *Ilex laureola* Triana & Planch. No entanto, durante os períodos de chuva, sua preferência floral mudou para a espécie *Pera arborea Mutis*, que também coincidiu com uma maior taxa de reprodução dessa espécie floral, indicando que o efeito da sazonalidade climática e da cobertura vegetal na seleção de recursos florais para essa espécie de abelha sem ferrão.

Esses dois fatores também foram analisados no estudo de Urquizo et al. (2022) para verificar a preferência florística de *T. angustula* em períodos de inverno e primavera. Os autores identificaram que os resultados sobre a diversidade de espécies visitadas pela *T. angustula* não foi significativamente diferente entre duas as estações analisadas, como evidenciado pelo índice de Shannon-Weaver, o qual mensura a diversidade. Além disso, o índice de similaridade de Sorensen revelou que houve uma similaridade de 56,25% na composição das espécies visitadas entre as duas estações por *T. angustula*. Essas análises sugerem que, embora a diversidade de espécies visitadas não tenha variado consideravelmente entre as estações, houve diferenças na composição específica das espécies visitadas.

T. angustula possui hábitos polilécticos, buscando uma variedade de plantas para obter recursos alimentares, independentemente de sua relação taxonômica, isso significa que essas abelhas não são especializadas em coletar pólen de uma única família botânica ou grupo de plantas relacionadas. Essa abordagem utilizada pelas abelhas pode ser uma forma de garantir a sobrevivência da colônia, especialmente durante períodos de escassez de recursos (Cane, 2021). No estudo de Saraiva-Nava et al. (2018), observaram esse comportamento de *T. angustula* evidenciado pela identificação de 55 tipos de pólens representados em 22 Famílias, destacando a família Fabaceae como a mais representada no nível das espécies.

A origem botânica das plantas visitadas por abelhas está completamente associada a composição química dos seus bioprodutos. O estudo de Sawaya et al. (2007) evidenciou que através de análises utilizando Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray em modo negativo (ESI(-)-MS), a espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi pertencente à família

Anacardiaceae foi o principal recurso para produção de resinas presente na composição da própolis por *T. angustula* nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil.

De acordo com o estudo de Sadalha-Castilho et al. (2016), foi observado que a abelha *T. angustula* tem um padrão de coleta de resina de óleo mais comum durante períodos ensolarados e quentes durante o dia, evidenciando que as abelhas têm uma preferência por coletar resina de óleo sob condições climáticas específicas, como o sol e o calor. Esses fatores ambientais podem influenciar a disponibilidade da resina ou a sua acessibilidade nas plantas que a produzem.

Composição Química de Produtos Meliponíneos

Na presente revisão sobre a composição química dos bioprodutos de *T. angustula*, incluído o mel, própolis, geoprópolis e pólen fermentado (Saburá) foram encontrados 21 artigos que investigaram esses parâmetros. Muitos estudos mostraram que os bioprodutos da abelha sem ferrão *T. angustula* apresentaram em sua composição principalmente flavonoides, ácidos fenólicos, terpenóides e alcalóides. Essa variação na composição química das amostras de mel, própolis e cera está relacionada à diversidade de espécies florísticas visitadas por *T. angustula* (Lima et al., 2024). A Tabela 1 e Tabela S2 incluem os dados de diferentes métodos cromatográficos utilizados para determinar a composição química dos bioprodutos de *T. angustula*, bem como, os compostos relatados para essas análises.

A compreensão da composição química dos bioprodutos é importante porque os compostos encontrados podem ter aplicações em diversos campos, incluindo a indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Além disso, entender a composição química dos produtos das abelhas sem ferrão pode fornecer insights sobre as interações entre as abelhas e as plantas que elas visitam para coletar recursos. Os constituintes mais citados na literatura em estudos que avaliam a composição química do mel, da própolis, da geoprópolis e do pólen fermentado (“saburá”) são apresentados na Figura 2.

Tabela 1: Composição química do mel, própolis, geoprópolis e pólen fermentado (“Saburá”) de *T. angustula* relatada na literatura.

Bioprodutos	Constituintes	Citações
Mel	Ácido salicílico; ácido p-cumárico; ácido protocatecuico; ácido cafeico; ácido trans-ferúlico; ácido siríngico; naringenina; aromadendrina; quercetina; taxifolina; eriodictiol; siringaldeído; carnosol	(Biluca *et al.*, 2017)
Mel puro	Heptilacetato; óxido de *trans*-linalol (furanóide); óxido de *cis*-linalol (furanóide); linalol; hotrienol; isoforona; óxido de nerol; etilbenzoato; etiloctanoato; etilbenzenoacetato; cariofileno; δ-Cadineno	(de Lima *et al.*, 2017)
Mel	Derivado do ácido cinâmico; ácido ferúlico; flavonol; ácido cítrico; ácido succínico; prolina	(Lima *et al.*, 2024)
Mel	N′, N″, N‴ -tris-p-coumaroil espermidina; N′, N″-dicafeoil, N‴-coumaroil espermidina; N′, N″, N‴-tris-cafeoil espermidina e N′, N″-dicafeoil; N‴-feruloil espermidina	(Lima *et al.*, 2021)
Mel	Apigenina; naringenina; eriodictiol; aromadendrina; hispidulina; quercetina; taxifolina; isoquercetina; rutina; escopoletina; ácido salicílico; ácido p-cumárico; ácido vanílico; protocatecuico	(Braghini *et al.*, 2021)
Mel	Ácido salicílico; ácido p-cumárico; ácido ferúlico; ácido vanílico; naringenina; aromadendrina; taxifolina; escopoletina; quercetina; escopoletina	(Biluca *et al.*, 2020)
Própolis	Ácido 3-Prenil-4-hidroxicinâmico; Ácido 3,5-Diprenil-4-hidroxicinâmico; Ácido 2,2-Dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenoico; Derivado do ácido cinâmico	(Miorin *et al.*, 2003)
Própolis	α-Pineno; β-Pineno	(Valcanaia *et al.*, 2022)
Própolis	Ácido ferúlico; suberosina; macarangina; odoratina	(Conesa *et al.*, 2021)
Própolis	Ácido gálico	(Torres *et al.*, 2018)
Própolis	Ácidos diterpénicos e triterpénicos	(Carneiro *et al.*, 2016)
Própolis	Obtusifoliol; β-amirina; lupenona; cicloartenol; lupeol; friedour-7-en-3-ona; friedour-7-en-3-ol; acetato de lupeol; acetato de β-amirina	(Pereira; Bicalho; Aquino Neto, 2003)

Própolis	Butanediol; acetato de β-amirina; lupeol; acetato de lupeol; friedour-7-en-3-ona; β-amirina; lupenona; obtusifoliol; ácido octacosanóico; ácido hexacosanóico; ácido tetracosanóico; ácido cafeico ácido p-cumárico; ácido hexadecanóico; ácido hidracrílico; ácido lático; ácido succínico; ácido hidrocinâmico de glicerol; eritritol; ácido p-hidroxibenzóico; ácido p-hidroxi-dihidrocinâmico	(Pereira; Bicalho; Aquino Neto, 2003)
Própolis	Etilamina; ácido hidroxibutírico; ácido lático; ácido hidracrílico; ácido hidroximetilbutírico; butanetriol; ácido malónico; valina; glicerol; ácido fosfórico; ácido succínico; ácido diidroxipropanóico; ácido fumárico; ácido hidrocinâmico; eritritol; ácido málico; ácido hexanodióico; eritrose 5-oxo-prolina ácido p-hidroxibenzóico; ácido p-hidroxifenilacético; ácido p-hidroxi-dihidrocinâmico; ácido o-cumárico; ácido di-hidroxibenzóico; frutose; ácido p-cumárico; ácido hexadecanóico; ácido linoleico; ácido oleico; ácido octadecanóico; ácido tetracosanóico; ácido octacosanóico; cicloartenol; acetato de β-amirina; acetato de lupeol	(Pereira; Bicalho; Aquino Neto, 2003)
Própolis	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico; ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran- 6-propenoico; derivado do ácido cinâmico	(Miorin *et al.*, 2003)
Própolis	Ácidos benzóicos; ácidos cafeicos de cadeia longa; álcoois triterpenicos	(Velikova *et al.*, 2000)
Geopropolis	Ácido protocatecuico; catequina; naringenina; galangina; kaempferol; apigenina; hispidulina	(Ferreira *et al.*, 2020)
Geopropolis	Ácido cafeico; ácido cinâmico; ácido clorogénico; ácido ferúlico; hispidulina; ácido protocatecuico; quercetina; rutina; ácido α-metoxifenilacético; ácido gálico; ácido siríngico; ácido vanílico; aringenina; galangina; apigenina	(Ferreira *et al.*, 2019a)
Geopropolis	Ácido 4-hidroxibenzóico; ácido clorogénico; ácido cafeico; ácido ferúlico; ácido p-cumárico; quercetina; rutina; galangina; kaempferol; apigenina; ácido elágico; hesperetina; pinocembrina; crisina; luteolina	(Peter *et al.*, 2017)
Geopropolis	Dihidrocanferida; ácidos terpénicos; ácido cuprésico; ácido isocuprésico; ácido gálico; ácido 15-acetoxi-cuprésico	(Cardozo *et al.*, 2015)

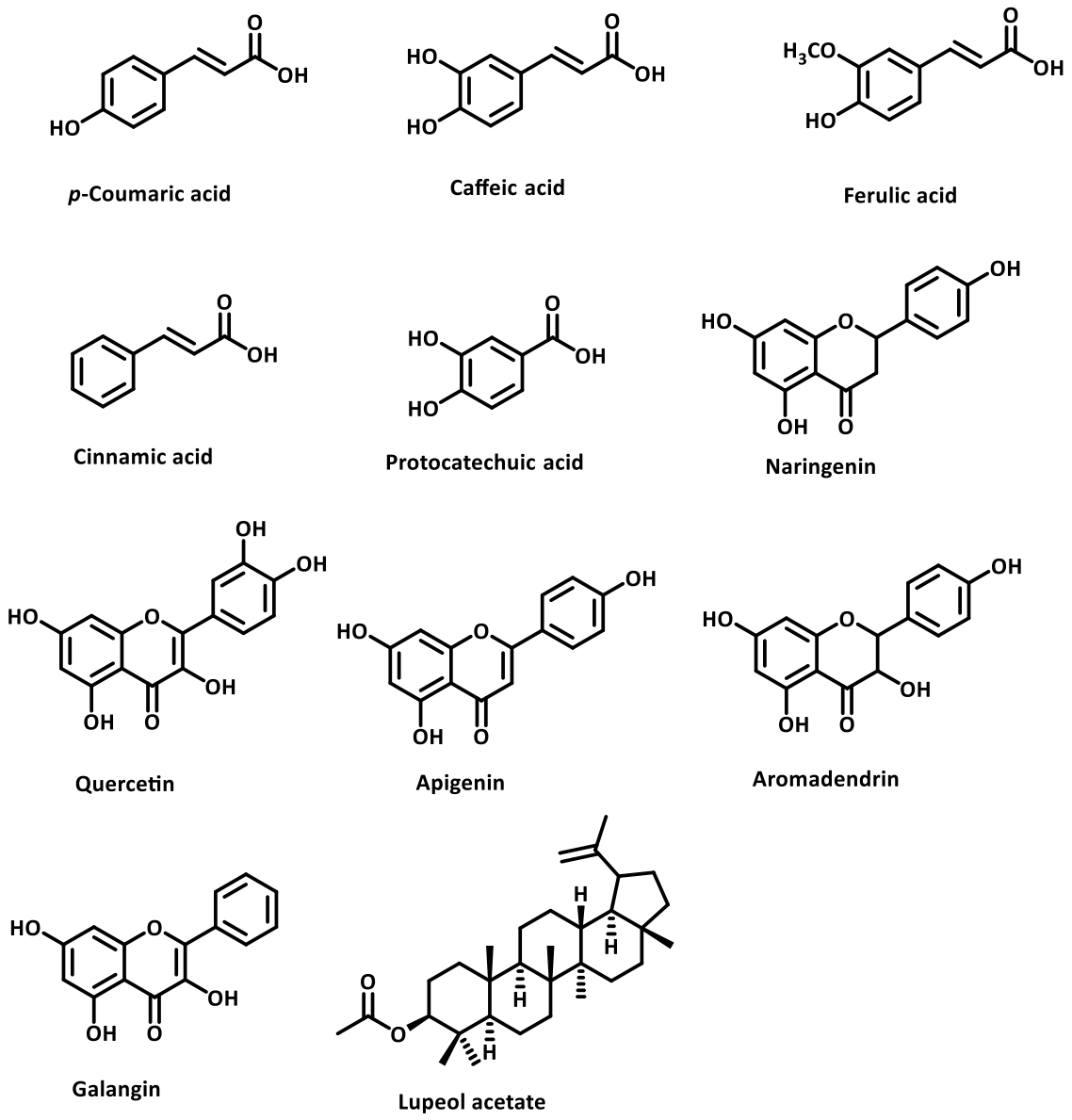


Figura 2: Estruturas químicas dos principais compostos encontrados em produtos derivados de abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula*

Mel

O mel é uma mistura complexa de substâncias, incluindo açúcares, ácidos, enzimas, compostos aromáticos e minerais, entre outros (Campos *et al.*, 2003). Importante destacar que o mel proveniente dos Meliponíneos apresenta características específicas, como maior acidez e teor de umidade em comparação com o mel de abelhas africanizadas, como a *Apis mellifera*. A composição do mel é determinada por diversos fatores, incluindo as fontes vegetais que as abelhas usam para coletar néctar, a espécie das abelhas, a condição da colônia, a maturidade do mel e as condições climáticas durante a coleta (Souza; Menezes; Flach, 2021).

O mel é uma substância complexa, caracterizada por propriedades físicas e químicas distintas e específicas, essa complexidade intrínseca torna a análise do mel desafiadora quando se trata de compreender suas diversas propriedades. Na literatura a presença de compostos fenólicos como os flavonoides e ácidos fenólicos está bem documentada para os bioprodutos de *T. angustula*.

Análises utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa sequencial por Eletrospray (LC-ESI-MS/MS) para verificar a composição química do mel diluído em acetato de etila evidenciou a presença de flavonoides e ácidos fenólicos como apigenina, naringenina, eriodictiol, aromadendrina, hispidulina, quercetina, taxifolina, isoquercetina, rutina, escopoletino, ácido salicílico, ácido p-cumárico, ácido vanilico, ácido protocatecúrico (Braghini *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram encontrados por Biluca et al. (2017, 2020) utilizando o mesmo solvente e a mesma técnica, demonstrando a presença dos seguintes ácidos fenólicos: salicílico, p -cumárico, protocatecuico, cafeico, ferúlico trans, siringico; e flavonoides: naringenina, aromadendrina, quercetina, taxifolina, eriodictiol, siringaldeído; e diterpenos fenólicos: carnosol.

Lima et al. (2021) identificaram em frações do mel de *T. angustula* a presença amidas de ácidos hidroxicinâmicos (HCAAs). O processo de fracionamento foi realizado para dividir o mel em três frações distintas devido ao alto teor de açúcares, esse processo de fracionamento é frequentemente usado para separar os componentes de uma mistura complexa, como o mel, em frações mais puras para análises detalhadas. A análise por Espectrometria de Massa sequencial por Eletrospray demonstrou a presença de quatro HCAAs, conhecidas como HCAAs conhecidas como N ′, N ″, N ‴-tris- p-cumaroil espermidina (1), N ′, N ″- dicafeoil, N ‴-cumaroil espermidina (2), N ′, N ″, N ‴-tris-cafeoil espermidina (3), e N ′, N ″- dicafeoil, N ‴-feruloil espermidina (4) (Lima *et al.*, 2021).

A análise química do extrato etanólico do mel realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de arranjo de diodos (CLAE-DAD) revelou que o principal componente fenólico presente no extrato é o ácido ferúlico, além da presença de compostos derivados do ácido cinâmico, flavonol e ácidos fenólicos (Lima et al., 2024).

As abelhas operárias contribuem para a composição do mel por meio das enzimas presentes nas suas glândulas hipofaringeais, sendo as principais enzimas encontradas no mel: (a) invertase, essa enzima converte sacarose em glicose e frutose, tornando esses açúcares mais facilmente assimiláveis; (b) glicose oxidase que tem como papel oxida a glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio na presença de água, o peróxido de hidrogênio gerado tem propriedades microbicidas, que podem combater potenciais bactérias de

deterioração; (c) amilase, essa enzima é responsável por quebrar o amido em açúcares mais simples (Torres *et al.*, 2004).

Propólis

A própolis é uma mistura resinosa altamente complexa, coletada pelas abelhas a partir de exsudatos vegetais, os quais são misturados com saliva e cera de abelha no interior da colmeia e são utilizados para diversas finalidades, incluindo a construção, proteção e adaptação de seus ninhos (Rozman *et al.*, 2022). A coleta de própolis é considerada secundária em relação à coleta de néctar ou pólen, e a quantidade de própolis utilizada nos ninhos pode variar significativamente entre diferentes colônias de abelhas (Pereira; Bicalho; Aquino Neto, 2003);

A composição química da própolis é altamente influenciada pela variedade de plantas das quais as abelhas a coletam, como resultado, a própolis pode variar em sua composição química de uma região para outra e de uma colônia para outra. Na literatura a própolis de *T. angustula* apresenta uma diversidade compostos como os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas e terpenóides. Pereira et al. (2003) evidenciaram a presença de 41% de compostos pertencente a classe dos triterpenos em extratos de própolis.

Nos estudos realizados por Conesa et al. (2021) utilizando a técnica de Cromatografia Liquida de Alta Eficiência – CLAE foi verificada a presença dos compostos pertencentes a classes dos ácido fenólicos, cumarinas, flavonoides e terpenóides representadas pelos compostos ácido ferúlic ((E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil2-enoico), suberosina (7-Metoxi-6- (3-metilbut-2-enil) cromen-2-ona), macarangina (6-[(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil]-3,5,7-trihidroxi-2-(4 hidroxifenil)cromen-4-ona) e odoratina (7-hidroxi-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-6- metoxicromen-4-ona), respectivamente. Miorin et al. (2003) também identificaram a presença de ácidos fenólicos no extrato etanólico da própolis, identificando a presença de 3-prenyl-4-hidroxicinâmico, 3,5-diprenyl- 4-hidroxicinâmico, 2,2-dimetil-8-prenyl-2H-1-benzopiran-6-propenóico e um derivado de ácido cinâmico.

Estudos relataram a presença de três compostos monoterpenos no óleo volátil da própolis, sendo o α-pineno o componente predominante, constituindo uma concentração relativa de 88,71% e, portanto, o β-pineno foi identificado com uma concentração de 8,08% e o terceiro componente, o triciclano, foi encontrado em vestígios, ou seja, em quantidades muito pequenas (Valcanaia *et al.*, 2022).

Ainda no estudo de Valcanaia et al. (2022) foi verificado que a composição química de uma amostra de própolis estava fortemente associada a sua atividade antibacteriana

evidenciado pelo valor de Concentração Inibitória Mínima – CIM. Os principais compostos encontrados foram monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos, incluindo mirtenal como composto majoritário (20,33 %), 1-epi-cubenol (14,69 %), cispinocampona (11,59 %), α-campholenal (9,13 %), pinocampona (7,95 %), cubenol (7,64 %), fenchone (6,40 %), cânfora (5,48 %), trans- pinocarvona (4,42 %), helifolenol A (4,37 %) e 6-dimetilhept-5-en-2-ona (2,56 %). O mirtenal foi identificado como o principal componente dessa amostra, caracterizado como um tipo de monoterpeno bicíclico que contém um grupo funcional aldeído em sua estrutura, essa substância pode ser encontrada em várias espécies de plantas, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), coentro (*Coriandrum sativum*), lavanda (*Lavandula* spp.), pimenta preta (*Piper nigrum*), entre outras (Valcanaia *et al.*, 2022).

Embora a região geográfica em que a colmeia esteja estabelecida seja um fator crucial para determinar a composição química da própolis, Carneiro et al. (2016) através de análise química utilizando Espectrometria de Massa por Eletrospray (ESI-MS) e Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (CLAE-MS) verificaram que a própolis proveniente de *T. angustula* apresentou uma composição similar, independentemente da sua origem geográfica, sendo os principais compostos identificados como ácidos diterpênicos e triterpênicos. Além disso, foi constatado que as resinas das flores de *Schinus terebinthifolius* foram a principal fonte de constituintes para essa própolis.

Geoprópolis

Algumas espécies de abelhas sem ferrão têm o hábito de misturar própolis com outro material, como argila ou solo, esse processo resulta em um material resinoso menos maleável em comparação com a própolis pura, sendo o produto resultante denominado de geoprópolis. A geoprópolis difere das amostras de própolis em razão de seu teor de minerais e solo, e pela ausência de tricomas vegetais na sua composição (Lavinas *et al.*, 2019).

Apesar das distinções na composição, a geoprópolis desempenha funções semelhantes às da própolis dentro da colmeia, ambos os produtos são utilizados pelas abelhas para proteger a colônia contra patógenos, selar rachaduras, lacunas e possíveis aberturas no ninho, e proporcionar uma camada protetora contra condições adversas (Cardozo *et al.*, 2015).

Os trabalhos na literatura que verifiquem a composição química da geoprópolis de *T. angustula* são escassos, sendo encontrados apenas dois estudos que investiguem esse parâmetro. Ferreira et al. (2019, 2020) aplicaram três estratégias distintas de extração para investigar os compostos fenólicos livres e ligados presentes na amostra da própolis estudada. Inicialmente, os compostos fenólicos livres foram analisados por meio de uma extração

sólido-líquido, e posteriormente, para examinar os compostos polifenólicos ligados, foram adotadas duas abordagens de hidrólise: (i) hidrólise ácida foi aplicada, a qual teve o objetivo de liberar os compostos, permitindo sua solubilização na solução; (ii) hidrólise alcalina também foi empregada para desvincular os compostos polifenólicos ligados, tornando-os disponíveis para análise.

No estudo de Ferreira et al. (2019a), os autores analisaram o extrato metanólico da própolis e verificaram que no perfil polifenólico livre tinha a presença de Ac. cinâmico, ac. clorogénico, ac. ferúlico hispidulina, ac. protocatecuico, quercetina, rutina e ac. α-metoxifenilacético, enquanto que o perfil da hidrólise ácida mostrou a presença de ac. cafeico, ac. cinâmico, ac. clorogénico, ac. ferúlico, ac. gálico, ac. siríngico, ac. vanílico, apigenina, hispidulina, ac. protocatecuico e ac. metoxifenilacético. O perfil da hidrólise alcalina demonstrou a presença de cinco compostos, ácido ferúlico, apigenina, galangina, hispidulina e naringenina.

Enquanto a análise do extrato etanólico evidenciou a presença de ácido protocatecuico, catequina, ácido 4-(hidroximetil)benzoico, ácido vanílico, vanilina, ácido 4-aminobenzoico, ácido p-cumárico, ácido a-metoxifenilacético, siringaldeído, taxifolina, galato de epicatequina e rutina. Ácido salicílico, umbeliferona, escopoletina, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido rosmarínico, isoquercitrina, naringina, ácido cinâmico, eriodictiol, ácido elágico, quercetina, fustina, apigenina e hispidulina para o perfil polifenólico livre e o perfil polifenólico após hidrólise ácida. Os resultados do perfil polifenólico após hidrólise alcalina demonstraram a presença de vanilina, ácido 4-aminobenzóico, ácido p-cumárico, ácido a-metoxifenilacético, siringaldeído, taxifolina, galato de epicatequina, rutina, ácido cinâmico, Eriodictyol, ácido elágico, quercetina, galangina, naringenina, kaempferol, apigenina, hispidulina e pinocembrina (Ferreira *et al.*, 2020).

Bioatividades

Após a aplicação das estratégias de pesquisas utilizadas para esta revisão, foram identificados 29 estudos que relatam atividades biológicas associadas a produtos derivados da espécie de *T. angustula*. Essa revisão demonstrou que os bioprodutos dessa espécie apresentam um amplo espectro de atividades biológicas que estão documentadas na literatura. Entre as atividades mais notáveis estão as propriedades antibacterianas, antioxidantes e antifúngicas, além de outras bioatividades relevantes. Um resumo abrangente das atividades biológicas desses produtos é apresentado na Tabela 2.

Esses resultados reforçam a diversidade de potenciais aplicações e benefícios associados aos produtos derivados da espécie *T. angustula*, ampliando o entendimento da comunidade cientifica sobre suas propriedades naturais e suas possíveis contribuições para diversos campos, como a medicina, a saúde e outras áreas relacionadas à pesquisa bioativa.

Tabela 2: Bioatividades descritas para o mel, própolis, geoprópolis e saburá da espécie *Tetragonisca angustula*

Bioprodutos/Solventes	Modelo ou Técnica	Bioatividades avaliadas	Resultados	Citações
Mel puro	DPPH e ABTS	Antioxidante	Captou 73.29 e 71.73 % dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente	(Lima *et al.*, 2024)
Mel/Etanol	DPPH e ABTS	Antioxidante	Captou 93.36 e 97.86 % dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente	(Lima *et al.*, 2024)
Mel puro	FCR, DPPH e FRAP	Antioxidante	FCR: ± 65 mg EGA 100 g^{-1}; DPPH: ± 33 mg EAA 100 g^{-1} FRAP: ± 1000 µmol Fe II 100 g^{-1}	(Braghini *et al.*, 2021)
Própolis	DPPH	Antioxidante	Apresentou 545 e 732 mgGAE/100g os extratos obtidos por extração convencional e por ultrassom, respectivamente	(Medina-Jaramillo; Carvajal-Díaz; López-Córdoba, 2022)
Geoprópolis/Etanol	Folin-Ciocalteu e DPPH	Antioxidante	Folin-Ciocalteu: 1231.95-1370.27 mg EGA 100 g^{-1} DPPH: 315.44-349.03 mg EAA 100 g^{-1} e 462.99-512.34 mg ETE 100 g^{-1}	(Ferreira *et al.*, 2020)
Geoprópolis/Metanol	Folin-Ciocalteu e DPPH	Antioxidante	Folin-Ciocalteu: 417.38- 548.06 mg EGA 100 g^{-1} DPPH: 288.54-316.52 mg EAA 100 g^{-1} e 423.46- 464.57 mg ETE 100 g^{-1}	(Ferreira *et al.*, 2019a)
Própolis/Etanol	DPPH	Antioxidante	IC_{50}= 2433.0 mg/mL	(Torres *et al.*, 2018)
Própolis/Etanol	DPPH	Antioxidante	IC_{50}= 293-734 µg/mL	(Carneiro *et al.*, 2016)
Geoprópolis/Etanol	DPPH	Antioxidante	EC_{50}= 15.90-1410.50 mg/mL	(Cardozo *et al.*, 2015)
Mel puro	DPPH e ABTS	Antioxidante	EC_{50}= 24.8 mg/mL para DPPH e 89.24 µgET 100 g para ABTS	(Lira *et al.*, 2014)
Mel/Acetato de Etila	Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP	Antioxidante	Folin-Ciocalteu: 10.4-57.4 mg GAE 100 g^{-1} DPPH: 0.8-28.2 mg AAE 100 g^{-1} FRAP: 67,5-734, 5 µmol Fe^{+2} 100 g $^{-1}$	(Biluca *et al.*, 2020)
Geoprópolis/Etanol	TFC, DDPH, CUPRAC, FRAP	Antioxidante	TFC: 0,24-26,30 $mg.g^{-1}$ DDPH: 0,01-6,67 $mg.g^{-1}$	(Turco *et al.*, 2020)

			CUPRAC: < LQ a 174,52 $mg.g^{-1}$ FRAP: 28,61 $mg.g^{-1}$	
Mel puro	ABTS	Antioxidante	Capacidade antioxidante: 327.7 µmol TE/100 g	(Rodríguez-Malaver *et al.*, 2009)
Própolis/Óleo volátil	*Mycoplasma capricolum* ATCC 27343*, M. genitalium* ATCC 33530, *Mycoplasma pneumoniae FH* ATCC 15531, *Mycoplasma pneumoniae* 129 ATCC 29342, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (MLC) PG3 (NCTC 10137)	Antibacteriana	MIC: 438, >875, >875, 109, 875 µg mL^{-1}, respectivamente	(Valcanaia *et al.*, 2022)
Frações 01 a 05 do óleo volátil de própolis	*Mycoplasma pneumoniae* 129 ATCC 29342	Antibacteriana	MIC: 250, 125, 250, 250 e 250 µg mL^{-1}, respectivamente	(Valcanaia *et al.*, 2022)
Própolis/Óleo volátil	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	Antibacteriana	MIC: >875 µg mL^{-1} para todas as cepas	(Valcanaia *et al.*, 2022)
Própolis/Etanol	*S. aureus* (MRSA)	Antibacteriana	Não apresentou atividade	(Conesa *et al.*, 2021)
Mel/ Etanol	*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)	Antibacteriana	MIC: 142.87 mg/mL $-^{1}$	(Miorin *et al.*, 2003)
Própolis/Etanol	*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)	Antibacteriana	MIC: 0.44 mg/ml $-^{1}$	(Miorin *et al.*, 2003)

Própolis/Etanol	*S. aureus* Rib 1, *E. coli* ATTC10538 e *Streptococcus mutans* ATCC25175	Antibacteriana	Apresentou atividade somente para *S. aureus* com MIC de 1 mg/mL	(Carneiro *et al.*, 2016)
Geoprópolis/Álcool	*Staphylococcus* sp.	Antibacteriana	Ausência de crescimento microbiano	(Maciel *et al.*, 2015)
Mel puro	*S. aureus* (ARSA-1, ARSA-2, ARSA-3, ARSA-4, ARSA-5, ARSA-6, ARSA-7 e ARSA-8)	Antibacteriana	MIC: 125, 125, 250, 125, 250, 125, 250 e 250 mg/mL, respectivamente	(Zamora *et al.*, 2015)
Mel puro	*Pseudomonas aeruginosa* ARPA-1 e ARPA-2	Antibacteriana	MIC: 125 mg/mL para ambos os isolados clinicos	(Zamora *et al.*, 2015)
Mel puro	*S. aureus* ATCC 25923*, Listeria monocytogenes* ATCC 19116*, Escherichia coli* ATCC 25922*, Salmonella enteritidis* ATCC 13076*, P. aeruginosa* ATCC 9027*, S. epidermidis* UCR 2902	Antibacteriana	MIC: 49.2; 97.3; 99.0; 196; 97.8; 96.6 mg/mL, respectivamente	(Zamora *et al.*, 2014)
Mel	*S. aureus MRSA 333, Klebsiella pneumoniae KPC; Pseudomonas aeruginosa P28*	Antibacteriana	MIC: 11.33, 11 e 3.33 g 100 mL^{-1}, respectivamente	(Villacrés-Granda *et al.*, 2021)
Própolis/ Etanol AM1	*S. aureus 209* e *E. coli WF+*	Antibacteriana	Zona de inibição: 10 e 12 mm, respectivamente	(Velikova *et al.*, 2000)
Própolis/ Etanol AM2	*S. aureus 209* e *E. coli WF+*	Antibacteriana	Zona de inibição: 12 e 11 mm, respectivamente	(Velikova *et al.*, 2000)
Própolis/Metanol	*S. aureus 209* e *E. coli WF+*	Antibacteriana	Zona de inibição: 16 mm para ambas	(Velikova *et al.*, 2000)

Mel puro	*S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922	Antibacteriana	MIC: 50 e 25 g/100 mL, respectivamente	(Rodríguez-Malaver *et al.*, 2009)
Propólis/Etanol	*Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *S. aureus* ATCC 25923	Antibacteriana	Halo de inibição: 24.1 e 19.8 mm, respectivamente	(Manrique; Santana, 2008)
Mel puro	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis, Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922	Antibacteriana	10, 10, 5, 5, 10 e 5 % de inibição de crescimento, respectivamente	(Dardón; Enríquez, 2008)
Mel	*Bacillus brevis* DSM 5609, *Bacillus megaterium* DSM 90, *Bacillus subtilis* DSM 347, *Micrococcus luteus* DSM 348, *E. coli* DSM 31 e *Pseudomonas seringae* DSM 5176	Antibacteriana	Halo de inibição variou de: 7.3-18, 2-7, 13-46.7, 3.1-42, 2.8-21.7 e 7.2-10.3 mm, respectivamente	(Torres *et al.*, 2004)
Propólis/Etanol	*S. aureus* ATCC 6538	Antibacteriana	MIC: 0.44-2.01 mg/mL	(Miorin *et al.*, 2003)
Mel	*S. aureus* ATCC 6538	Antibacteriana	MIC: 142.87-214.33 mg/mL	(Miorin *et al.*, 2003)
Mel	*Staphylococcus aureus* BMA/ FR/0.32/0074	Antibiofilme	MIC: 98 mg/mL	(Zamora *et al.*, 2017)
Própolis/Óleo volátil	*Candida parapsilosis, C. albicans, C. tropicalis, C.*	Antifúngica	MIC: >875, 875, 875, 875 e 875 μgmL^{-1}, respectivamente	(Valcanaia *et al.*, 2022)

	glabrata, e *C. krusei*			
Própolis/Etanol- AM1	*Candida albicans 562*	Antifúngica	Zona de inibição: 11 mm	(Velikova *et al.*, 2000)
Própolis/Etanol-AM2	*Candida albicans 562*	Antifúngica	Zona de inibição: 13 mm	(Velikova *et al.*, 2000)
Mel puro	*Candida albicans* ATCC 10231	Antifúngica	MIC: 195 mg/mL	(Zamora *et al.*, 2014)
Mel puro	*Candida albicans* ATCC 10231 e *Criptococcus neoformans* CCQQ C-13	Antifúngica	10 e 5 % de inibição de crescimento, respectivamente	(Dardón; Enríquez, 2008)
Mel/Acetato de Etila	Macrófagos RAW 264.7.	Anti-inflamatória	Redução de NOx, TNF-α, IL-6, MCP-1, IL-12p70, INF-γ e IL-10	(Biluca *et al.*, 2020)
Mel/Etanol	Células gliais de ratos Wistar infectadas com *Neospora caninum*	Antiprotozoária	Redução parasitária entre 38-54 %	(Lima *et al.*, 2021)
Própolis/Alcool	BoHV-1 e BVDV	Antiviral	Efeito sobre BVDV na concentração de 0.39µg/mL, com 50% de viabilidade celular	(Peter *et al.*, 2017)
Própolis/Alcool	BoHV-1 e BVDV	Virucida	Redução do título do vírus (3.76 log) para BoHV-1; Redução do título do vírus (3.5 log) para (2.3 log) para BVDV	(Peter *et al.*, 2017)
Mel/Acetato de etila	MTT	Citotoxicidade	Não apresentou citotoxicidade	(Biluca *et al.*, 2020)
Própolis/Etanol	Linhagens celulares: B15, RS4, NB4, CEM, K62, HL60, T-ALL, HEL e NALM6	Citotoxicidade	Não apresentou inibição de 50% das linhagens celulares	(Carneiro *et al.*, 2016)
Própolis/Alcool	Células da linhagem MDBK/ MTT	Citotoxicidade	Apresentou toxicidade a partir da concentração 1.57 µg/mL	(Peter *et al.*, 2017)
Própolis: Éster fenetílico do ácido cafeico	*Artemia salina*	Toxicidade	LC_{50}: 215.7 µg/ml	(Velikova *et al.*, 2000)
Própolis: Éster	*Artemia salina*	Toxicidade	LC_{50}: 36.5 µg/mL	(Velikova *et al.*, 2000)

fenetílico do ácido cafeico				

MDBK: *Madin-Darby Bovine Kidney*; MTT: 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo); PBS: tampão fosfato-salino; B15: leucemia precursora de células B humanas; RS4: leucemia precursora de células B humanas; NB4: leucemia promielocítica aguda humana; CEM: leucemia linfoblástica aguda humana; K562: leucemia mieloide crónica humana; HL60: leucemia promielocítica aguda; T-ALL: leucemia linfoblástica aguda de células T; HEL: eritroleucemia humana; NALM6: leucemia precursora de células B humanas

Antioxidante

Os antioxidantes são compostos químicos que desempenham um papel crucial na proteção das células e moléculas essenciais presentes no nosso corpo contra os danos causados pelos radicais livres. Por sua vez, os radicais livres são moléculas instáveis e altamente reativas que contêm elétrons desemparelhados, os quais podem ser formados de várias maneiras no corpo, incluindo exposição a fatores ambientais, como radiação ultravioleta, poluição, tabagismo e estresse oxidativo (Cianciosi *et al.*, 2018).

Na presente revisão, diferentes métodos foram utilizados para determinar a capacidade antioxidante dos diferentes subprodutos de *T. angustula*, sendo o sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS ((2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) os mais utilizados. Foi demonstrada a atividade antioxidante do mel puro de *T. angustula* e do seu extrato etanólico (Lima *et al.*, 2024). Nesse estudo o mel puro capturou 73,29 e 71,73 dos radicais livres nos ensaios de DPPH e ABTS, respectivamente, enquanto o extrato etanólico 93,36 e 97,86 % dos radicais DPPH e ABTS respectivamente, esses efeitos antioxidantes foram associados a presença do ácido ferúlico nas amostras.

Lira et al. (2014) também adotaram os ensaios de avaliação da captura de radicais ABTS e DPPH para verificar a capacidade antioxidante do mel. Os resultados desse estudo demonstram uma CE_{50} de 24,76 mg/mL para os ensaios utilizando o radical DPPH e para ABTS foi obtido um valor de 93,07 μmolTE 100 g^{-1} (μg de equivalentes de Trolox por 100g de mel).

O potencial antioxidante do mel foi avaliado utilizando outros métodos como a aplicação do reagente Folin-Ciocalteu e a capacidade redutor do íon férrico. O potencial de redução de radicais livres do mel puro e do extrato etanólico do mel utilizando o reagente Folin-Ciocalteu foi de 156,63 e 230,66 mg GAE g^{-1}, respectivamente. Enquanto a potência redutora do íon férrico foi de uma CE_{50} 0,687 e 0,284 para o mel e o extrato etanólico do mel, respectivamente (Lima *et al.*, 2024).

A atividade de eliminação de radicais livres DPPH do extrato etanólico da própolis de *T. angustula* foi avaliado por Torres et al. (2018), sendo observada uma concentração inibidora de 50% do radical DPPH (IC_{50}) de 2433.0 mg/mL. Carneiro et al. (2016) encontraram resultados significativamente melhores utilizando o mesmo método com valores de IC_{50} de 293,35 e 734,99 μg/mL para diferentes amostras de própolis.

Antibacteriana

A atividade antimicrobiana dos subprodutos das abelhas sem ferrão se deve à presença de resinas antimicrobianas utilizadas na construção de ninhos pelas abelhas, dado que é necessário para manutenção de seus ninhos (Shanahan; Spivak, 2021). Diante disso, se faz necessário a investigação desses subprodutos para determinar a sua atividade antimicrobiana, visto que, existe um aumento da resistência bacteriana a drogas disponíveis no mercado, o que se deve ao uso irregular de antibióticos sem prescrição médica contribuindo assim para pressão seletiva de organismos resistentes (Torres *et al.*, 2021).

A atividade antibacteriana do mel de *Tetragonisca angustula* sobre diferentes espécies de patógenos tem sido relatada na literatura. No estudo de Zamora et al. (2015) foi demonstrada a atividade antibacteriana do mel através da Concentração inibitória Mínima - CIM sobre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina e eritromicina (ARSA-1 e ARSA-3), oxacilina, clindamicina, ciprofloxacina e eritromicina (ARSA-2 e ARSA-8), além de isolados resistentes apenas a oxacilina (ARSA-4, ARSA-5, ARSA-6 e ARSA-7) com CIM que variaram entre 125 e 250 mg/mL. Nesse estudo os autores também avaliaram isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidima, imipenem e meropenem (ARPA-1) e uma segunda cepa resistente a ceftazidima, piperacilina, tazobactam e gentamicina (ARPA-2), apresentando uma CIM de 125 mg/mL para ambos os isolados.

Resultados promissores foram encontrados por Zamora et al. (2014) ao avaliar a atividade antibacteriana do mel de *T. angustula* sobre as *S. aureus* ATCC 25923*, Listeria monocytogenes* ATCC 19116*, Escherichia coli* ATCC 25922*, Salmonella enteritidis* ATCC 13076*, P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. epidermidis* UCR 2902, obtendo uma CIM de 49.2; 97.3; 99.0; 196; 97.8; 96.6 mg/mL, respectivamente.

A medicina tradicional reconhece as propriedades antibacterianas do mel, atribuindo suas propriedades curativas à sua complexa composição química. Entre os elementos responsáveis por essas propriedades estão o peróxido de hidrogênio e outros compostos não peróxidos como os compostos fenólicos e flavonoides. Em relação ao peróxido de hidrogênio, sua ação é regulada pelas enzimas óxido de glicose e catalase, as quais estão presentes no mel. A óxido de glicose tem a função de induzir a produção de hidrogênio, enquanto a catalase atua na decomposição do peróxido de hidrogênio, resultando em um equilíbrio controlado de peróxido de hidrogênio, preservando simultaneamente o valor nutricional do mel (Rozman *et al.*, 2022).

Torres et al. (2004) atribuíram a atividade antibacteriana do mel à presença de peróxido de hidrogênio, pois quando avaliaram a mesma amostra de mel com a ausência do

peroxido de hidrogênio foi verificado o crescimento normal de todas as cepas avaliadas. Nesse estudo, os autores demonstraram atividade antibacteriana para as cepas de *Bacillus brevis* DSM 5609, *Bacillus megaterium* DSM 90, *Bacillus subtilis* DSM 347, *Micrococcus luteus* DSM 348, *E. coli* DSM 31 e *Pseudomonas seringae* DSM 5176 com ralos de inibição que variaram entre 7.3-18, 2-7, 13-46.7, 3.1-42, 2.8-21.7 e 7.2-10.3 mm, respectivamente. Esses resultados demonstram também que as bactérias Gram negativas eram mais sensíveis ao mel, sendo esse efeito justificado pela presença de compostos antibacterianos do mel que atuaram na perturbação da membrana até a interferência em processos vitais das bactérias.

Miorin et al. (2003) relataram que a atividade antibacteriana do mel sobre *S. aureus* ATCC 6538 estava associada aos compostos identificados na análise por CLAE, obtendo-se um valor de CIM que variou entre142.87 a 214.33 mg/mL. Nesse estudo, os autores também investigaram o potencial antibacteriano da própolis, demonstrando uma melhor atividade inibidora de *S. aureus* ATCC 6538 com valores de CIM que variaram entre 0,44-2,01 mg/mL, sendo essa atividade associada a presença de ácidos fenólicos.

Outros estudos mostraram que extratos de própolis têm propriedades antibacterianas contra alguns microrganismos. Carneiro et al. (2016) demonstraram atividade antibacteriana do extrato etanolico da propolis sobre *S. aures* com valor de CIM de mg/mL. Velikova et al. (Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae2000) atribuíram a ação antibacteriana da própolis sobre *S. aureus* a ácidos diterpénicos, evidenciada pelo valor do halo de inibição de 10 mm. O óleo volátil da própolis também apresentou atividade antibacteriana sobre *Mycoplasma pneumoniae*, com um valor de CIM de 109 µg/mL (Valcanaia *et al.*, 2022).

Manrique and Santana (2008) também demonstraram atividade antibacteriana da própolis sobre os patógenos *Micrococcus luteus* ATCC 9341 e *S. aureus* ATCC 25923, apresentando halos de inibição de 24.1 e 19.8 mm, respectivamente. Os autores afirmam que a atividade antimicrobiana da própolis avaliada mostrou influência sazonal, possivelmente associada a diferentes espécies de plantas que *T. angustula* forrageia e as diferentes condições fisiológicas dessas plantas.

Antifúngica

Os bioprodutos derivados da abelha sem ferrão *T. angustula* também foram relatados por apresentarem atividades antifúngicas. Valcanaia et al. (2022) avaliaram a atividade antifúngica do óleo volátil da própolis sobre as cepas de *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. krusei* e demonstraram uma CIM de > 875, 875, 875, 875 e 875

µgmL-1, respectivamente. Velikova et al. (2000) também demonstraram atividade antifúngica da própolis sobre *Candida albicans* 562 com halos de inibição de 11 e 13 mm.

No estudo de Zamora et al. (2014) foi verificada a atividade antifúngica do mel de *T. angustula* sobre a cepa *C. albicans* ATCC 10231, apresentando um valor de CIM de 195 mg/mL. Os autores afirmam que esse resultado é promissor e que investigações futuras são necessárias para o desenvolvimento de uma formulação para ser utilizada como pomadas em queimaduras e feridas, já que o mel atividade anti-*Candida*. Resultados semelhantes foram encontrados por Dardón e Enríquez (2008) quando avaliaram a atividade antifúngica do mel sobre cepas de *C. albicans* ATCC 10231 e *Criptococcus neoformans* CCQQ C-13, obtendo valores de inibição de crescimento de 10 e 5 %, respectivamente.

Antiprotozoária

A atividade antiprotozoária do mel de *T. angustula* foi demonstrada no estudo de Lima et al. (2021) sobre *Neospora caninum*. Esse parasita pertencente ao filo Apicomplexa e é conhecido por causar a neosporose, uma doença que afeta principalmente animais como bovinos, ovinos e caprinos. A neosporose é uma doença importante em animais de produção, pois pode ocasionar perdas reprodutivas significativas (Dubey; Schares, 2011). No estudo de Lima et al. (2021), o mel apresentou uma redução na taxa de parasitismos de 54 % na concentração de 12,5 µg/mL após 72 horas de exposição, enquanto a concentração de 25 µg/mL reduziu a parasitemia em 38 e 41% em diferentes amostras de mel analisadas.

Antiviral e Virucida

O extrato da própolis de *T. angustula* apresentou atividade virucida sobre Vírus da Diarreia Viral Bovina - BVDV após o período de 24 horas de incubação a 22°C, o título do vírus caiu de (3,16 log) para (2,3 log), enquanto na incubação a 37°C, a redução foi ainda mais efetiva, diminuindo de (3,5 log) para (2,3 log) (Peter *et al.*, 2017).

Conclusão e Análise Crítica

Neste trabalho, relatamos as principais famílias e espécies botânicas utilizados por *T. angustula* para forrageamento, além de abordar aspectos fitoquímicos e sobre as atividades biológicas do mel, própolis, geoprópolis e pólen fermentado (saburá) dessa espécie. Os estudos que investigaram a visitação floral dessa espécie destacam que as principais famílias

descritas na literatura são Fabaceae, Asteraceae, Malvaceae, Bignoniaceae, Solanaceae, Myrtaceae e Lamiaceae. A análise da composição química de produtos como mel, própolis, geoprópolis e pólen produzidos por *T. angustula*, demonstrou a presença de compostos pertencentes a classes dos flavonoides, ácidos fenólicos, terpenóides e alcalóides. Os dados disponíveis na literatura evidenciaram que estes produtos possuem propriedades biológicas significativas, destacando-se a atividade antibacteriana e antioxidante.

Para promover a utilização responsável das abelhas sem ferrão, é essencial adquirir conhecimento sobre as espécies de plantas que servem como fontes de recursos alimentares para essas abelhas em seus ambientes naturais. A observação direta no campo e a análise palinologia são abordagens que contribuem para aprimorar a lista de plantas identificadas como recursos para a espécie *Tetragonisca angustula*. As variações nos tipos de pólen descritos nessa revisão indicam diferentes fontes de alimentos utilizadas por essa espécie, o que sugere que a diversidade de espécies vegetais desempenha um papel de destaque como recursos nutricionais para essa espécie de abelha. Além disso, as plantas visitadas por as abelhas estão associadas a composição química dos bioprodutos produzidos na colmeia. Na presente revisão, os estudos que analisam os tipos de pólen coletados pelas abelhas e a sua relação com a composição química dos seus bioprodutos são escassos, havendo a necessidade de estudos que abordem essa temática.

Além disso, há uma carência significativa de informações na literatura sobre a composição química dos bioprodutos produzidos por *T. angustula*. As pesquisas existentes nesse campo geralmente se concentram na avaliação quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides. É importante destacar que a exploração da composição química dos bioprodutos produzidos pelos Meliponíneos ainda é limitada quando comparada a outras espécies de abelhas. Diante disso, se faz necessário a utilização de técnicas cromatográficas qualitativas e quantitativas para que forneçam um espectro mais preciso sobre os constituintes presentes nesses bioprodutos.

Apesar dessa lacuna na pesquisa, é esperado que a crescente investigação dos perfis químicos presentes nos bioprodutos de *T. angustula* esteja associado a um aumento nos estudos dedicados à exploração de suas atividades biológicas. Compreender como esses compostos interagem com sistemas biológicos pode possibilitar aplicações potenciais em diversas áreas, desde a saúde até a indústria, promovendo uma compreensão mais profunda do valor terapêutico e funcional desses bioprodutos.

Materiais e Métodos

A revisão sobre os dados referentes à visitação floral da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*, a composição química e atividades biológicas de produtos derivados dessa mesma espécie foram coletadas usando vários mecanismos de busca científica em bancos de dados, incluindo Scopus, Web of Science, ScienceDirect e PubMed. Para esta investigação bibliográfica, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: "*Tetragonisca angustula*"; "*Tetragonisca angustula* AND bioactivities"; "*Tetragonisca angustula* AND *chemical composition*". As buscas contemplaram todos os anos até o período de fevereiro de 2023 e foram focados em extensa revisão devido à deficiência de dados (Figura 3).

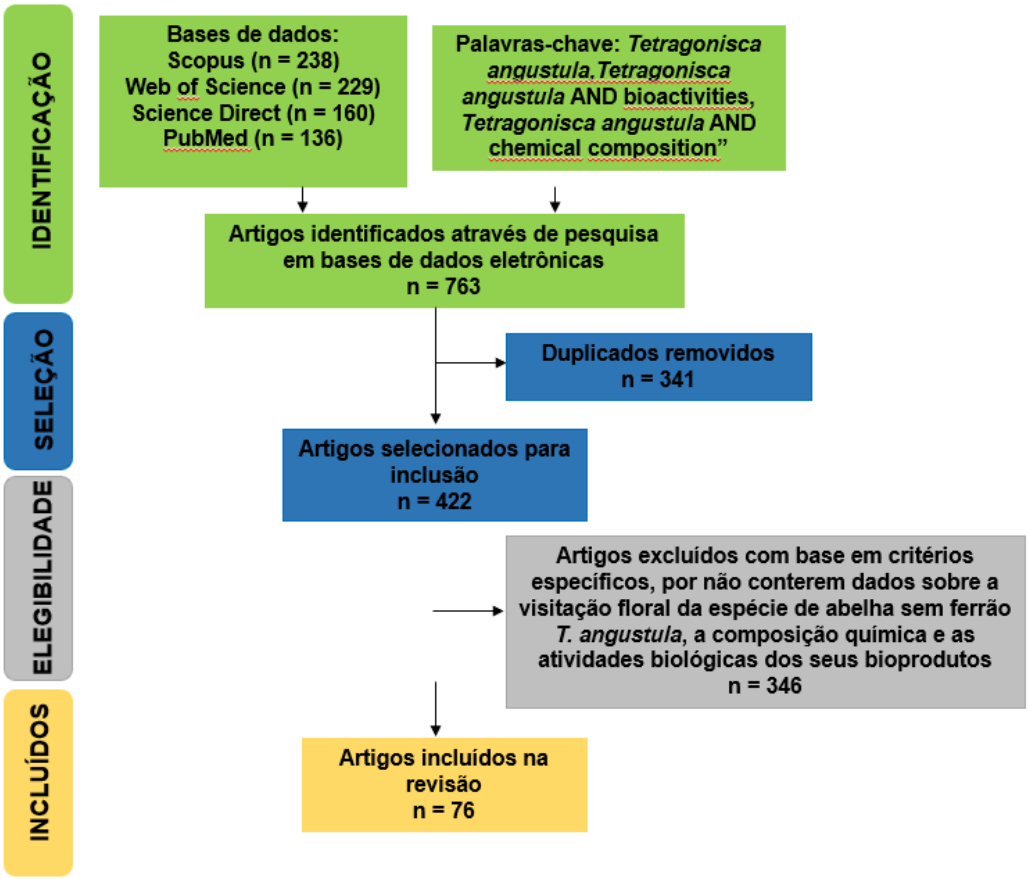


Figura 3: Diagrama de fluxo PRISMA com representação do processo de triagem dos estudos identificados e selecionados na revisão. Reproduzido da ref. (Page *et al.*, 2021) Copyright (2023), com permissão da Sociedade/Editora.

Para o refinamento da pesquisa, foram utilizados alguns critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão basearam-se em: [1] trabalhos que continham em seu título, resumo ou palavras-chave os descritores utilizados na busca; [2] artigos que incluíssem dados da visitação floral, composição química e atividades biológicas associadas a espécie

Tetragonisca angustula e seus bioprodutos; [3] artigos completos de estudos *in vivo* e *in vitro* nas línguas inglês, português e espanhol.

Os estudos foram excluídos se incluíssem: [1] estudos que não se enquadravam na categoria de estudo original (cartas para o editor, prefácios, comentários, editoriais, resenhas); [2] relatos de casos, artigos de revisão, livros, capítulos de livros, teses e dissertações; [3] estudos repetidos. As delimitações taxonômicas referentes as espécies de plantas visitadas por *T. angustula* encontradas nos estudos dessa revisão foram conferidas no The World Flora Online (http://www.worldfloraonline.org/), portanto, os nomes científicos foram corrigidos de acordo com a necessidade encontrada.

Agradecimentos

BPI BP5-0197-00174.01.00/22 EDITAL/CHAMADA: Bolsa de Produtividade em Pesquisa, Estímulo à Interiorização e Inovação Tecnológica – BPI 04/2022. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio.

Referências

Barth, A., Fernandes, A., das Pompolo, S.G., Costa, M.A., 2011. Occurrence of b chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. Genet. Mol. Biol. 34, 77–79. https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000100

Barth, M., Freitas, A. S., 2022. Stingless bee resources during reforestation of the Atlantic domain of Rio De Janeiro city, Brazil. J. Apic. Res. 1–41. https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2028386

Biluca, F.C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E.T.B., Vieira, G.N., Gonzaga, L.V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E.M., Costa, A.C.O., 2020. Investigation of phenolic compounds, antioxidants and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). Food Res. Int. 129, 108756. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756

Biluca, F.C., de Gois, J.S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L.V., Maltez, H.F., Rodrigues, E., Vitali, L., Micke, G.A., Borges, D.L.G., Costa, A.C.O., Fett, R., 2017. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). J. Food Compos. Anal. 63, 89–97. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.039

Braghini, F., Biluca, F.C., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Costa, A.C.O., Fett, R., 2021. Effect thermal processing in the honey of *Tetragonisca angustula*: profile physicochemical, individual phenolic compounds and antioxidant capacity. J. Apic. Res. 60, 290–296. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1737362

Cabe, S.I.M., Farina, W.M., 2010. Olfactory learning in the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol. 196, 481–490. https://doi.org/10.1007/s00359-010-0536-2

Campos, G., Della-Modesta, R.C., Silva, T.J.P., Baptista, K.E., Gomides, M.F., Godoy, R.L., 2003. Classificação do mel em floral ou mel de melato. Ciência e Tecnol. Aliment. 23, 1–5. https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000100002

Cane, J.H., 2021. A brief review of monolecty in bees and benefits of a broadened definition. Apidologie 52, 17–22. https://doi.org/10.1007/s13592-020-00785-y

Cardozo, D. V., Mokochinski, J.B., Machado, C.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, I.K., Felsner, M.L., Torres, Y.R., 2015. Chemical variability of geopropolis from Jataí, Mandaçaia and manduri stingless bees. Rev. Virtual Quim. 7, 2457–2474. https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150146

Carneiro, M.J., López, B.G.C., Lancellotti, M., Franchi, G.C., Nowill, A.E., Sawaya, A.C.H.F., 2016. Evaluación de la composición química y la actividad biológica de los extractos de propóleos de *Tetragonisca angustula* y *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). J. Apic. Res. 55, 315–323. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243295

Carvalho, C.A.L., Marchini, L.C., Ros, P.B., 1999. Fontes de pólen utilizadas por Apis mellifera L. e algumas espécies de Trigonini (apidae) em Piracicaba (SP). Bragantia 58, 49–56. https://doi.org/10.1590/s0006-87051999000100007

Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P.P., Zhang, J., Lamas, L.B., Flórez, S.M., Toyos, P.A., Quiles, J.L., Giampieri, F., Battino, M., 2018. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. Molecules 23, 1–20. https://doi.org/10.3390/molecules23092322

Conesa, J.G., Chirino, J.E., Guzmán, E.L., Cruz, F.M., Flores, V.A., García, A.L., 2021. Stingless bees propolis antimicrobial activity in combination with garlic, *Allium sativum* (Amaryllidaceae). Rev. Biol. Trop. 69, 23–35. https://doi.org/10.15517/rbt.v69i1.41241

Dardón, M.J., Enríquez, E., 2008. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meloponini) de Guatemala. Interciencia 33, 916–922.

de Lima, P.M. da S., de Lima, L.S., Caetano, Í.K., Torres, Y.R., 2017. Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC–MS. Food Res. Int. 102, 536–543. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.036

De Novais, J.S., Absy, M.L., 2015. Melissopalynological records of honeys from *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) in the Lower Amazon, Brazil: Pollen spectra and concentration. J. Apic. Res. 54, 11–29. https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1041294

De Novais, J.S., Absy, M.L., 2014. Palynological examination of the pollen pots of native stingless bees from the Lower Amazon region in Pará, Brazil. Palynology 37, 218–230. https://doi.org/10.1080/01916122.2013.787127

Dubey, J.P., Schares, G., 2011. Neosporosis in animals—The last five years. Vet. Parasitol. 180, 90–108. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031

Ferreira, B.L., Gonzaga, L.V., Vitali, L., Micke, G.A., Baggio, D., de Oliveira Costa, A.C., Fett, R., 2020. Dataset about Southern-Brazilian geopropolis: Physical and chemical perspectives. Data Br. 29, 105109. https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105109

Ferreira, B.L., Gonzaga, L.V., Vitali, L., Micke, G.A., Maltez, H.F., Ressureição, C., Costa, A.C.O., Fett, R., 2019. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic

compounds and assessment of mineral composition. Food Res. Int. 126, 108683. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108683

Grüter, C., Kärcher, M.H., Ratnieks, F.L.W., 2011. The natural history of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance guards. Neotrop. Entomol. 40, 55–61. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000100008

Imperatriz-Fonseca, V.L., Matos, E.T., Ferreira, F., Velthuis, H.H.W., 1998. A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). Insectes Soc. 45, 231–233. https://doi.org/10.1007/s000400050083

Jones, S.M., van Zweden, J.S., Grüter, C., Menezes, C., Alves, D.A., Nunes-Silva, P., Czaczkes, T., Imperatriz-Fonseca, V.L., Ratnieks, F.L.W., 2012. The role of wax and resin in the nestmate recognition system of a stingless bee, *Tetragonisca angustula.* Behav. Ecol. Sociobiol. 66, 1–12. https://doi.org/10.1007/s00265-011-1246-7

Koling, D.F., Moretto, G., 2010. Mitochondrial discrimination of stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) from Santa Catarina state, Brazil. Apidologie 41, 454–462. https://doi.org/10.1051/apido/2009082

Lavinas, F.C., Macedo, E.H.B.C., Sá, G.B.L., Amaral, A.C.F., Silva, J.R.A., Azevedo, M.M.B., Vieira, B.A., Domingos, T.F.S., Vermelho, A.B., Carneiro, C.S., Rodrigues, I.A., 2019. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. Rev. Bras. Farmacogn. 29, 389–399. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.007

Lima, Â.C. d. O., Conceição, R.S., Freitas, L.S., de Carvalho, C.A.L., Conceição, A.L. d. S., Freitas, H.F., Pita, S.S. d. R., Ifa, D.R., Pinheiro, A.M., Branco, A., 2021. Hydroxycinnamic acid-spermidine amides from *Tetragonisca angustula* honey as anti-Neospora caninum: In vitro and in silico studies. Chem. Biol. Drug Des. 98, 1104–1115. https://doi.org/10.1111/cbdd.13969

Lima, C.O., Dias, E.R., Reis, I.M.A., Carneiro, K.O., Pinheiro, A.M., Nascimento, A.S., Silva, S.M.P.C., Carvalho, C.A.L., Mendonça, A.V.R., Vieira, I.J.C., Braz Filho, R., Branco, A., 2024. Ferulic acid as major antioxidant phenolic compound of the *Tetragonisca angustula* honey collected in Vera Cruz-Itaparica Island, Bahia, Brazil. Brazilian J. Biol. 84, 1–10. https://doi.org/10.1590/1519-6984.253599

Lira, A.F., De Mello Sousa, J.P.L., Lorenzon, M.C.A., Vianna, C.A.F.J., Castro, R.N., 2014. Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos. Acta Vet. Bras. 8, 169–178.

Maciel, C.R., Bastos, C.A.C., Martins, R.R.C., Bobany, D. de M., 2015. Atividade antimicrobiana da geoprópolis da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) contra bactérias isoladas em leite de vacas mestiças leiteiras com mastite. Arch. Vet. Sci. 20, 00–00.

Manrique, A.J., Santana, W.C., 2008. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. Zootec. Trop. 26, 157–166.

Medina-Jaramillo, C., Carvajal-Díaz, L.M., López-Córdoba, A., 2022. Propolis from native Stingless Bees: ultrasound-assisted extraction. Vitae 29, 1–10. https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v29n2a347446

Miorin, P.L., Levy, N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A., Marcucci, M.C., 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from Apis mellifera and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 95, 913–920. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02050.x

Nogueira, D.S., 2023. Overview of Stingless Bees in Brazil (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). EntomoBrasilis 16, e1041. https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v16.e1041

Oliveira, R. de C., Nunes, F. de M.F., Campos, A.P.S., de Vasconcelos, S.M., Roubik, D., Goulart, L.R., Kerr, W.E., 2004. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae,Trigonini) based on rapd markers. Genet. Mol. Biol. 27, 181–186. https://doi.org/10.1590/s1415-47572004000200009

Page, M.J., Moher, D., Bossuyt, P.M., Boutron, I., Hoffmann, T.C., Mulrow, C.D., Shamseer, L., Tetzlaff, J.M., Akl, E.A., Brennan, S.E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J.M., Hróbjartsson, A., Lalu, M.M., Li, T., Loder, E.W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., McGuinness, L.A., Stewart, L.A., Thomas, J., Tricco, A.C., Welch, V.A., Whiting, P., McKenzie, J.E., 2021. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. BMJ 372, 160. https://doi.org/10.1136/bmj.n160

Pereira, A. dos S., Bicalho, B., Aquino Neto, F.R., 2003. Comparison of propolis from Apis mellifera and *Tetragonisca angustula*. Apidologie 34, 291–298. https://doi.org/10.1051/apido:2003023

Peter, C.M., Picoli, T., Zani, J.L., Latosinski, G.S., de Lima, M., Vargas, G.D., Hübner, S. de O., Fischer, G., 2017. Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpersvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Pesqui. Vet. Bras. 37, 667–675. https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017000700003

Prado, M.A., Urrego, L.E., Durán, L.I., Hernández, J., 2021. Effect of climate seasonality and vegetation cover on floral resource selection by two stingless bee species. Apidologie 52, 974–989. https://doi.org/10.1007/s13592-021-00881-7

Radaeski, J.N., Bauermann, S.G., 2021. Contributions to melissopalynology studies in southern Brazil: pollen analysis in the honeys from *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula, Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata, Plebeia remota* and *Plebeia droryana*. Palynology 45, 477–486. https://doi.org/10.1080/01916122.2020.1869113

Rodríguez-Malaver, A.J., Rasmussen, C., Gutiérrez, M.G., Gil, F., Nieves, B., Vit, P., 2009. Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. Nat. Prod. Commun. 4, 1221–1226. https://doi.org/10.1177/1934578x0900400913

Roubik, D.W., 2023. Stingless Bee (Apidae: Apinae: Meliponini) Ecology. Annu. Rev. Entomol. 68, 231–256. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120120-103938

Rozman, A.S., Hashim, N., Maringgal, B., Abdan, K., 2022. A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. Appl. Sci. 12. https://doi.org/10.3390/app12136370

Sadala-Castilho, R., Machado, S.R., Sá-Haiad, B., Lima, H.A., 2016. Oil-resin glands in Velloziaceae flowers: structure, ontogenesis and secretion. Plant Syst. Evol. 302, 585–599. https://doi.org/10.1007/s00606-016-1287-5

Saraiva-Nava, A., Niemeyer, H.M.., Pinto, C.F., 2018. Pollen Types Used by the Native Stingless Bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille), in an Amazon-Chiquitano Transitional Forest of Bolivia. Neotrop Entomol 47, 798–807. https://doi.org/10.1007/s13744-018-0612-9 ECOLOGY,

SAWAYA, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., MARCUCCI, M.C., RODRIGUES, R.F. de O., EBERLIN, M.N., 2007. Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against Varroa destructor. Apidologie 38, 67–76. https://doi.org/10.1051/apido

Shanahan, M., Spivak, M., 2021. Resin use by stingless bees: A review. Insects 12. https://doi.org/10.3390/insects12080719

Souza, C.M., Cavalcante da Silva, S.M.P., Nascimento, A.S. do, Silva, F. de L., Bagaldo, A.R., Carvalho, C.A.L. de, 2022. Chemical and microbiological characterization of "samburá" from two stingless bee species. J. Apic. Res. 61, 70–78. https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1918408

Souza, E.C.A., Menezes, C., Flach, A., 2021. Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. Apidologie 52, 113–132. https://doi.org/10.1007/s13592-020-00802-0

Torres, A., Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I., 2004. Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of "angelita" honey - A product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. Thermochim. Acta 415, 107–113. https://doi.org/10.1016/j.tca.2003.06.005

Torres, A., Hoffmann, W., Lamprecht, I., 2007. Thermal investigations of a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula* Illiger in Colombia. Thermochim. Acta 458, 118–123. https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.024

Torres, A.R., Sandjo, L.P., Friedemann, M.T., Tomazzoli, M.M., Maraschin, M., Mello, C.F., Santos, A.R.S., 2018. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. Brazilian J. Med. Biol. Res. 51, 1–10. https://doi.org/10.1590/1414-431X20187118

Torres, N.F., Chibi, B., Kuupiel, D., Solomon, V.P., Mashamba-Thompson, T.P., Middleton, L.E., 2021. The use of non-prescribed antibiotics; prevalence estimates in low-and-middle-income countries. A systematic review and meta-analysis. Arch. Public Heal. 79, 1–15. https://doi.org/10.1186/s13690-020-00517-9

Tran, T.D., Ogbourne, S.M., Brooks, P.R., Norberto, S., Medina-franco, J.L., Quinn, R.J., 2020. Lessons from Exploring Chemical Space and Chemical Diversity of Propolis Components.

Turco, J.F., do Nascimento, C.L., de Lima, V.A., Torres, Y.R., 2020. Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra? Microchem. J. 157, 10503. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105031

Urquizo, O.N., Cardozo, F., Marcia, A., Lozano, R., Calcina, S., Alvarado, K.C., Niemeyer, H.M., Pinto, C.F., 2022. Pollen Preference Patterns by *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) in a Boliviano – Tucumano Forest. Neotrop. Entomol. 649–659. https://doi.org/10.1007/s13744-022-00986-3

Valcanaia, C.P., Berkenbrock, B., Sommer, F., Schiquet, S., Padilha, B., Krepsky, L., Paganelli, J., Borges, P.P., Danielli, J., Apel, A., Soares, D., Althoff, S., Alberton, D., Rensi, K., Guedes, A., Cordova, C.M.M. de, 2022. Antimicrobial Activity of Volatile Oils from Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* Propolis. Chem. Biodivers. 19, e202200369. https://doi.org/10.1002/cbdv.202200369

Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 2000a. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci. 55, 785–789. https://doi.org/10.1515/znc-2000-9-1018

Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., 2000b. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. Fitoterapia 71, 693–696. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00213-6

Vieira, K.I.C., da Luz, C.F.P., Fidalgo, A. de O., Moreira, N.C., Resende, H.C., 2020. Floral resources used by *Tetragonisca angustula* (Latreille 1811) in areas under the influence of the breach of the Fundão Dam in Mariana (Minas Gerais, Brazil). Grana 59, 273–303. https://doi.org/10.1080/00173134.2020.1721557

Villacrés-Granda, I., Coello, D., Proaño, A., Ballesteros, I., Roubik, D.W., Jijón, G., Granda-Albuja, G., Granda-Albuja, S., Abreu-Naranjo, R., Maza, F., Tejera, E., González-Paramás, A.M., Bullón, P., Alvarez-Suarez, J.M., 2021. Honey quality parameters, chemical composition and antimicrobial activity in twelve Ecuadorian stingless bees (Apidae: Apinae: Meliponini) tested against multiresistant human pathogens. LWT 140, 110737. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110737

Zamora, G., Beukelman, K., Van Den Berg, B., Arias, M.L., Umaña, E., Aguilar, I., Sánchez, L.A., Fallas, N., Van Ufford, L.Q., Gross, N., 2014. The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. J. Apic. Res. 53, 503–513. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.04

Zamora, G., Kees, B., Bert, van den B., Laura, A.M., Eduardo, U., Ingrid, A., Nathalia, F., 2015. Stingless Bee Honeys from Costa Rica Exhibit Antimicrobial Activity Against Antibiotic-resistant Clinical Isolates. J. Biol. Act. Prod. from Nat. 5, 144–149. https://doi.org/10.1080/22311866.2015.1053099

Zamora, L.G., Beukelman, C.J., Van Den Berg, A.J.J., Aerts, P.C., Van Ufford, H.C.Q., Nijland, R., Arias, M.L., 2017. An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. J. Wound Care 26, 168–177. https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.4.168

Zweden, J.S. van, Grüter, C., Jones, S.M., Ratnieks, F.L.W., 2011. Hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* increase colony defensive perimeter as shown by intra- and inter-specific comparisons. Behav. Ecol. Sociobiol. 65, 1277–1282. https://doi.org/10.1007/s00265-011-1141-2

4.2. CAPÍTULO II: Caracterização química, atividade antibacteriana e antifúngica dos potes de mel e dos potes de pólen obtidos da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

Artigo em português/Revista: *Food and Chemical Toxicology*
Qualis: A1 |Situação: Publicado| DOI: 10.1016/j.fct.2025.115305

Nair Silva Macêdo[1], Zildene de Sousa Silveira[2], Débora Menezes Dantas[1], Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa[1], Antonia Thassya Lucas dos Santos[1], Thiago Araújo de Medeiros Brito[3], Josean Fechine Tavares[3], Débora Odília Duarte Leite[4], Priscilla Ramos Freitas Alexandre[1], José Galberto Martins da Costa[4], Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino[1], Henrique Douglas Melo Coutinho [1], Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga, Francisco Assis Bezerra da Cunha[1]

1. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica - PPQB da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brasil

2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PPGCB da Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil

3. Universidade Federal da Paraíba - UFBP, Laboratório Multiusuário de Caracterização de Análises, João Pessoa, Paraíba, Brasil

4. Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais – LPPN da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brasil

Resumo

A atividade antimicrobiana dos subprodutos de abelhas sem ferrão está associada às resinas antimicrobianas usadas na construção de ninhos. Devido ao aumento da resistência bacteriana causada pelo uso inadequado de medicamentos, é fundamental investigar esses subprodutos. Este estudo teve como objetivo determinar a composição química dos extratos etanólicos dos potes de mel (EEPMTa) e de pólen (EEPPTa) da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*, além de avaliar sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A composição química foi determinada por CLAE-Q-TOF-MS/MS e CLAE-DAD, e os ensaios antimicrobianos, pelo método de microdiluição em caldo. Foram identificados 11 compostos no EEPMTa e 9 no EEPPTa, incluindo cirsimaritina, 3′-prenilnaringenina, xantohumol, lespedezaflavanona B e ácido 19α-hidroxi-ursólico. Os extratos potencializaram a ação da norfloxacina contra *S. aureus* (CIM de 256 para 128 µg/mL). Com gentamicina, o EEPMTa reduziu a CIM de 17,95

para 11,31 µg/mL, e o EEPPTa para 12,69 µg/mL. Apenas o EEPMTa foi eficaz com ampicilina, reduzindo a CIM de 71,83 para 31,7 µg/mL. Contra *P. aeruginosa*, o EEPMTa potencializou a gentamicina (CIM de 8 para 4 µg/mL), enquanto o EEPPTa teve efeito antagônico. Em *E. coli*, apenas o EEPPTa reduziu a CIM de 64 para 57,01 µg/mL. O EEPMTa apresentou menores CI_{50} frente às leveduras (*C. albicans*: 65,47 µg/mL; *C. tropicalis*: 29,79 µg/mL) em comparação ao EEPPTa (*C. albicans*: 820,7 µg/mL; *C. tropicalis*: 809,9 µg/mL). Ambos potencializaram o efeito do fluconazol contra *C. albicans*, mas não apresentaram efeito para a cepa de *C. tropicalis.* Os resultados destacam o potencial terapêutico dos metabólitos secundários dos extratos, reforçando sua importância no desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas e antifúngicas.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Resistência microbiana; Meliponíneos.

Introdução

A região do semiárido brasileiro possui grande diversidade de espécies de abelhas sem ferrão devido apresentar uma vasta área territorial, caracterizada por períodos de floração intensa e diversa nas estações secas e chuvosas, além de possuir uma faixa de clima variável, contribuindo assim para a prática da meliponicultura (Costa *et al.*, 2018). No Brasil, são descritas cerca de 259 espécies de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), distribuídas em 28 gêneros (Nogueira, 2023; Pedro, 2014)**.**

Essas espécies são também conhecidas como eussociais e são identificadas a partir da atrofia do ferrão (Acciones farmacológicas de extractos de propóleos de abejas sin aguijón (Meliponini)Sanches; Pereira; Serrão, 2017). Além disso, constituem um importante grupo de polinizadores generalistas, apresentando importância socioambiental, como também econômica (Hoshiba; Sasaki, 2008; Santana *et al.*, 2020).

T*etragonisca angustula* (Latreille, 1811) é uma abelha indígena sem ferrão neotropical, conhecida popularmente como Jataí, tendo ampla distribuição em território brasileiro, sendo caracterizada por apresentar um tamanho pequeno, possuir uma cor dourada e pode ser encontrada em troncos ocos de árvores ou muros de pedra (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1998).

A variedade de espécies de plantas visitadas por *T. angustula* está associada a composição química dos seus subprodutos derivados da polinização como o mel, própolis, geoprópolis e pólen (saburá). Dentre os principais compostos encontrados nesses subprodutos estão ácido *p*-cumárico, naringenina, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina, apigenina, ácido cinâmico, aromadendrina, galangina e ácido protocatecuico (Biluca *et al.*, 2017, 2020; Braghini *et al.*, 2021). Em decorrência da composição química variada, tem sido relatado na

literatura que os subprodutos de *T. angustula* apresentam algumas propriedades biológicas, como a antimicrobiana e antioxidante (Miorin *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2018).

A atividade antimicrobiana dos subprodutos das abelhas sem ferrão se deve à presença de resinas antimicrobianas utilizadas na construção de ninhos pelas abelhas, dado que é necessário para manutenção de seus ninhos (Shanahan; Spivak, 2021). Diante disso, se faz necessário a investigação desses subprodutos para determinar a sua atividade antimicrobiana, visto que, existe um aumento da resistência bacteriana a drogas disponíveis no mercado, o que se deve ao uso irregular de fármacos sem prescrição médica contribuindo para pressão seletiva de organismos resistentes (Torres *et al.*, 2021).

Dentre os microrganismos que apresentam resistência bacteriana está *Staphylococcus aureus*, caracterizada como uma bactéria Gram-positiva é responsável por causar diversas infecções em ambientes nosocomiais como infecções de pele, bacteremia, endocardite, pneumonia e intoxicação alimentar (Gnanamani; Hariharan; Paul-Satyaseela, 2018).

Dentro do grupo das bactérias Gram-negativas está *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria anaeróbia facultativa associada a infecções hospitalares em todo o mundo, com índices elevados de resistência a antibióticos ou desinfectantes (Pang *et al.*, 2019; Santajit; Indrawattana, 2016). *Escherichia coli* também é uma bactéria Gram-negativa podendo causar infecções graves em humanos e animais, apresentando principalmente genes de resistência associada a fármacos da classe dos β-lactâmicos (Poirel *et al.*, 2018). Dentre as cepas fúngicas resistentes a antifúngicos como azóis, anfotericina B e equinocandinas, está a cepa de *Candida albicans*, caracterizada como uma levedura dimórfica, predominante em mais de 80% das lesões orais, cuja patogenicidade é favorecida por sua capacidade de alternar entre formas morfológicas e formar biofilmes, elementos cruciais para sua virulência (de Barros *et al.*, 2018; Gulati; Nobile, 2016; Nobile; Johnson, 2015). *Candida tropicalis*, considerada a segunda espécie de fungos mais virulenta, apresenta alta aderência às células epiteliais e endoteliais, além de ser uma forte produtora de biofilmes (Zuza-Alves; Silva-Rocha; Chaves, 2017).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi determinar a composição química dos extratos etanólico dos potes de mel e potes de pólen da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula*, bem como, avaliar a atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e atividade antifúngica sobre cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

Materiais e Métodos

Coleta e Preparação dos extratos

As amostras de potes de mel e potes de pólen de *Tetragonisca angustula* de foram coletadas no mês de agosto de 2022 no município de Crato, Ceará, Brasil sob as coordenadas geográficas 7º13'53" de latitude sul e 39º23'57" longitude oeste de Greenwich. As amostras coletadas foram trituradas manualmente e submersas em solvente etanol 99,5º, separadamente em temperatura ambiente por 72 h. Após esse período, a solução obtida foi filtrada e submetida à destilação do solvente em um aparelho rotaevaporador a vácuo (*Fisatom Scientific Equipment* Ltd., Brasil), onde o extrato bruto obtido foi levado ao banho-maria (*Quimis Scientific Equipment* Ltd., Brasil) para evaporação do excesso de solvente. O Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *T. angustula* foi denominado EEPMTa e o Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *T. angustula* foi denominado EEPPTa. Os rendimentos obtidos foram de 7,30% para o EEPMTa e 19,76% para EEPPTa.

Este estudo foi registrado e autorizado pelo Sistema de Informação e Autorização da Biodiversidade (SISBio) sob o número 85029.

Caracterização química

Caracterização química por CLAE-Q-TOF-MS/MS

Quinze microlitros de cada amostra, EEPMTa e EEPPTa (1mg/mL), foram injetados separadamente no LC 40D X3 (Shimadzu) equipado com os módulos CBM-40, DGU-40S, LC 40D X3, SIL-40C X3 e CTD-40S, acoplado a um espectrômetro de massas LCMS-9050 (Shimadzu) com uma fonte de ionização electrospray (ESI) e um analisador Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF). Experimentos de LC foram realizados utilizando uma coluna C18 (Kromasil-250 mm x 4.6 mm x 5.0 µm). A fase móvel consistiu em uma solução ácido fórmico/água 0,1% v/v (Solvente A) e Metanol (Solvente B). Um gradiente linear (60-100%) foi realizado para eluição em 60 min, com um fluxo de 0,6 mL/min. Os parâmetros das análises para espectrômetros de massas foram os seguintes: voltagem do capilar: -3,0 kV, fluxo do gás nebulizador de 3,0 L/min, gás de secagem com fluxo de 10 ml/min e temperatura da interface de 300ºC. As substâncias foram analisadas no modo de ionização negativo (m/z 100-1200). Os dados obtidos foram interpretados com o auxílio da revisão da literatura, plataforma da global of natural products social (GNPS), SciFinder e Massbank.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo linear de diodos – CLAE-DAD

Foram preparadas soluções padrões para os (07) ácidos fenólicos e flavonoides (Sigma Aldrich) investigados, a saber: Ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, naringenina, pinocembrina e apigenina. As soluções foram preparadas dissolvendo os padrões em metanol grau HPLC (Agilent Technologies, Germany) para produzir soluções estoque de 1000 ppm, que foram então usadas para preparar as soluções de concentrações de 1 a 50 ppm. As absorbâncias dos padrões de 20 ppm de cada ácido fenólico e flavonoide foi medida em comprimentos de onda 190 a 400 nm para encontrar o comprimento de onda ideal para as medições CLAE-DAD.

A análise por CLAE dos ácidos fenólicos e flavonóides foi realizada utilizando um sistema HPLC Agilent 1260 (Agilent Tech., Germany), equipado com um UV-Vis DAD. A separação foi conduzida, por método gradiente, utilizando uma coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4,0 mm x 5 µm, Macherey-Nagel Germany). As soluções padrões fenólicas e as misturas foram injetadas no sistema usando um autoinjetor. A fase móvel constituída por uma mistura de solvente sendo A (água ultrapura) e B (metanol:acetonitrila, 60:40, grau HPLC, Agilent Tech., Germany), ambas acidificadas com ácido fórmico 0,1% (Sigma Aldrich) utilizando o seguinte gradiente de eluição: 0- 15min: 15% B em A; 17 min: 40% B em A; 30 min: 30% B em A, 38 min: 15% B em A se mantendo nessa composição até 45 min. Os comprimentos de onda utilizados foram de 310 nm para ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico; 290 nm para ácido cinâmico, naringenina e pinocembrina; e 340 nm para apigenina. Foi utilizado taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. As fases móveis e todas as soluções e amostras foram filtrados através de um filtro de membrana Millipore, diâmetro do filtro 13 mm, diâmetro do poro 0,22µm (milllipore).

As amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC (30 mg/mL). A quantificação foi realizada integrando os picos utilizando o método padrão externo. As análises foram conduzidas à temperatura ambiente e em triplicata, e os picos foram confirmados comparando o seu tempo de retenção com os das normas de referência e por espectros DAD (190 a 400 nm). As quantificações dos compostos foram baseadas em curvas analíticas das normas referenciais. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das respostas e na inclinação, utilizando três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculadas como 3,3 e 10 σ/S, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.

Avaliação da atividade antibacteriana

Estirpes bacterianas e Meios de Cultura

Nos ensaios para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Escherichia coli* 06; e cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e *E. coli* (ATCC 25922), as quais foram cultivadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Para a realização dos testes microbiológicos, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Ágar Cérebro-Coração (BHI) (Acumedia Manufacturers, EUA), preparado de acordo com as instruções do fabricante, e BHI caldo (Acumedia Manufacturers, EUA), preparado na mesma concentração de 10%.

Substâncias

Os antibióticos utilizados no teste foram gentamicina, norfloxacina e ampicilina (Sigma Co., St. Louis, EUA). Os antibióticos, bem como o EEPMTa e EEPPTa (10 mg) utilizados no teste foram dissolvidos em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada esterilizada até atingir a concentração de 1024 μg/mL. A proporção de DMSO utilizada foi inferior a 5%.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM para os extratos foi realizada de acordo com o método de microdiluição em caldo proposto por Javadpour et al. (1996) com adaptações. As cepas padrão e multirresistentes utilizadas nos testes foram semeadas 24 h antes dos experimentos. Após esse período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland, ou aproximadamente $1{,}5\times10^{8}$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Microtubos (Eppendorfs, Ala Artefacts Laboratories, Brasil) foram preenchidos com 900 μL de BHI e 100 μL de inóculo e as placas foram preenchidas com 100 μL da solução final. A microdiluição foi realizada com 100 μL em diluições seriadas até a penúltima cavidade da placa (1:1). As concentrações dos compostos variaram de 512 μg/mL a 8 μg/mL. Para o controle negativo, foram utilizadas as últimas fileiras de cavidades das placas de microdiluição, onde apenas o meio de cultura e o inóculo bacteriano foram adicionados sem a adição das substâncias testadas, para verificar a formação máxima do número de colônias bacterianas, além de provar que o inóculo foi adicionado corretamente ao Eppendorfs®.

Após 24 horas de incubação, as leituras foram realizadas adicionando-se 20 µL de resazurina (7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona) (Exodo, Brasil). A resazurina foi oxidada na presença do meio ácido causado pelo crescimento bacteriano, promovendo a mudança de cor do azul para o rosa (Elshikh *et al.*, 2016). A CIM foi definida como a menor concentração em que não foi observado crescimento (Andrews, 2001). Os testes foram realizados em triplicata.

Avaliação da atividade de modificação do efeito dos antibióticos

O aumento da atividade antibiótica pelos extratos foi avaliado por através da modificação nas CIMs de gentamicina, norfloxacina e ampicilina contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 e *S. aureus* 10. Para tanto, esses antibióticos foram combinados com o EEPMTa e EEPPTa em concentração subinibitória (CIM/8) (Coutinho *et al.*, 2008). Nos testes, 150 µL de cada inóculo bacteriano suspenso em soro fisiológico, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente 1,5 x 10^8 (UFC)/mL, foi adicionado juntamente com os extratos (MIC/8) e completado com BHI para um volume 1500 µL. Estes foram então transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, às quais foram adicionados 100 µL de antibiótico em diluições seriadas (1:1), variando de 512 a 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 ºC por 24h e o crescimento bacteriano foi avaliado com a adição de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) através da verificação da oxidação do reagente na presença de meio ácido, causando a mudança de cor de azul para rosa (Elshikh *et al.*, 2016). A CIM dos controles foi avaliada utilizando apenas placas com antibióticos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os controles negativos foram feitos utilizando apenas o meio de cultura e o inóculo bacteriano para o controle de crescimento bacteriano e apenas o meio de cultura para o controle de esterilidade.

2.5. Ensaios antifúngicos

Microrganismos e Meios de cultura

Para a avaliação da atividade antifúngica, foram utilizadas as cepas padrão de *Candida albicans* CA INCQS 40006 (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* CT INCQS 40042 (ATCC 13803), as quais foram obtidas a partir da Coleção de Cultura Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Os meios de cultura utilizados foram, *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), preparado de acordo com as instruções do fabricante e *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB, HIMEDIA,

Mumbai, Índia), duplo concentrado. Os meios foram solubilizados com água destilada e autoclavados a 121 °C por 15 min.

Preparação do inóculo e soluções

As cepas fúngicas foram cultivadas em placas de Petri contendo Sabourand Dextrose Agar (SDA) e posteriormente levadas para estufa à temperatura de 37 °C por um período de 24 horas. Os inóculos foram preparados em tubos de ensaio contendo 4 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), tendo sua turbidez ajustada de acordo com a escala de McFarland ($0,5 \times 10^3$ UFC). A partir dessa solução, 100 µL foram transferidos para outro tubo contendo 4900 µL de SDB, o que corresponde a uma diluição de 1/50. Em seguida, 400 µL do inóculo de 1/50 foram transferidos para outro tubo contendo 7600 µL de SDB, o que corresponde a uma diluição de 1/20, conforme proposto por CLSI (2017), com modificações.

Os extratos etanólicos dos potes de mel e potes de pólen de *T. angustula* e o antifúngico fluconazol foram inicialmente solubilizados em dimetilsulfóxido (0,5% DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha), e posteriormente completados com meio de cultura SDB até atingirem a concentração matriz de 1024 µg/mL de acordo com a metodologia descrita por CLSI (2017), com adaptações.

Curva de crescimento celular e concentração inibitória de 50% (CI_{50})

Para determinação da curva de crescimento fúngico e CI_{50} utilizou-se o método de microdiluição em caldo. Para tanto foram adicionados 100 µL de meio de cultura foram transferidos para placas de 96 poços. Em seguida, a microdiluição foi realizada com os produtos e/ou fluconazol com concentrações que variaram de 1024 a 2 µg/mL, seguida da adição de 10 µL de inóculo a cada poço. O teste foi realizado em quadruplicata e todas as placas foram incubadas em uma estufa por um período de 24 horas a 35 ºC, conforme metodologia descrita por CLSI (2017), com algumas modificações. As placas foram analisadas em um dispositivo de espectrofotometria ELISA (Thermoplate ®) em um comprimento de onda de 630 nm. Os dados obtidos foram usados estatisticamente para obter a curva de viabilidade celular e a CI_{50}. Nesse teste também foram preparados o controle de esterilidade e controles de diluição dos extratos, sendo nesse último o inóculo substituído por solução salina (Morais-Braga *et al.*, 2016).

Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Os ensaios de determinação da CFM foram realizados de acordo com o método descrito por Fonseca e colaboradores (2022), sendo verificado se os extratos EEPMTa e EEPPTa eram capazes de interferir na viabilidade das células de *Candida*. Para isso, 10 µL de cada poço das placas dos ensaios de curva de viabilidade celular (exceto para os controles) foram transferidos para placas de Petri contendo meio SDA e distribuídos de acordo com um cartão-guia colocado na parte externa inferior da placa. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas e depois avaliadas quanto à presença de colônias de fungos. A menor concentração sem crescimento das cepas testadas foi considerada a CFM do extrato.

Avaliação da atividade modificadora do efeito do fluconazol

O efeito combinado dos extratos com o fluconazol foi avaliado para verificar se os extratos eram capazes de potencializar o fármaco antifúngico. As soluções contendo os extratos foram testadas em uma concentração subinibitória da concentração matriz (MC/8), seguindo a metodologia descrita por Coutinho et al. (2008), com modificações. As placas foram preenchidas com 100 µL de uma solução contendo meio, produto e inóculo, sendo em seguida, adicionado o fluconazol em concentrações que variaram de 1024 a 2 µg/mL. Os últimos poços foram reservados para o crescimento de microrganismos e controles de esterilidade, já os controles da diluição dos produtos em combinação com fluconazol foram feitos em placas separadas. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 ºC por 24 horas e a leitura foi realizada por espectrometria em um comprimento de onda de 630 nm (Morais-Braga *et al.*, 2016).

Análise estatística

Os ensaios antibacterianos foram realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada por meio de uma ANOVA *one-way* ou *two-way*, seguido do teste *post hoc* de Dunnett. Os resultados foram expressos em média geométrica sendo considerados significativos valores $p < 0,05$. Já para os ensaios antifúngicos uma ANOVA *two-way* foi aplicada, comparando-se os valores de cada concentração de extrato usando o teste *post-hoc* de Bonferroni, no qual $p < 0,0001$ são considerados significativos. Os valores de CI_{50} foram obtidos por regressão não linear com interpolação desconhecida das curvas padrão obtidas a partir dos valores de crescimento fúngico em função da concentração do extrato, expressa em µg/mL. Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 6.0.

Resultados e Discussão

Caracterização Química dos Extratos Etanólicos dos Potes do Mel e dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Caracterização química por CLAE-Q-TOF-MS/MS

A identificação dos compostos foi realizada através de CLAE-Q-TOF-MS/MS, e foi observada a presença de 11 picos para a amostra de EEPMTa e 9 picos para a amostra de EEPPTa (Figura 1 e 2). Dentre os metabólitos secundários encontrados no EEPMTa, foi possível identificar a presença de hispidona, sakuranetina, eupatorina, casticina, acacetina, cirsimaritina, 3′-Prenilnaringenina, xantohumol, lespedezaflavanona B, isómero da lespedezaflavanona B e ácido 19α-hidroxi-ursólico. Os tempos de retenção e os dados espectrais de massa, juntamente com as atribuições de pico para compostos identificados usando ionização negativa, são descritos em Tabela 1 para o EEPMTa.

A análise química do EEPPTa possibilitou à identificação de compostos semelhantes na amostra de potes de mel de *T. angustula* como cirsimaritina, 3′-Prenilnaringenina, xantohumol, lespedezaflavanona B, isómero da lespedezaflavanona B e ácido 19α-hidroxi-ursólico, além da presença de metabólitos secundários como isorhamnetina, 8-Prenilnaringenina, (2S)-2-(3,4-Dihidroxifenil)-2,3-di-hidro-7-hidroxi-5-metoxi-8-(3-metil-2-buteno-1-il)-4H-1-benzopiran-4-ona (ACI). A Tabela 2 descreve tempos de retenção e os dados espectrais de massa, juntamente com as atribuições de pico para compostos identificados usando ionização negativa foram identificados para o EEPPTa.

Figura 1. Cromatograma do pico de base LC-Q-TOF-MS do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa

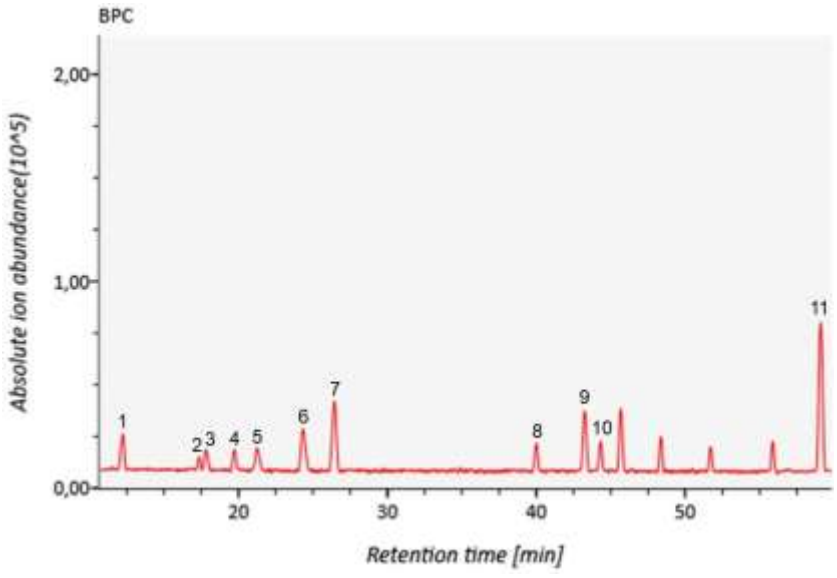


Figura 2. Cromatograma do pico de base LC-Q-TOF-MS do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa

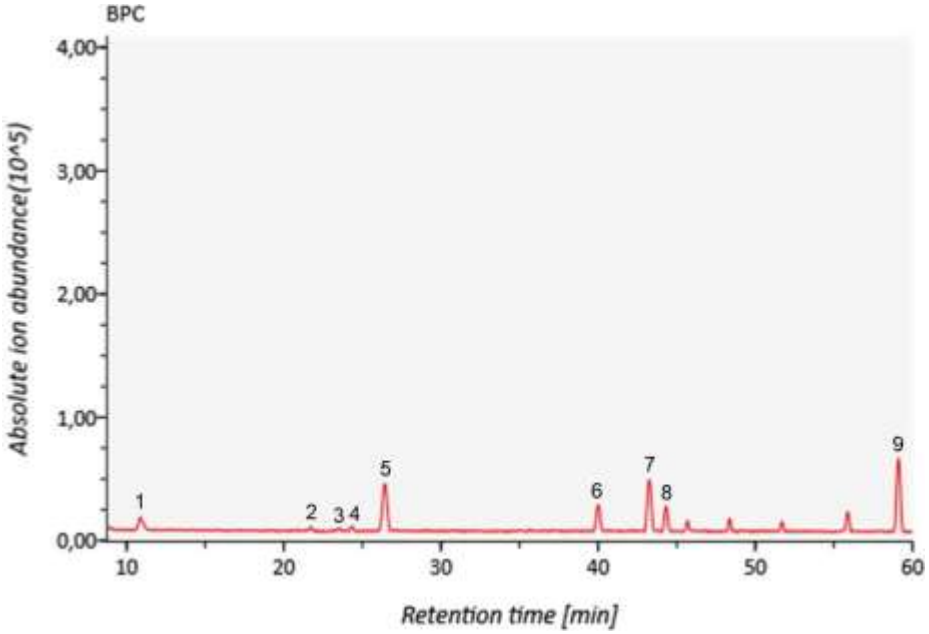


Tabela 1. Caracterização de compostos tentativamente identificados por CLAE-Q-TOF-MS/MS do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa

Pico nº	Rt (min)	m/z	MS^2	MM	Fórmula molecular	Error (ppm)	Atribuição provisória	Citações
1	12.2	345 $[M-H]^-$	315, 164	346	$C_{18}H_{18}O_7$	-4.6	Hispidona [Flavonoide]	(Ahmad *et al.*, 2003)
2	17.3	285 $[M-H]^-$	119	286	$C_{16}H_{14}O_5$	-2,8	Sakuranetina	(Son *et al.*, 2024)
3	17.4	343 $[M-H]^-$	313, 298, 285, 270	344	$C_{18}H_{16}O_7$	-3,1	Eupatorina	(Li *et al.*, 2019)
4	19.7	373 $[M-H]^-$	343, 328, 300, 285	374	$C_{19}H_{18}O_8$	-3,0	Casticina	(Kunert *et al.*, 2023)
5	21.2	283 $[M-H]^-$	268, 151	284	$C_{16}H_{12}O_5$	-2,7	Acacetina	(Kim *et al.*, 2016)
6	4.3	313 $[M-H]^-$	283, 255, 117	314	$C_{17}H_{14}O_6$	-2.9	Cirsimaritina	(Peter *et al.*, 2015)
7	26.4	339 $[M-H]^-$	187, 151	340	$C_{20}H_{20}O_5$	-2.9	3′-Prenilnaringenina	(Frattaruolo *et al.*, 2024)
8	40.0	353 $[M-H]^-$	295, 203, 119	354	$C_{21}H_{22}O_5$	-2,3	Xantohumol	(Nikolic *et al.*, 2005)
9	43.2	407 $[M-H]^-$	219, 187, 132	408	$C_{25}H_{28}O_5$	-2.5	Lespedezaflavanona B	(Wang; Li; Liu, 1987)
10	44.3	407 $[M-H]^-$	255, 200, 151	408	$C_{25}H_{28}O_5$	-2.6	Isómero da Lespedezaflavanona B	(Wang; Li; Liu, 1987)
11	59.1	471 $[M-H]^-$	453, 441, 407	472	$C_{30}H_{48}O_4$	-2,0	Ácido 19α-hidroxiursólico	(Li *et al.*, 2017)

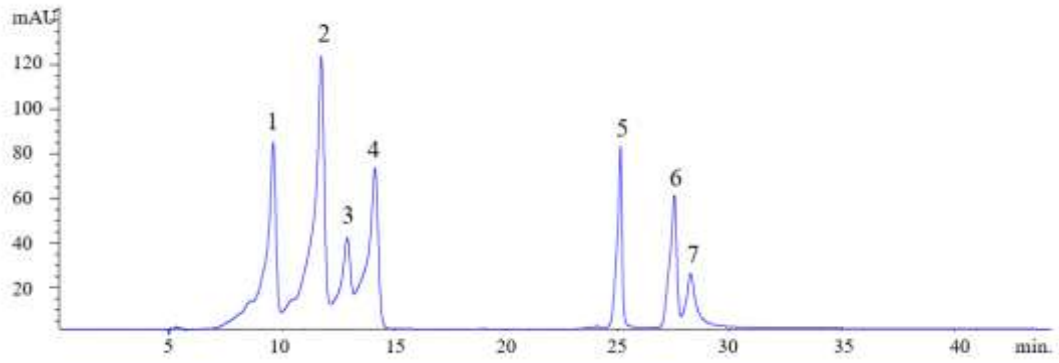
Tabela 2. Caracterização de compostos tentativamente identificados por CLAE-Q-TOF-MS/MS do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa

Pico nº	Rt (min)	m/z	MS^2	MM	Fórmula molecular	Error (ppm)	Atribuição provisória	Citações
1	10.9	315 $[M-H]^-$	300, 271, 255, 151	316	$C_{16}H_{12}O_7$	-3.6	Isorhamnetina	(Falcão *et al.*, 2013)
2	21.7	339 $[M-H]^-$	219, 176, 133, 119	340	$C_{20}H_{20}O_5$	-3.0	8-Prenilnaringenina	(Liu *et al.*, 2022)
3	23.5	369 $[M-H]^-$	219, 189, 161, 135	370	$C_{21}H_{22}O_6$	-2.7	(2S)-2-(3,4-Dihidroxifenil)-2,3- dihidro-7-hidroxi-5-metoxi-8-(3-metil-2- buten-1-il)-4H-1-benzopirano-4-ona (ACI)	(Nikolic *et al.*, 2005)
4	24.3	313 $[M-H]^-$	283, 255, 117	314	$C_{17}H_{14}O_6$	-2,8	Cirsimaritina	(Peter *et al.*, 2015)
5	26.4	339 $[M-H]^-$	187, 151, 132, 107	340	$C_{20}H_{20}O_5$	-3.1	3′-Prenilnaringenina	(Frattaruolo *et al.*, 2024)
6	40.0	353 $[M-H]^-$	295, 203, 119	354	$C_{21}H_{22}O_5$	-2,8	Xantohumol	(Nikolic *et al.*, 2005)
7	43.2	407 $[M-H]^-$	219, 187, 132	408	$C_{25}H_{28}O_5$	-2.3	Lespedezaflavanona B	(Wang; Li; Liu, 1987)
8	44.3	407 $[M-H]^-$	255, 200, 145, 151, 107	408	$C_{25}H_{28}O_5$	-2.4	Isómero da lespedezaflavanona B	(Wang; Li; Liu, 1987)
9	59.1	471 $[M-H]^-$	453, 441, 407	472	$C_{30}H_{48}O_4$	-2,4	Ácido 19α-hidroxiursólico	(Li *et al.*, 2017)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo linear de diodos – CLAE-DAD

Nessa análise foram utilizados como padrões quatro compostos da classe dos ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cinâmico) e três compostos da classe dos flavonoides (naringenina, pinocembrina e apigenina). A Figura 3 representa o cromatograma dos padrões analisados com seus respectivos tempos de retenção e as curvas de calibração.

Figura 3. Perfil CLAE dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides.



Ácido cafeico (tR= 9,5 min, pico 1), ácido *p*-cumárico (tR = 11,6 min, pico 2), ácido ferúlico (tR = 12,7 min, pico 3), ácido cinâmico (tR = 14,0 min, pico 4), naringenina (tR = 25,0 min, pico 5), pinocembrina (tR = 27,4 min, pico 6) e Apigenina (tR = 28,1 min, pico 7). Curva de calibração para ácido cafeico: y = 331,13x – 94,735 (r^2 = 0,9999); ácido *p*-cumárico: y = 449,98x – 72,528 (r^2 = 0,9971); ácido ferulico: y= 185,3x -675,79 (r^2 = 0,9887); ácido cinâmico: y = 236,74x – 188,67 (r^2= 0.9991); naringenina: y= 151,64x + 8,5796 (r^2 = 0,9994); pinocembrina: y = 177,66x – 390,72 (r^2 = 0.9955) e apigenina: y = 164,9x – 688,69 (r^2 = 0,9963).

A quantificação dos compostos por CLAE/DAD para o EEPMTa demonstrou a presença dos flavonoides naringenina (pico 5) e apigenina (pico 7) com 0,312 e 0,297 mg/g da amostra para cada composto, respectivamente (Figura 4). Foram quantificados os percentuais de 3,12% e 2,97% de naringenina e apigenina, respectivamente na amostra de EEPMTa (Tabela 3). Os demais compostos fenólicos testados não foram identificados no extrato.

O cromatograma representado na Figura 5 revela a presença de ácido cinâmico (pico 4) e apigenina (pico 7) no extrato EEPPTa. A composição quantitativa do ácido cinâmico e apigenina no extrato EEPPTa foi de 0,412 e 1,077 mg/g da amostra, respectivamente.

Tabela 3. Quantificação por CLAE/DAD de ácidos fenólicos e flavonoides presentes em Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* - EEPPTa

Composto	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)	EEPMTa		EEPPTa	
			mg/g	%	mg/g	%
Ácido cafeico	0,0001	0,0003	nd	nd	nd	nd
Ácido *p*-cumárico	0,0007	0,0025	nd	nd	nd	nd
Ácido ferúlico	0,0048	0,0162	nd	nd	nd	nd
Ácido cinâmico	0,0009	0,0032	nd	nd	0,412 ± 0,00635	0,0412
Naringenina	0,0011	0,0036	0,312 ± 0,0005	0,0312	nd	nd
Pinocembrina	0,0030	0,0102	nd	nd	nd	nd
Apigenina	0,0027	0,0092	0,297 ± 0,0023	0,0297	1,077 ± 0,1426	0,1077
Total			0,609	0,06	1,489	0,1489

Resultados dos valores são expressos como média (mg/g da amostra) ± DP (n = 3). nd: não detectado. EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Figura 4. Perfil CLAE do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa com a presença de naringenina (pico 5) e apigenina (pico 7)

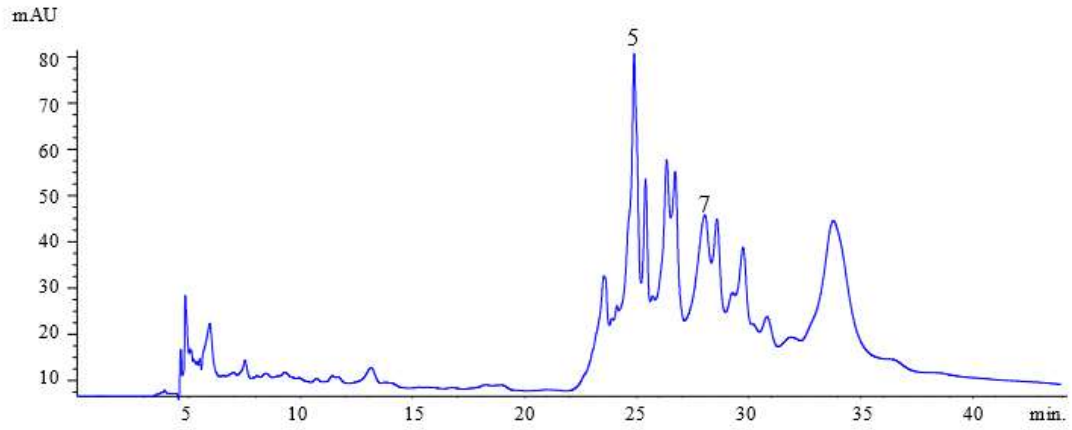
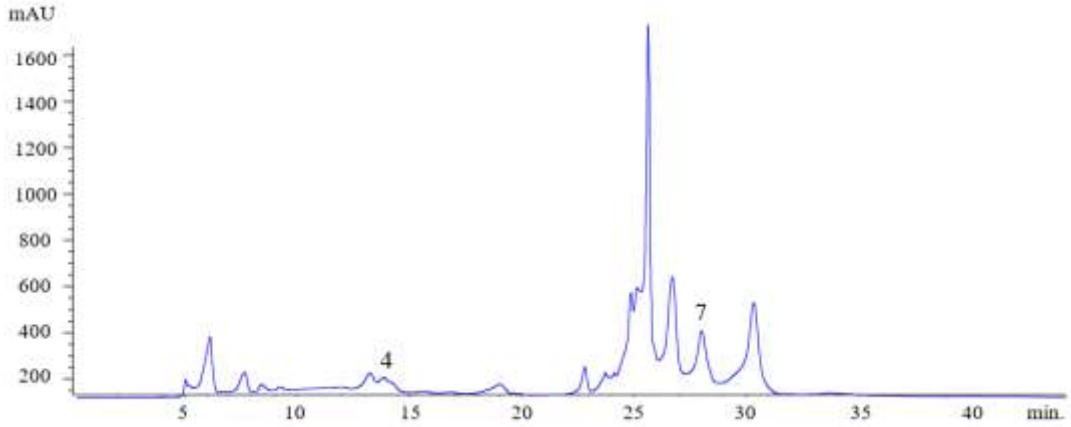


Figura 5. Perfil CLAE do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* - EEPPTa com a presença de ácido cinâmico (pico 4) e apigenina (pico 7).



Avaliação da Atividade Antibacteriana

Neste estudo, avaliamos o Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *T. angustula* (EEPMTa) e o Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *T. angustula* (EEPPTa) quanto à sua atividade antibacteriana contra cepas padrões e multirresistentes de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Na Tabela 4 estão dispostos os resultados da Concentração Inibitória Mínima – CIM dos extratos sobre os microrganismos avaliados. Nossos dados evidenciaram que a cepa padrão ATCC da bactéria Gram-positiva *S. aureus* apresentou sensibilidade a ambos os extratos com valores de CIM de 724,08 e 25,40 µg/mL para o EEPMTa e EEPPTa, respectivamente.

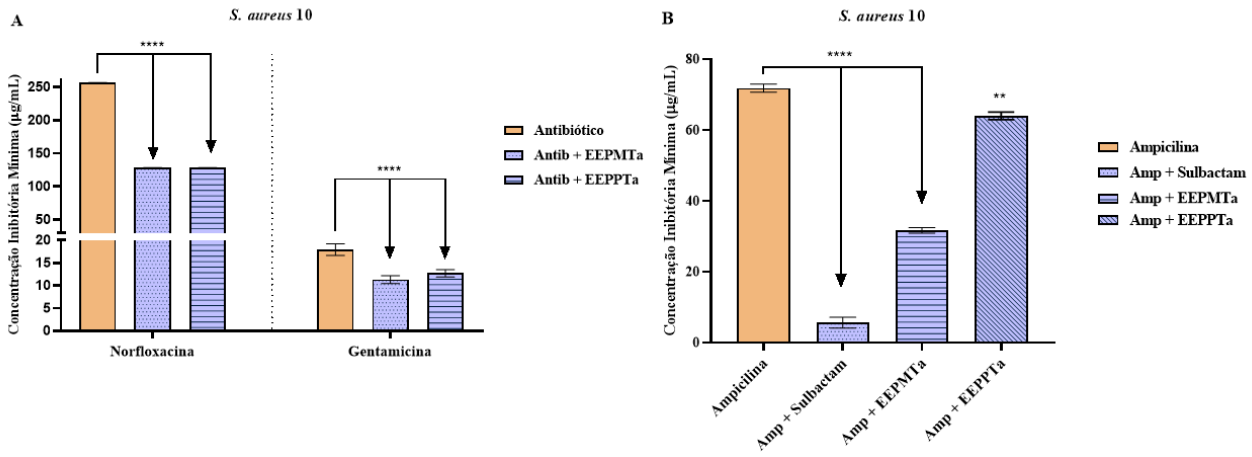
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima – CIM do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* - EEPPTa sobre cepas padrões e multirresistentes de bactérias (µg/mL)

Extrato	SA-ATCC	EC-ATCC	PA-ATCC	SA-10	EC-06	PA-24
EEPMTa	724,08	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
EEPPTa	25,40	101,59	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

SA-ATCC: *S. aureus* ATCC; EC-ATCC: *E. coli* ATCC; PA-ATCC: *P. aeruginosa* ATCC; SA-10: *S. aureus* 10; EC-06: *E. coli* 06; PA-10 *P. aeruginosa* 24. EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Para a avaliação da atividade potencializadora dos extratos, uma concentração sub-inibitória (CIM/8) do EEPMTa e EEPPTa foi utilizada em associação com os antibióticos norfloxacina, gentamicina e ampicilina sobre cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* multirresistentes. Os resultados demostraram que a associação do EEPMTa e EEPPTa com o antibiótico norfloxacina apresentaram uma potencialização do efeito do antibiótico sobre a cepa *S. aureus* 10 com uma diminuição da CIM de 256 para 128 µg/mL do antibiótico (Figura 6A). Essa atividade de potencialização do efeito do antibiótico pelos extratos também foi observada para a gentamicina, sendo que o EEPMTa reduziu a sua CIM de 17,95 µg/mL para 11,31 µg/mL e o EEPPTa reduziu de 17,95 µg/mL para 12,69 µg/mL. Quando os extratos foram associados a ampicilina, apenas o EEPMTa diminuiu significativamente a CIM do antibiótico, sendo a redução de 71,83 µg/mL para 31,7 µg/mL (Figura 6B).

Figura 6: Avaliação da potenciação de antibióticos pelo Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* - EEPPTa em estirpes bacterianas de *S. aureus* 10

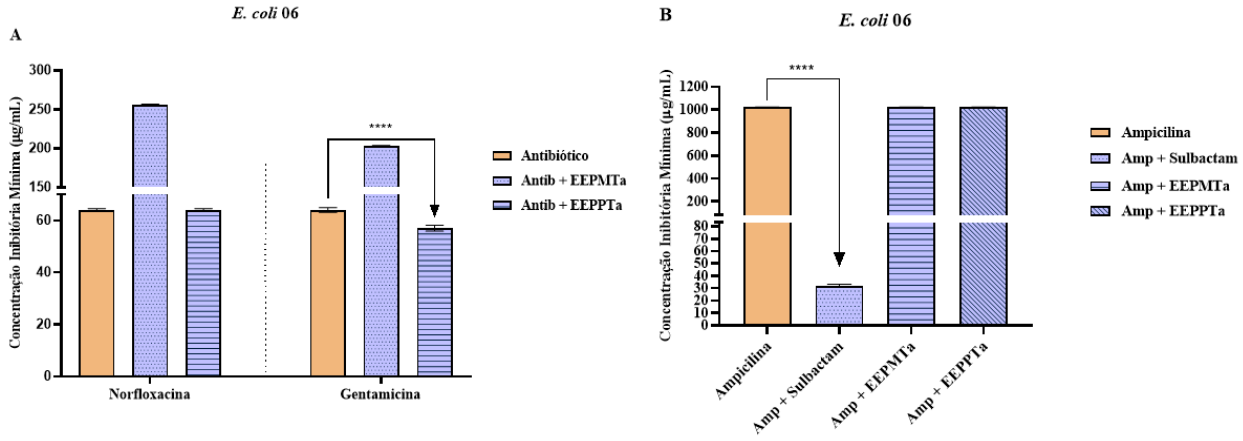


A: Extratos associados à Norfloxacina e à Gentamicina. **B:** Extratos associados à Ampicilina. Antib = Antibiótico; Amp = Ampicilina; **** = $p < 0,0001$ vs controle antibiótico; ** = $p < 0,01$ vs controle antibiótico. EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Para os resultados obtidos avaliando a cepa de *E. coli* 06 foi observado que apenas o EEPPTa apresentou efeito potencializador para o antibiótico gentamicina com uma redução na sua CIM de 64 µg/mL para 57,01 µg/mL (Figura 7A), já quando associado ao antibiótico norfloxacina não apresentou resultados estatisticamente relevantes. Os resultados da associação do EEPMTa com os antibióticos norfloxacina e gentamicina apresentaram um aumento na CIM dos antibióticos. Ambos os extratos quando associados ao antibiótico

ampicilina apresentaram resultados que não diferiram estaticamente do controle utilizado (Figura 7B).

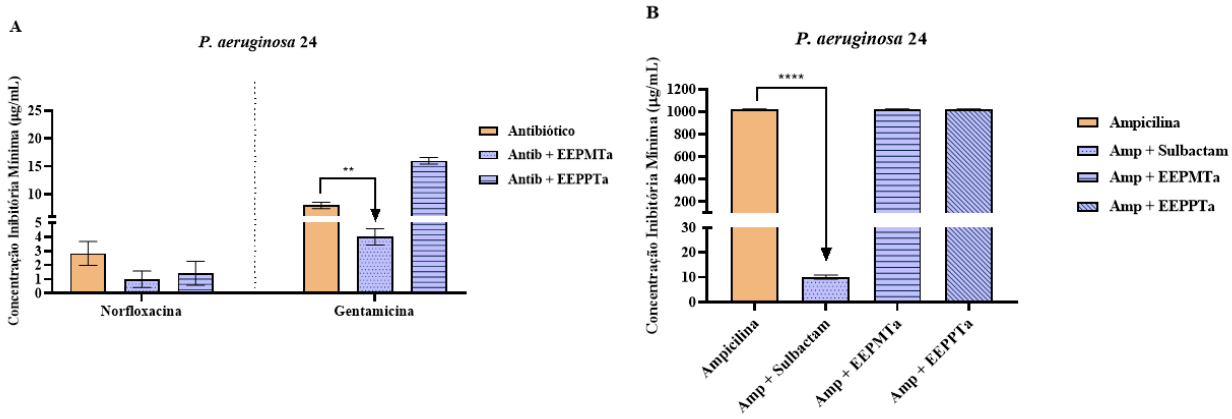
Figura 7. Avaliação da potenciação de antibióticos do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa em estirpes bacterianas de *E. coli* 06



A: Extratos associados à Norfloxacina e à Gentamicina. **B:** Extratos associados à Ampicilina. Antib = Antibiótico; Amp = Ampicilina; **** = $p < 0{,}0001$ vs controle antibiótico; ** = $p < 0{,}01$ vs controle antibiótico. EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Para a cepa Gram-negativa *P. aeruginosa* 24, apenas o EEPMTa apresentou efeito potencializador para o antibiótico gentamicina, reduzindo sua CIM de 8 µg/mL para 4 µg/mL, enquanto o EEPPTa para esse antibiótico apresentou efeito antagônico (Figura 8A). Os resultados de associação dos extratos com os antibióticos norfloxacina e ampicilina não apresentaram efeitos estatisticamente relevantes em relação ao controle do antibiótico.

Figura 8. Avaliação da potenciação de antibióticos do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa em estirpes bacterianas de *P. aeruginosa* 24



A: Extratos associados à Norfloxacina e à Gentamicina. **B:** Extratos associados à Ampicilina. Antib = Antibiótico; Amp = Ampicilina; **** = $p < 0,0001$ vs controle antibiótico; ** = $p < 0,01$ vs controle antibiótico. EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Avaliação da Atividade Antifúngica Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*

A inibição de 50% da população de microrganismos (CI_{50}) para o EEPMTa ocorreu em menores concentrações para todas as cepas testadas em comparação com o EEPPTa. O EEPMTa apresentou CI_{50} de 65,47 e 29,79 µg/mL contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente, enquanto o EEPPTa obteve CI_{50} de 820,7 e 809,9 µg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente (Tabela 5).

Na avaliação da combinação dos extratos + fluconazol foi verificado que ambos os extratos potencializaram o efeito do fluconazol contra a cepa de *C. albicans,* apresentando uma CI_{50} de 1,023 µg/mL na combinação de EEPMTa + FCZ e uma CI_{50} de 1,141 na combinação de EEPPTa + FCZ. Os resultados da combinação dos extratos + fluconazol sobre a cepa de *C. tropicalis* demonstraram antagonismo, ou seja, os extratos não potencializam o efeito do fluconazol contra essa cepa testada (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração Inibitória de 50 % (CI_{50}) de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (μg/mL) pelos extratos e fluconazol e a combinação destes

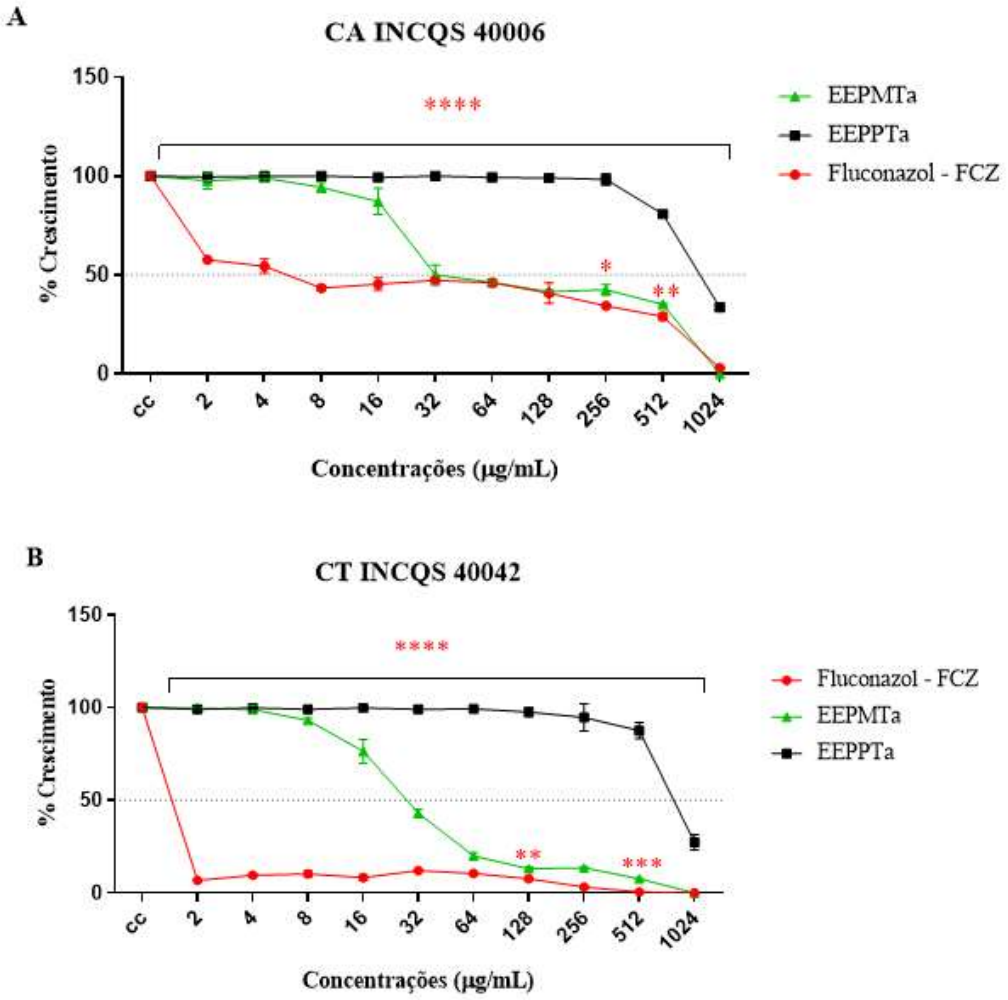
	CA INCQS 40006	**CT INCQS 40042**
FLUCONAZOL - FCZ	5,477	0,022
EEPMTa	65,47	29,79
EEPPTa	820,7	809,9
EEPMTa + FCZ	1,023	3,497
EEPPTa + FCZ	1,141	2,974

CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde. EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Os resultados da curva de viabilidade celular para *C. albicans* e *C. tropicalis* estão representados na Figura 9. O fluconazol foi utilizado como antifúngico padrão e apresentou percentagens de inibição contra a cepa de CA INCQS 40006 de 65,59 %, 70,94 % e 96,9 % nas concentrações de 256, 512 e 1024 μg/mL, respectivamente. Para a cepa de CT INCQS 40042, o fluconazol apresentou taxas de inibição de 96,88 %, 99,47% e 100 % nas concentrações de 256, 512 e 1024 μg/mL, respectivamente.

O EEPMTa apresentou percentuais de inibição de crescimento fúngico maiores para ambas as cepas testadas em comparação com o EEPPTa (Figura 9). Quando foi avaliado para cepa de CA INCQS 40006, o EEPMTa exibiu percentagens de inibição de 57,48 %, 64,81 % e 100 % nas concentrações de 256, 512 e 1024 μg/mL, respectivamente. Enquanto para a cepa de CT INCQS 40042, o EEPMTa apresentou taxas de inibição maiores nas mesmas concentrações, sendo 86,98 % (256 μg/mL), 92,33 (512 μg/mL) e 100 % (1024 μg/mL). Para o EEPPTa as taxas de inibição foram de 66,3 % e 72,69 % na concentração de 1024 μg/mL para a cepa de CA INCQS 40006 e CT INCQS 40042, respectivamente.

Figura 9. Curva de viabilidade celular de fluconazol e do Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* - EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa sobre cepas de *Candida albicans e Candida tropicalis*

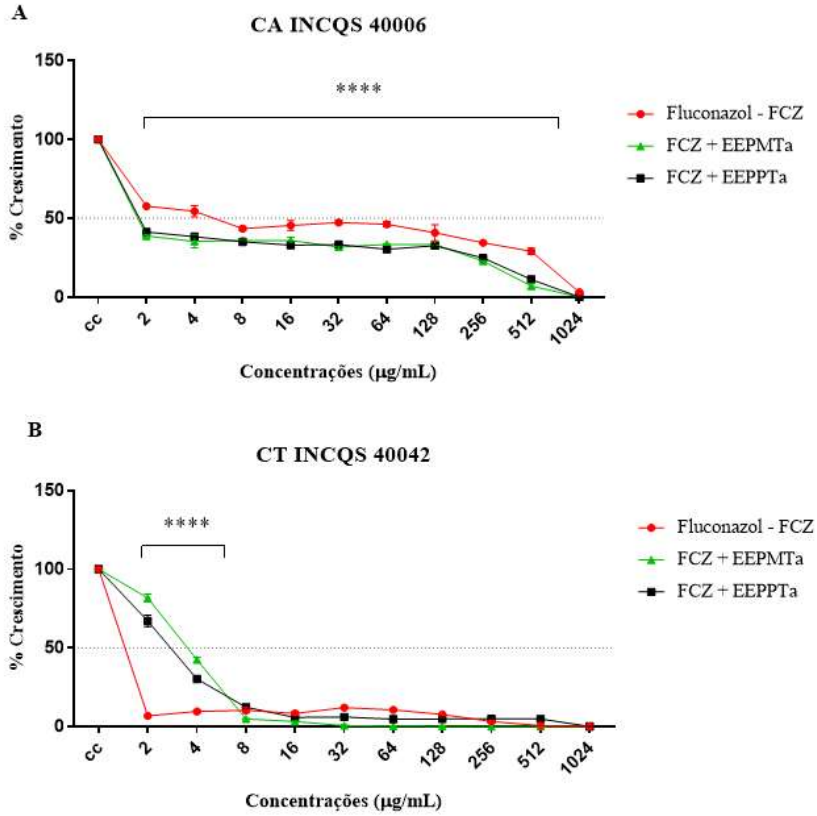


CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Quando os extratos foram combinados com o fluconazol foi observado o efeito potencializador do antifúngico para todas as cepas testadas. A associação do EEPMTa com o fluconazol resultou em percentuais de inibição de 66,61 %, 66,58 %, 77,17 %, 92,99 % e 100 % nas concentrações de 64, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL, respectivamente contra a cepa CA INCQS 40006. Os resultados da associação do EEPPTa com o fluconazol contra essa mesma cepa foram observados os seguintes percentuais de inibição: 69,73 % (64 µg/mL), 67,44 % (128 µg/mL), 75,17 % (256 µg/mL), 88,85 % (512 µg/mL) e 100 % (1024 µg/mL).

Para a associação do EEPMTa com o fluconazol sobre a cepa CT INCQS 40042 foram observados uma percentagem significativa a partir da concentração de 8 a 1024 µg/mL. Nas concentrações de 64 e 128 µg/mL foram verificados percentuais de inibições de 99,70 % e 99,77 %, respectivamente, e a partir da concentração de 256 µg/mL foi observado inibição total do crescimento fúngico (Figura 10B). Para a associação do EEPPTa com o fluconazol sobre cepa CT INCQS 40042 foi observado percentual de inibição de 95 % para as concentrações de 64, 128, 256 e 512 µg/mL, sendo apenas a concentração de 1024 µg/mL com inibição total do crescimento fúngico (Figura 10B).

Figura 10. Avaliação do efeito modificador da ação do fluconazol com o Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula* – EEPMTa e do Extrato Etanólico dos Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula* – EEPPTa sobre cepas *Candida albicans* e *Candida tropicalis*



CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; EEPMTa: Extrato Etanólico dos Potes de Mel de *Tetragonisca angustula*; EEPPTa: Extrato Etanólico Potes de Pólen de *Tetragonisca angustula*

Discussão

O mel é caracterizado como uma mistura complexa de substâncias, incluindo açúcares, ácidos, enzimas, compostos aromáticos e minerais, entre outros, sendo sua composição determinada pela variedade de espécies florais visitadas, condição da colônia, a maturidade do mel e as condições climáticas durante a coleta (Campos *et al.*, 2003; Souza; Menezes; Flach, 2021).

Durante a coleta de pólen nas flores, as abelhas forrageadoras utilizam néctar ou secreções salivares para aglomerar os grãos de pólen em suas corbículas. No interior da colmeia, quando o pólen está armazenado, ocorre o processo de fermentação devido ao aumento da umidade, presença de açucares, ácido lático e de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* (Ngalimat *et al.*, 2020; Vollet-Neto *et al.*, 2017). *Tetragonisca angustula* produz um pólen fermentado seco e relativamente doce (Menezes *et al.*, 2013). O mel e o pólen fermentado são armazenados no interior da colmeia em estruturas conhecidas como potes de alimentos, constituídos de cerume, sendo este uma mistura resinas com cera (de Paula *et al.*, 2021).

Nesse estudo foram avaliados a composição química e atividades biológicas do extrato etanólico dos potes de mel e do extrato etanólico dos potes de pólen, esses potes são constituídos de cerume e são utilizados para armazenar o mel e o pólen no interior na colmeia.

Para determinação da composição química dos extratos utilizados nesse estudo, empregou-se as técnicas CLAE-Q-TOF-MS/MS e CLAE-DAD. O Q-TOF-MS/MS é uma técnica analítica que combina os benefícios de dois analisadores de massa distintos. Essa técnica utiliza a alta eficiência de fragmentação de compostos proporcionada pela tecnologia de quadrupolo, aliada à velocidade de análise rápida e à alta capacidade de resolução de massa do tempo de voo (TOF) (Allen; McWhinney, 2019).

No presente estudo foram identificados 11 e 9 compostos para o extrato etanólico dos potes de mel e para o extrato etanólico dos potes de pólen, respectivamente, sendo os seguintes metabólitos secundários cirsimaritina, 3′-Prenilnaringenina, xantohumol, lespedezaflavanona B, isómero da lespedezaflavanona B e ácido 19α-hidroxi-ursólico encontrados em ambos os extratos.

A técnica de CLAE-DAD é frequentemente utilizada para quantificar e identificar polifenóis, devido ao baixo custo e à robustez dessa técnica. No processo de identificação é

feita uma comparação dos dados espectrais e tempo de retenção de cada composto com os dados obtidos de padrões comerciais (Plaza *et al.*, 2018).

A absorção dos polifenóis ocorre em diferentes comprimentos de onda, dependendo de sua estrutura. Por exemplo, compostos fenólicos em geral são detectados em 240-285 nm, flavonas e flavonóis em 350-365 nm, enquanto antocianinas são detectadas em 460-560 nm (Lorrain *et al.*, 2013). Entretanto, essa técnica apresenta alguns desafios como a ausência de padrões químicos, o que dificulta a quantificação e identificação de misturas complexas desses compostos (Plaza *et al.*, 2018).

Nesse estudo foram utilizados sete padrões comerciais, sendo identificados dois flavonoides para EEPMTa (naringenina e apigenina) e um ácido fenólico e um flavonoide para a EEPPTa (ácido cinâmico e apigenina). Na literatura, não há estudos que avaliem a composição química do extrato etanólico dos potes de mel e do extrato etanólico dos potes de pólen, entretanto há estudos que descrevem sobre a composição química de extratos do mel.

Como no estudo de Braghini e colaboradores (2021) que identificou a presença de flavonoides e ácidos fenólicos como apigenina, naringenina, eriodictiol, aromadendrina, hispidulina, quercetina, taxifolina, isoquercetina, rutina, escopoletino, ácido salicílico, ácido *p*-cumárico, ácido vanilico e ácido protocatecúrico na composição química do mel diluído em acetato de etila utilizando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa sequencial por Eletrospray (LC-ESI-MS/MS).

Biluca et al. (2017) e (2020) também avaliaram a composição química do mel diluído em acetato de etila utilizando LC-ESI-MS/MS, demonstrando a presença dos seguintes ácidos fenólicos: salicílico, *p*-cumárico, protocatecuico, cafeico, *trans*-ferúlico, siringico; e flavonoides: naringenina, aromadendrina, quercetina, taxifolina, eriodictiol, siringaldeído, carnosol.

No estudo de Lima e colaboradores (2024) utilizando a mesma técnica empregada nesse estudo, CLAE-DAD, foi identificada a presença do ácido ferúlico no extrato etanólico do mel como componente fenólico majoritário.

Os compostos fitoquímicos, incluindo polifenóis, flavonoides, terpenos, ácidos orgânicos e peptídeos, além do peróxido de hidrogênio e características como baixa atividade de água, acidez e hiperosmolaridade do mel estão associados aos efeitos antimicrobianos que esse bioproduto apresenta (Brudzynski, 2020; Cabezas-Mera *et al.*, 2024; Esa *et al.*, 2022).

No presente estudo, os extratos EEPMTa e EEPPTa potencializaram a ação de antibióticos contra *S. aureus* 10, reduzindo a CIM da norfloxacina e gentamicina e, no caso do EEPMTa, da ampicilina. Para *P. aeruginosa* 24, o EEPMTa potencializou a gentamicina, enquanto o EEPPTa apresentou efeito antagônico. Em *E. coli* 06, apenas o EEPPTa reduziu a CIM da gentamicina. Na literatura não há estudos que avaliem especificamente a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos dos potes de mel e potes de pólen de *T. angustula*.

Zamora et al. (2014) avaliaram a atividade antibacteriana do mel de *T. angustula* sobre as cepas de *S. aureus* ATCC 25923*, E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, e obtiveram valores de CIM de 49,2; 99 e 97,8 mg/mL, respectivamente.

Na avaliação da atividade antifúngica, o EEPMTa apresentou menores valores de CI_{50} em relação ao EEPPTa para todas as cepas testadas, com 65,47 μg/mL para *C. albicans* e 29,79 μg/mL para *C. tropicalis*, enquanto o EEPPTa obteve CI_{50} de 820,7 μg/mL e 809,9 μg/mL, respectivamente. Na combinação com fluconazol, ambos os extratos potencializaram o efeito do antifúngico contra *C. albicans*, resultando em CI_{50} de 1,023 μg/mL (EEPMTa + FCZ) e 1,141 μg/mL (EEPPTa + FCZ).

No estudo de Zamora et al. (2014), foi observada a atividade antifúngica do mel de *T. angustula* contra a cepa *C. albicans* ATCC 10231, com um valor de CIM de 195 mg/mL. Os autores consideram esse resultado promissor e sugerem que investigações futuras são necessárias para o desenvolvimento de uma formulação, como pomadas para queimaduras e feridas, devido à atividade anti-*Candida* do mel.

Conclusão

O presente estudo evidenciou a presença de compostos bioativos relevantes nos extratos etanólicos dos potes de mel (EEPMTa) e pólen (EEPPTa), incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, que demonstraram potencial para agir como adjunvantes de antibióticos e antifúngicos. O EEPMTa apresentou maior eficácia, reduzindo significativamente os valores de CIM e CI_{50} para as cepas de bactérias e fúngicas avaliadas, incluindo *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, destacando-se como um adjuvante promissor. O EEPPTa também mostrou efeito positivo, embora com menor intensidade e com limitações, como o efeito reverso observado contra *C. tropicalis* na combinação com fluconazol. Esses resultados reforçam o potencial terapêutico dos metabólitos secundários presentes nos

extratos, enfatizando sua relevância para o desenvolvimento de novas estratégias antibacterianas e antifúngicas.

Agradecimentos

BPI BP5-0197-00174.01.00/22 EDITAL/CHAMADA: BOLSA DE PRODUTIVIDADE EM PESQUISA, ESTÍMULO À INTERIORIZAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA – BPI 04/2022. Agradecemos ao CNPq pelo apoio concedido ao projeto PDJ 2023 - Chamada CNPq Nº 32/2023 - Pós-Doutorado Júnior, processo 172358/2023-0.

Referências

Ahmad, I., Anis, I., Malik, A., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I., 2003. Cholinesterase Inhibitory Constituents from *Onosma hispida*. Chem. Pharm. Bull. 51, 412–414.

Allen, D.R., McWhinney, B.C., 2019. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. Clin. Biochem. Rev. 40, 135–146. https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023

Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 48, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5

Biluca, F.C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E.T.B., Vieira, G.N., Gonzaga, L.V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E.M., Costa, A.C.O., 2020. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). Food Res. Int. 129, 108756. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756

Biluca, F.C., de Gois, J.S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L.V., Maltez, H.F., Rodrigues, E., Vitali, L., Micke, G.A., Borges, D.L.G., Costa, A.C.O., Fett, R., 2017. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). J. Food Compos. Anal. 63, 89–97. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.039

Braghini, F., Biluca, F.C., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Costa, A.C.O., Fett, R., 2021. Effect thermal processing in the honey of *Tetragonisca angustula*: profile physicochemical, individual phenolic compounds and antioxidant capacity. J. Apic. Res. 60, 290–296. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1737362

Brudzynski, K., 2020. A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. Food Chem. 332, 127229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229

Cabezas-Mera, F., Cedeño-Pinargote, A.C., Tejera, E., Álvarez-Suarez, J.M., Machado, A., 2024. Antimicrobial activity of stingless bee honey (Tribe: Meliponini) on clinical and foodborne pathogens: A systematic review and meta-analysis. Food Front. 5, 964–993. https://doi.org/10.1002/fft2.386

Campos, G., Della-Modesta, R.C., Silva, T.J.P., Baptista, K.E., Gomides, M.F., Godoy, R.L., 2003. Classificação do mel em floral ou mel de melato. Ciência e Tecnol. Aliment. 23, 1–5. https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000100002

CLSI, 2017. Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing os yeasts, 4th. ed.

Costa, A.C.V. da, Sousa, J.M.B., Silva, M.A.A.P. da, Garruti, deborah dos S., Madruga, M.S., 2018. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the brazilian semiarid region. Food Res. Int. 105, 110–120.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira, J.P., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy 54, 328–330. https://doi.org/10.1159/000151267

de Barros, P.P., Rossoni, R.D., Freire, F., Ribeiro, F. de C., Lopes, L.A. das C., Junqueira, J.C., Jorge, A.O.C., 2018. Candida tropicalis affects the virulence profile of Candida albicans: an in vitro and in vivo study. Pathog. Dis. 76, 1–9. https://doi.org/10.1093/femspd/fty014

de Paula, G.T., Menezes, C., Pupo, M.T., Rosa, C.A., 2021. Stingless bees and microbial interactions. Curr. Opin. Insect Sci. 44, 41–47. https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I.M., 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol. Lett. 38, 1015–1019. https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2

Esa, N.E.F., Ansari, M.N.M., Razak, S.I.A., Ismail, N.I., Jusoh, N., Zawawi, N.A., Jamaludin, M.I., Sagadevan, S., Nayan, N.H.M., 2022. A Review on Recent Progress of Stingless Bee Honey and Its Hydrogel-Based Compound for Wound Care Management. Molecules 27, 1–20. https://doi.org/10.3390/molecules27103080

Falcão, S.I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M.R.M., Freire, C., Cardoso, S.M., Vilas-Boas, M., 2013. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. Phytochem. Anal. 24, 309–318. https://doi.org/10.1002/pca.2412

Fonseca, V.J.A., Braga, A.L., de Almeida, R.S., da Silva, T.G., da Silva, J.C.P., de Lima, L.F., dos Santos, M.H.C., dos Santos Silva, R.R., Teixeira, C.S., Coutinho, H.D.M., Morais-Braga, M.F.B., 2022. Lectins ConA and ConM extracted *from Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Arch. Microbiol. 204, 1–11. https://doi.org/10.1007/s00203-022-02959-x

Frattaruolo, L., Lauria, G., Aiello, F., Carullo, G., Curcio, R., Fiorillo, M., Campiani, G., Dolce, V., Cappello, A.R., 2024. Exploiting *Glycyrrhiza glabra* L. (Licorice) Flavanones: Licoflavanone's Impact on Breast Cancer Cell Bioenergetics. Int. J. Mol. Sci. 25. https://doi.org/10.3390/ijms25147907

Gnanamani, A., Hariharan, P., Paul-Satyaseela, M., 2018. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. J. Glob. Infect. Dis. 3, 1–26.

Gulati, M., Nobile, C.J., 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 18, 310–321. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002

Hoshiba, H., Sasaki, M., 2008. Perspectives of multi-modal contribution of honeybee resources to our life. Entomol. Res. 38. https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2008.00170.x

Imperatriz-Fonseca, V.L., Matos, E.T., Ferreira, F., Velthuis, H.H.W., 1998. A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). Insectes Soc. 45, 231–233. https://doi.org/10.1007/s000400050083

Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.-C.J., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L., 1996. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. J. Med. Chem. 39, 3107–3113. https://doi.org/10.1021/jm9509410

Kim, S.B., Lee, T., Lee, H.S., Song, C.K., Cho, H.J., Kim, D.D., Maeng, H.J., Yoon, I.S., 2016. Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of acacetin in human plasma and its application to a protein binding study. Arch. Pharm. Res. 39, 213–220. https://doi.org/10.1007/s12272-015-0697-1

Kunert, O., Alperth, F., Pabi, E., Bucar, F., 2023. Highly oxidized flavones in *Artemisia* species – structure revisions and improved UHPLC-MSn analysis. Heliyon 9, e22309. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22309

Li, H., Yao, W., Liu, Q., Xu, J., Bao, B., Shan, M., Cao, Y., Cheng, F., Ding, A., Zhang, L., 2017. Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to identify multiple constituents in processed products of the herbal medicine *Ligustri lucidi* fructus. Molecules 22. https://doi.org/10.3390/molecules22050689

Li, L., Chen, Y., Feng, X., Yin, J., Li, S., Sun, Y., Zhang, L., 2019. Identification of metabolites of eupatorin in vivo and in vitro based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Molecules 24, 1–26. https://doi.org/10.3390/molecules24142658

Lima, C.O., Dias, E.R., Reis, I.M.A., Carneiro, K.O., Pinheiro, A.M., Nascimento, A.S., Silva, S.M.P.C., Carvalho, C.A.L., Mendonça, A.V.R., Vieira, I.J.C., Braz Filho, R., Branco, A., 2024. Ferulic acid as major antioxidant phenolic compound of the *Tetragonisca angustula* honey collected in Vera Cruz-Itaparica Island, Bahia, Brazil. Brazilian J. Biol. 84, 1–10. https://doi.org/10.1590/1519-6984.253599

Liu, H., Chang, G., Wang, W., Ji, Z., Cui, J., Peng, Y., 2022. Pharmacokinetics, Prostate Distribution and Metabolic Characteristics of Four Representative Flavones after Oral Administration of the Aerial Part of *Glycyrrhiza uralensis* in Rats. Molecules 27, 1–29. https://doi.org/10.3390/molecules27103245

Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., Teissedre, P.L., 2013. Evolution of analysis of polyhenols from grapes, wines, and extracts. Molecules 18, 1076–1100. https://doi.org/10.3390/molecules18011076

Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F.A.F.L., Venturieri, G.C., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2013. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping, in: Pot-Honey. Springer New York, New York, NY, pp. 153–171. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10

Miorin, P.L., Levy, N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A., Marcucci, M.C., 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from Apis mellifera and Tetragonisca angustula against

Staphylococcus aureus. J. Appl. Microbiol. 95, 913–920. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02050.x

Morais-Braga, M.F.B., Sales, D.L., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., dos Santos, A.T.L., de Freitas, M.A., Martins, G.M. de A.B., Leite, N.F., de Matos, Y.M.L.S., Tintino, S.R., Souza, D.S.L., Menezes, I.R.A., Ribeiro-Filho, J., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., 2016. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. Microb. Pathog. 95, 200–207. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.013

Ngalimat, M.S., Raja Abd Rahman, R.N.Z., Yusof, M.T., Amir Hamzah, A.S., Zawawi, N., Sabri, S., 2020. A Review on the Association of Bacteria with Stingless Bees. Sains Malaysiana 49, 1853–1863. https://doi.org/10.17576/jsm-2020-4908-08

Nikolic, D., Li, Y., Chadwick, L.R., Pauli, G.F., Van Breemen, R.B., 2005. Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. J. Mass Spectrom. 40, 289–299. https://doi.org/10.1002/jms.753

Nobile, C.J., Johnson, A.D., 2015. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu. Rev. Microbiol. 69, 71–92. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330

Nogueira, D.S., 2023. Overview of Stingless Bees in Brazil (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). EntomoBrasilis 16, e1041. https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v16.e1041

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J., Cheng, Z., 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol. Adv. 37, 177–192. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

Pedro, S.R.D.M., 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology 61, 348–354. https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354

Peter, S.R., Peru, K.M., Fahlman, B., McMartin, D.W., Headley, J. V., 2015. The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean Lamiaceae plant with potential for bioaccumulation. J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes 50, 819–826. https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1058103

Plaza, M., Domínguez-Rodríguez, G., Castro-Puyana, M., Marina, M.L., 2018. Polyphenols analysis and related challenges, Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00006-3

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S., 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. Microbiol. Spectr. 6, 979–980. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017

Sanches, M.A., Pereira, A.M.S., Serrão, J.E., 2017. Acciones farmacológicas de extractos de propóleos de abejas sin aguijón (Meliponini). J. Apic. Res. 56, 50–57. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1260856

Santajit S, Indrawattana N, 2016. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. PBioMed Res. Int. 2016, 1–8.

Santana, R.S., de Carvalho, C.A.L., Oda-Souza, M., Souza, B. de A., Dias, F. de S., 2020. Characterization of honey of stingless bees from the Brazilian semi-arid region. Food Chem. 327, 127041. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127041

Shanahan, M., Spivak, M., 2021. Resin use by stingless bees: A review. Insects 12. https://doi.org/10.3390/insects12080719

Son, N.T., Gianibbi, B., Panti, A., Spiga, O., Bastos, J.K., Fusi, F., 2024. Vasorelaxant Activity of (2S)-Sakuranetin and Other Flavonoids Isolated from the Green Propolis of the Caatinga Mimosa tenuiflora. Planta Med. 90, 454–468. https://doi.org/10.1055/a-2294-7042

Souza, E.C.A., Menezes, C., Flach, A., 2021. Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. Apidologie 52, 113–132. https://doi.org/10.1007/s13592-020-00802-0

Torres, A.R., Sandjo, L.P., Friedemann, M.T., Tomazzoli, M.M., Maraschin, M., Mello, C.F., Santos, A.R.S., 2018. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. Brazilian J. Med. Biol. Res. 51, 1–10. https://doi.org/10.1590/1414-431X20187118

Torres, N.F., Chibi, B., Kuupiel, D., Solomon, V.P., Mashamba-Thompson, T.P., Middleton, L.E., 2021. The use of non-prescribed antibiotics; prevalence estimates in low-and-middle-income countries. A systematic review and meta-analysis. Arch. Public Heal. 79, 1–15. https://doi.org/10.1186/s13690-020-00517-9

Vollet-Neto, A., Maia-Silva, C., Menezes, C., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2017. Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona* aff. *depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. Apidologie 48, 204–210. https://doi.org/10.1007/s13592-016-0464-4

Wang, M., Li, J., Liu, W., 1987. Two flavanones from the root bark of *Lespedeza formosa*. Phytochemistry 26, 1218–1219. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83755-N

Zamora, G., Beukelman, K., Van Den Berg, B., Arias, M.L., Umaña, E., Aguilar, I., Sánchez, L.A., Fallas, N., Van Ufford, L.Q., Gross, N., 2014. The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. J. Apic. Res. 53, 503–513. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.04

Zuza-Alves, D.L., Silva-Rocha, W.P., Chaves, G.M., 2017. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. Front. Microbiol. 8, 1–25. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927

4.3. CAPÍTULO III: Avaliação da Atividade Antibacteriana e Inibitória de Efluxo pelo Ácido *trans*-Cinâmico em *Staphylococcus aureus*: Ensaios Experimentais e Modelagem *In silico*

Artigo em português/ Revista: *Phytomedicine Plus*
Qualis: A3 | Situação: Publicado | DOI: 10.1016/j.phyplu.2025.100816

Nair Silva Macêdo[1], Zildene de Sousa Silveira[2], Débora Menezes Dantas[1], Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa, Cícera Datiane de Morais Oliveira-Tintino[3], Saulo Relison Tintino[3], Gabriel Gonçalves Alencar[3], Gustavo Miguel Siqueira[3], Thaís Ferreira da Silva[4], Márcia Machado Marinho[5], Matheus Nunes da Rocha[5], Henrique Douglas Melo Coutinho[3], Emmanuel Silva Marinho[5], Hélcio Silva dos Santos[6], Francisco Assis Bezerra da Cunha[1]

1. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica - PPQB da Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará, Brasil
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PPGCB da Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil
3. Laboratory of Microbiology and Molecular Biology (LMBM), Cariri Regional University (URCA), Crato, CE, Brazil
4. Laboratório de Bioprospecção do Semiárido e Métodos Alternativos da Universidade Regional do Cariri - LABSEMA
5. State University of Ceará, Graduate Program in Natural Sciences, Natural Resources Bioprospecting and Monitoring Laboratory (LBMRN), Fortaleza, Ceará, Brazil
6. Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO-Nucleadora UECE), Vale do Acaraú State University (UVA), Sobral, CE, Brazil

Resumo

Staphylococcus aureus desenvolve resistência utilizando sistemas de transporte de membrana que realizam o efluxo ativo de agentes antimicrobianos, permitindo sua sobrevivência e crescimento. Neste estudo foi avaliado a atividade antibacteriana do ácido *trans*-cinâmico e a sua capacidade de modificação da atividade antibiótica e inibidora do mecanismo de bomba de efluxo presente na cepa 1199B de *S. aureus* (surperexpressa NorA). Além disso, a capacidade de permeabilidade do ácido *trans*-cinâmico na membrana citoplasmática de *S. aureus* também foi avaliada. Ensaios *in silico* foram utilizados para avaliar as interações

moleculares desse composto com a proteína de efluxo NorA. O ácido *trans*-cinâmico não apresentou atividade antibacteriana direta sobre a cepa 1199B de *S. aureus*. Entretanto quando em combinação com norfloxacina potencializou a atividade antibiótica, reduzindo a CIM da norfloxacina. Além disso, a associação com o brometo de etídio reduziu a CIM do BrEt de 128 μg/mL para 64 μg/mL. Esse achado corrobora com os dados do aumento dos percentuais de emissão de fluorescência do brometo de etídio na cepa 1199B quando tratada com o composto analisado. O ácido *trans*-cinâmico também atua no aumento da permeabilidade da membrana nas cepas de *S. aureus*, indicando que esse é um dos mecanismos de ação envolvidos na sua atividade. As simulações de *docking* molecular mostraram que o ácido *trans*-cinâmico pode atuar como inibidor da bomba de efluxo NorA devido apresentar interações ligante-proteína em comum com o inibidor clorpromazina, incluindo interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr225 e Phe303. Os descritores farmacocinéticos mostraram que o composto apresenta uma boa permeabilidade celular, em função do equilíbrio entre lipofilicidade e polaridade, favorecido pela presença de um grupo carboxilato desprotonado. Em conclusão, o ácido *trans*-cinâmico têm potencial promissor como inibidor do mecanismo de resistência presente em *S. aureus* e poderia atuar como possível adjuvante antibiótico.

Palavras-chave: Microrganismos multirresistentes; Ácidos fenólicos; Terapia combinada; Inibidores de efluxo.

Introdução

A resistência microbiana (RAM) configura-se como um desafio para a saúde global, à segurança alimentar e à economia, sendo responsável por um número significativo de casos de pacientes que apresentam morbidade e mortalidade em todo o mundo. Dentre os fatores que tem contribuído para o aumento da resistência microbiana estão o uso contínuo de antibióticos e a exposição a infecções hospitalares. Esses fatores têm acelerado o surgimento de bactérias multirresistentes, resultando em uma carga significativa para os sistemas de saúde (Li *et al.*, 2023).

As bactérias desenvolvem e utilizam diversos mecanismos de resistência, que podem ser classificados como intrínsecos, onde a célula bacteriana emprega genes já presentes para sobreviver à exposição a antibióticos, ou como adquiridos, onde a aquisição de novo material genético fornece novas capacidades de sobrevivência para a célula bacteriana (Darby *et al.*, 2023; Uddin *et al.*, 2021).

A resistência bacteriana aos antibióticos ocorre através de diversas estratégias moleculares, tais como a modificação do alvo através de mutações ou modificações pós-traducionais que podem impedir a ligação do antibiótico ao seu alvo, degradação enzimática através da hidrólise do grupo funcional do antibiótico, diminuição do influxo mediado por mudanças na estrutura da membrana bacteriana, como a desregulação das porinas, as quais são proteínas transmembrana responsáveis pelo transporte passivo de substâncias, incluindo antibióticos, para dentro da célula bacteriana, e por fim, o efluxo ativo que é mediado pelas bombas de efluxo transmembrana, as quais exportam antibióticos para fora das células bacterianas, reduzindo sua concentração intracelular (Du *et al.*, 2018; Schaenzer; Wright, 2020; Wilson *et al.*, 2020).

Isolados de *Staphylococcus aureus* são reconhecidos como importantes agentes associados a mortalidade de indivíduos acometidos por infecções hospitalares, especialmente entre as bactérias multirresistentes (Hassanzadeh *et al.*, 2020). *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva comensal, frequentemente encontrada na pele e nas mucosas de humanos. As infecções causadas por *S. aureus* incluem bacteremia, endocardite, infecções de pele e tecidos moles, sepse, infecções do sistema nervoso central, trato urinário, pneumonia, síndrome do choque tóxico, osteomielite, entre outras condições graves (Stephen *et al.*, 2023).

S. aureus desenvolve resistência microbiana através do efluxo ativo mediado por sistemas de transporte de membrana que removem ativamente agentes antimicrobianos, permitindo sua sobrevivência e crescimento. Dentre esses sistemas, estão incluídas as proteínas de efluxo da Superfamília Facilitadora Principal (MFS) (Lekshmi *et al.*, 2018) e nessa família de transportadores, destaca-se a bomba de efluxo de NorA codificada cromossomicamente e presente em *S. aureus*. Essa bomba de efluxo confere resistência a antibióticos da classe das fluoroquinolonas e antibióticos não-fluoroquinolonas, como tetraciclina, além de produtos químicos como brometo de etídio, cetrimida e tetrafenilfosfônio (McAleese *et al.*, 2005; Ranaweera *et al.*, 2023; Yoshida *et al.*, 1990).

A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à resistência pode auxiliar no desenho de novas estratégias para o tratamento de doenças infecciosas. Diante disso, têm-se buscado novas alternativas terapêuticas que possuam atividade antibacteriana isolada ou atuem como agentes modificadores da resistência em associação com fármacos já existentes no mercado, dentre essas substâncias, estão os produtos naturais e sintéticos.

O ácido cinâmico é caracterizado como um ácido carboxílico aromático natural, encontrado em plantas como *Cinnamomum cassia* (“canela chinesa”), frutos, cereais integrais, legumes e em produtos derivados de abelhas sem ferrão como o mel. Com a presença de um

grupo ácido acrílico substituído no anel fenil, o ácido cinâmico pode assumir configurações *cis* ou *trans*, sendo a forma *trans* a mais comum (Rodrigues *et al.*, 2019). Diversos estudos têm destacado o papel do ácido cinâmico e seus derivados como antioxidantes (Nouni; Theodosis-Nobelos; Rekka, 2023), antimicrobianos (Yilmaz; Sova; Ergün, 2018), agentes anticâncer (Feng *et al.*, 2022), leishmanicidas (Rodrigues *et al.*, 2019), antituberculosos (Teixeira *et al.*, 2020), antifúngicos (Korošec *et al.*, 2014) e anti-inflamatórios (Chen *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antibacteriana e inibidora de efluxo pelo ácido *trans*-cinâmico sobre a cepa de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo NorA, bem como elucidar os seus mecanismos de ação através de ensaios para verificar a capacidade de aumentar a fluorescência do brometo de etídio e de atuar sobre a permeabilidade da membrana de *S. aureus*. Além disso, foram empregadas abordagens de modelagem *in silico* para investigar as interações do ácido *trans*-cinâmico com a proteína de efluxo NorA e avaliar suas propriedades farmacocinéticas, utilizando a Otimização Multiparamétrica (MPO) e a previsão PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).

Materiais e Métodos

Substâncias

As seguintes substâncias foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Missouri, EUA): o antibiótico norfloxacina, Carbonilcianeto m-Clorofenil Hidrazona (CCCP) e brometo de etídio (BrEt). A clorpromazina (CPZ) foi adquirida do Aché (Guarulhos, São Paulo, Brasil).

O antibiótico norfloxacina e o ácido *trans*-cinâmico foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água estéril. A CPZ e BrEt foram dissolvidos em água destilada estéril e CCCP foi diluído em metanol/água (1:3, v/v). Todas as substâncias foram diluídas até uma concentração padrão de 1024 μg/mL.

Meios de Cultura

Os meios de cultura *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco, Detroit, Michigan, EUA) e *Brain Heart Infusion* (BHI, KASVI-Laboratory Products and Equipment, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) foram preparados na concentração de 10%.

Bactérias

Para os testes microbiológicos foram utilizados *S. aureus* ATCC ® 29213 e a cepa de *S. aureus* 1199B, que confere resistência às fluoroquinolonas hidrofílicas através da proteína de efluxo NorA. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Professor S. Gibbons (Universidade de Londres). A cepa foi mantida em ágar sangue (Laboratórios Difco Ltda., Brasil) e depois transferida e mantida em dois estoques: glicerol a -80 °C e HIA a 4 °C.

Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o método de microdiluição em caldo proposto por Javadpour et al. (1996), com adaptações. As cepas utilizadas nos testes foram inoculadas 24 horas antes dos experimentos. Após esse período, o inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina, correspondente a 0,5 na escala de McFarland, aproximadamente 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. O microtubo foi preenchido com 900 µL de BHI e 100 µL do inóculo, e as placas foram preenchidas com 100 µL da solução final presentes nos microtubos. A microdiluição foi realizada com 100 µL do ácido *trans*-cinâmico em diluições seriadas até o penúltimo poço da placa (1:1), sendo esta última utilizada como controle de crescimento. As concentrações variaram de 512 µg/mL a 8 µg/mL. Após 24 horas de incubação, as leituras foram feitas adicionando 20 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). Os resultados foram observados quando a resazurina foi oxidada em meio ácido causada pelo crescimento bacteriano, promovendo a mudança de cor de azul para rosa (Njoku *et al.*, 2023).

A resazurina é um corante azul que pode ser irreversivelmente reduzido pela oxidorredutase de bactérias ativas, convertendo-se em resorufina, uma substância fluorescente de coloração rosa. A resorufina pode, por sua vez, ser reduzida para hidroresorufina, fornecendo uma medida quantificável da atividade metabólica bacteriana. Devido a essas propriedades, a resazurina é amplamente utilizada em estudos microbiológicos para avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais (Silva et al., 2024), óleos essenciais (Santos et al., 2021) e produtos sintéticos (Morais Oliveira-Tintino et al., 2025). Esse método destaca-se pela sua simplicidade e alta capacidade de processamento, tornando-se uma ferramenta eficiente e eficaz para a investigação da atividade antimicrobiana (Chakansin et al., 2022).

Avaliação da inibição da bomba de efluxo pela modificação da CIM da norfloxacina e do BrEt

Para verificar se o ácido *trans*-cinâmico atua como um potencial inibidor da bomba de efluxo, foi utilizado um estudo comparativo entre os efeitos dos inibidores padrão para avaliar a capacidade de diminuir a CIM do antibiótico norfloxacina e BrEt (Coutinho *et al.*, 2008). Inibidores padrão, CCCP (1 µg/mL) e CPZ (8 µg/mL) foram usados para validar a expressão da bomba pelas cepas testadas. A inibição da bomba de efluxo foi testada utilizando uma MIC/8 dos inibidores e compostos avaliados. Nos testes, 150 µL de cada inóculo bacteriano foram suspensos em solução salina equivalente a 0,5 na escala de McFarland, aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL, somados ao CCCP, inibidores de CPZ e ácido *trans*-cinâmico em CIM/8 e completado com BHI. Estes foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços às quais foram adicionados 100 µL de antibiótico ou BrEt em diluições seriadas (1:1) variando de 512 a 0,5 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e o crescimento bacteriano foi avaliado utilizando resazurina. Os resultados foram observados quando a resazurina foi oxidada em meio ácido causado pelo crescimento bacteriano mudando a cor de azul para rosa (Njoku *et al.*, 2023). A CIM dos controles foi avaliada apenas com placas de antibiótico e BrEt, e os testes foram realizados em triplicata.

Ação inibidora de bombas de efluxo NorA avaliada pelo aumento da emissão de fluorescência de BrEt

Foi utilizada a cepa 1199B de *S. aureus* que expressa a proteína NorA. As cepas foram semeadas em meio Agar Mueller Hinton, 24 horas antes da realização do experimento. O semeio bacteriano foi mantido em estufa bacteriológica a 37 ºC. O inóculo foi preparado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) até atingir a escala 0,5 de McFarland e distribuído em placas black de 96 poços. O ácido *trans*-cinâmico foi testado nas concentrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL. Para o teste foi adicionado o ácido *trans*-cinâmico e o inóculo bacteriano. O controle negativo consistiu em PBS e inóculo. O controle positivo consistiu em CCCP nas concentrações 200 µg/mL e 100 µg/mL com inóculo. As placas foram incubadas em estufa por 1h e em seguida se adicionou 2 µg/mL de BrEt em todos os poços. As soluções foram novamente incubadas por 1h. A leitura foi realizada com leitor de microplaca de fluorescência Cytation 1, BioTek® (Winooski, VT, USA) e Software Gen5™ 3.11. Aplicou-se excitação de 530 nm e emissão comprimento de onda 590 nm (Oliveira-Tintino *et al.*, 2023).

Avaliação da permeabilidade de membrana bacteriana pelo método de fluorescência com SYTOX Green

Para esse teste foi utilizado o corante SYTOX Green que é intercalante de DNA. Foi preparado o inóculo bacteriano da cepa *S. aureus* 1199B. O inóculo foi distribuído em placa black de 96 poços. Foi adicionada o ácido *trans*-cinâmico até obtenção das concentrações de 100 e 50 µg/mL. A polimixina B foi utilizada com controle positivo nas concentrações de 100 µg/mL e 50 µg/mL. No grupo controle negativo adicionou-se apenas solução salina tamponada com fosfato (PBS). As placas foram incubadas por 1h. Em seguida foi adicionado 100 µL de SYTOX Green em concentração final de 1 µM. As placas foram incubadas por 1h e foi realizada a leitura de fluorescência no leitor de placas Cytation 1, BioTek® (Winooski, VT, USA) e Software Gen5™ 3.11. Foi utilizado filtro de excitação 485 nm e emissão de 528 nm. Os testes foram realizados em triplicata (Yuen *et al.*, 2023).

Análise estatística

Os resultados foram realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada por meio de uma ANOVA *one-way* ou *two-way*, seguido do teste *post hoc* de Dunnett. Os resultados foram expressos em média geométrica sendo considerados significativos valores $p<0,05$. Os dados foram analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prisma 6.01.

Ligação molecular entre o ácido *trans*-cinâmico e a bomba de efluxo NorA
Preparação de receptores para estudos de *docking*

Para investigar como o ácido *trans*-cinâmico interage com as bombas de efluxo NorA, foi utilizada a metodologia descrita por Siqueira et al. (2021). A sequência de resíduos de aminoácidos da cepa 1199B de *S. aureus*, que contém a bomba de efluxo NorA, foi obtida no banco de dados Universal Protein Resource (UniProt)(Bateman, 2019), sob o código NCTC Q03325 (Oliveira *et al.*, 2022). Para a geração dos modelos de proteínas, foi empregado o método de modelagem por homologia oferecido pelo servidor online SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/), configurado para realizar buscas de modelos estruturais por meio do algoritmo de busca de sequência iterativa rápida baseada em HMM-HMM (HHBlits) (Alves Borges Leal *et al.*, 2021; Remmert *et al.*, 2012). Após o alinhamento, foi selecionado

as estruturas com maior similaridade para construir o modelo da proteína. Em particular, foi utilizado a estrutura do transportador YajR de *E. coli* (PDB-ID: 3WDO) como modelo para NorA (Jiang *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2021; Waterhouse *et al.*, 2018).

Para fins de corroboração, a estrutura química da bomba de efluxo NorA em complexo com um fragmento sintético de anticorpo (Fab) foi obtida no repositório do RCSB *Protein Data Bank* (https://www.rcsb.org/). A estrutura está depositada sob o código de identificação 7LO7 e é classificada como uma proteína de transporte em dois organismos distintos: *Staphylococcus aureus* e *Homo sapiens*. A proteína foi expressa em *Escherichia coli*, e sua estrutura foi determinada por microscopia eletrônica, com resolução de 3,74 Å (Brawley et al., 2022). Para o preparo das proteínas para as simulações, foram adicionados hidrogênios polares e cargas de Gasteiger (Yan et al., 2014), utilizando o programa AutoDockTools® (https://autodocksuite.scripps.edu/adt/) (Morris et al., 2009). Adicionalmente, a superfície da cavidade proteica com maior probabilidade de corresponder ao sítio de ligação foi mapeada por meio da ferramenta DoGSite3, disponível no servidor *ProteinsPlus* (https://proteins.plus/), resultando em um mapa de superfície das cadeias laterais dos resíduos identificados.

Simulação de Docagem Molecular e Saída de Dados

As simulações de *docking* molecular foram realizadas utilizando o Algoritmo Genético Lamarckiano implementado no software AutoDock Vina® (versão 1.1.2) (Eberhardt et al., 2021). Os parâmetros da *grid box* foram definidos de modo a abranger todo o espaço conformacional da proteína NorA, utilizando as estruturas depositadas sob os códigos PDB 3WDO e 7LO7. Para o PDB 3WDO, as dimensões da *grid box* foram estabelecidas em x = 79 Å, y = 75 Å e z = 75 Å, com coordenadas centrais em x = 5,070, y = −2,175 e z = −19,135. Para o PDB 7LO7, as dimensões da *grid box* foram definidas como x = 54 Å, y = 58 Å e z = 62 Å, com coordenadas centrais em x = 137,578, y = 138,065 e z = 156,646. O brometo de etídio (BrEt), a norfloxacina e a CPZ foram utilizados como compostos de referência para avaliar o potencial de inibição da bomba de efluxo NorA. O critério de seleção da melhor pose inclui o alinhamento entre a validação estatística, medida pelo Desvio Quadrático Médio (RMSD) inferior a 2.0 Å, e a energia de afinidade inferior a -6.0 kcal/mol (Marinho *et al.*, 2020).

Análise de Otimização Multiparamétrica - MPO e Ensaio de Permeação por Membrana Artificial Paralela - PAMPA

Para estimativa do perfil de farmacocinética do ácido *trans*-cinâmico , foi feita uma estimativa quantitativa de *drug likeness* pelo algoritmo de *Multiparameter Optimization* (MPO) – Eq. 1 – usando as propriedades físico-químicas calculadas pelo programa de licença acadêmica MarvinSketch® Neon.3 LTS, Chemaxon© (https://chemaxon.com/marvin): $d = \sum_{i=1}^{N} w_k \left(T(x^0)\right)_k$ (1), onde *w* é o fator de ponderação (0 a 1) de cada atributo físico-químico (*k*), atribuído à função de satisfação dos limiares estatísticos ($T(x)$), que incluem: lipofilicidade intrínseca (logP) ≤ 3 e em pH fisiológico (logD at pH 7.4) ≤ 2, peso molecular (MW) ≤ 360 g/mol, área de superfície polar topológica (TPSA) 40-90 Å², H-doadores de ligações (grupos OH e NH) ≤ 1 e pKa básico ≤ 8 (N = 6 propriedades), e o somatório resulta na pontuação desejável (*d*) que varia de 0 a 6 conforme a viabilidade farmacocinética (Wager *et al.*, 2010).

Os resultados foram relacionados às propriedades farmacocinéticas e de estabilidade metabólica, expressas por descritores do ensaio de permeação em membrana artificial paralela (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay* – PAMPA). Esses descritores foram preditos utilizando as ferramentas Deep-PK (https://biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/), ADMETlab 3.0 (https://admetlab3.scbdd.com/), PreADMET (https://preadmet.qsarhub.com/), ADMETboost (https://ai-druglab.smu.edu/admet) e ADMET-AI (https://admet.ai.greenstonebio.com/) (da Rocha et al., 2024). Essas ferramentas foram empregadas para estimar o grau de viabilidade celular do composto.

Resultados

Atividade Antibacteriana Direta por Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi obtida através de uma média geométrica. A Tabela 1 contém os resultados da CIM para a cepa 1199B de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo NorA, sendo verificado para o ácido *trans*-cinâmico uma CIM de 1024 µg/mL, sendo essa CIM maior que a do antibiótico (norfloxacina) utilizado e dos inibidores padrão para bomba de efluxo (CCCP, CPZ e BrEt). Os dados nas Tabelas 1 e 2 correspondem à média de três repetições experimentais. Como não houve variações entre os valores obtidos, o desvio padrão calculado foi zero.

Tabela 1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima do ácido *trans*-cinâmico (µg/mL) contra a cepa de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo NorA

Substâncias	**SA-1199B**				**Desvio padrão**
	Repetições				
	1	2	3	Média	0
Ácido *trans*-cinâmico	1024	1024	1024	1024	0
Norfloxacina	256	256	256	256	0
CCCP	8	8	8	8	0
CPZ	128	128	128	128	0
BrEt	128	128	128	128	0

SA: *Staphylococcus aureus*; CCCP: Carbonilcianeto m-Clorofenil Hidrazona; CPZ: Clorpromazina; BrEt: brometo de etídio

Expressão fenotípica de *Staphylococcus aureus* portadora da bomba de efluxo NorA

Os ensaios para verificar a expressão fenotípica da bomba de efluxo NorA pela cepa 1199B de *S. aureus* foi avaliada por meio de ensaios utilizando o BrEt em associação com os inibidores clorpromazina e CCCP, em comparação com a estirpe ATCC 29213 de *S. aureus*, que não possui bombas de efluxo.

Os resultados apresentados na Tabela 2 confirmam que há uma diferença fenotípica entre as duas cepas. Os resultados para a cepa 1199B de *S. aureus* apresentou uma CIM maior para o BrEt, indicando a superexpressão da bomba de efluxo NorA, enquanto a cepa ATCC 29213 de *S. aureus* teve o valor de CIM menor, demonstrando a ausência desse mecanismo de ação para essa cepa. O inibidor clorpromazina potencializou esse efeito ao inibir a ação da bomba de efluxo, resultando em uma redução da CIM na cepa 1199B, confirmando a presença da proteína de efluxo NorA.

As concentrações inibitórias mínimas do brometo de etidio são, portanto, utilizadas como um marcador da atividade da bomba de efluxo. Quando a bomba de efluxo está superexpressa (como na cepa 1199B), é necessária uma concentração maior de brometo de etidio para se atingir a inibição, porque as bombas estão removendo o composto da célula mais eficientemente. Enquanto, na cepa ATCC 29213, que não possui bombas de efluxo, a CIM de brometo de etidio será menor, já que o brometo de etidio não está sendo expulso eficientemente da célula (Martins *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2020).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima - CIM do brometo de etidio em diferentes estirpes de *S. aureus* (µg/mL)

Substâncias	1199B (NorA)					SA ATCC 29213				
	Repetições			M	SD	Repetições			M	SD
	1	2	3			1	2	3		
BrEt	128	128	128	128	0	16	16	16	16	0
Clorpromazina + BrEt	64	64	64	64	0	16	16	16	16	0
	p < 0,0001					p < 0,0001				

1199B (NorA): Estirpe de *S. aureus* que expressa a bomba de efluxo NorA; BrEt: brometo de etídio; SA ATCC 29213: *American Type Culture Collection S. aureus* não portador da bomba de efluxo; Os valores são expressos como média (M) de triplicatas ± desvio padrão da média (SD). A significância estatística é indicada pelos valores "*p*" relativos ao controle.

Avaliação do potencial de inibição da bomba de efluxo pela redução da CIM de norfloxacina e brometo de etídio (BrEt)

Para verificar se a atividade do ácido *trans*-cinâmico está relacionada com o mecanismo de resistência através de bombas de efluxo, avaliou-se contra a cepa 1199B de *S. aureus* que superexpressa a proteína de efluxo NorA (Figura 1A e 1B). Ao avaliar o ácido *trans*-cinâmico associado à norfloxacina para a cepa 1199B de *S. aureus* foi observado um efeito potencializador da atividade antibiótica, reduzindo a CIM da norfloxacina de 256 µg/mL para 128 µg/mL.

Quando o ácido *trans*-cinâmico foi analisado em associação com o brometo de etídio para essa mesma cepa foi verificado uma redução na CIM do BrEt de 128 µg/mL para 64 µg/mL. De acordo com a Figura 1B, a redução da CIM observada para a norfloxacina e o BrEt quando em associação com os inibidores padrão CCCP e CPZ é indicativo da presença da bomba NorA para *S. aureus* 1199B.

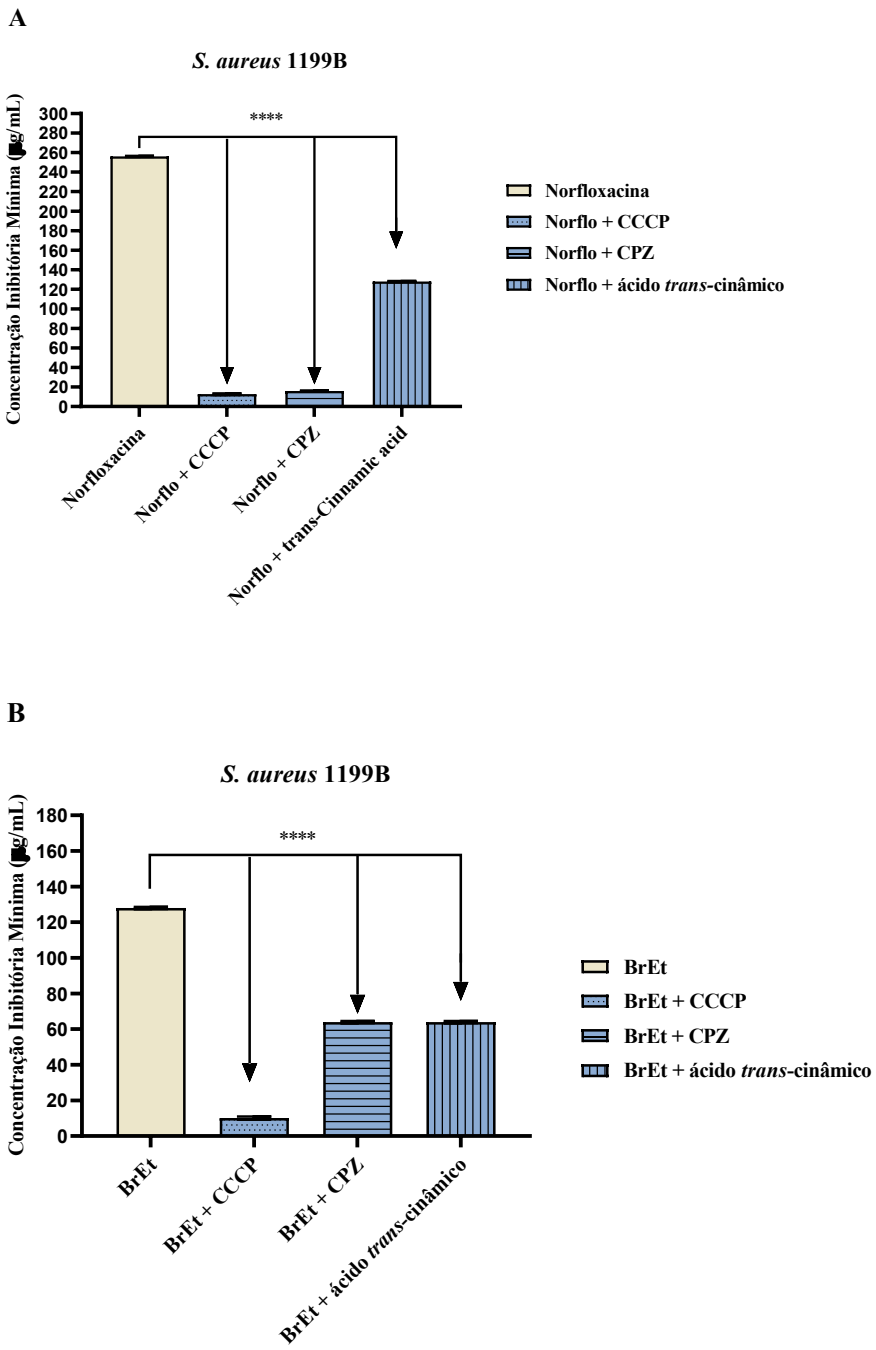


Figura 1. Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo NorA pelo ácido *trans*-cinâmico contra a estirpe *S. aureus* 1199B, em associação com Norfloxacina (A) e BrEt (B). Os valores representam a média geométrica ± SEM (erro padrão da média). A análise foi realizada com ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. **** = $p < 0,0001$ vs. Controle. CCCP: Carbonilcianeto m-Clorofenil Hidrazona; CPZ: Clorpromazina; BrEt: brometo de etídio

Avaliação da inibição da bomba de efluxo por emissão de fluorescência

Para investigar o mecanismo de inibição da proteína de efluxo NorA presente na cepa 1199B de *S. aureus*, foi verificado a capacidade do ácido *trans*-cinâmico de aumentar o acúmulo de brometo de etídio no interior da célula bacteriana através da emissão de sua florescência. Ao avaliar a emissão de fluorescência na cepas *S. aureus* 1199B, verificou-se que o ácido *trans*-cinâmico aumentou significativamente a emissão de fluorescência do BrEt , quando comparado ao controle negativo (BrEt + bactéria).

Foi observado que as duas concentrações avaliadas de 200 µg/mL e 100 µg/mL do ácido *trans*-cinâmico sobre a cepa 1199B apresentaram efeito positivo significativo, aumentando os percentuais de emissão de fluorescência do BrEt em 21 e 17 % quando comparado com o controle negativo (Figura 3). Resultado significante também foi observado pelo inibidor de bomba, CCCP, indicando reprodutibilidade do experimento (Figura 2). Esses resultados indicam a inibição da bomba de efluxo NorA pelo ácido *trans*-cinâmico, corroborando com os ensaios anteriores de redução da CIM do antibiótico.

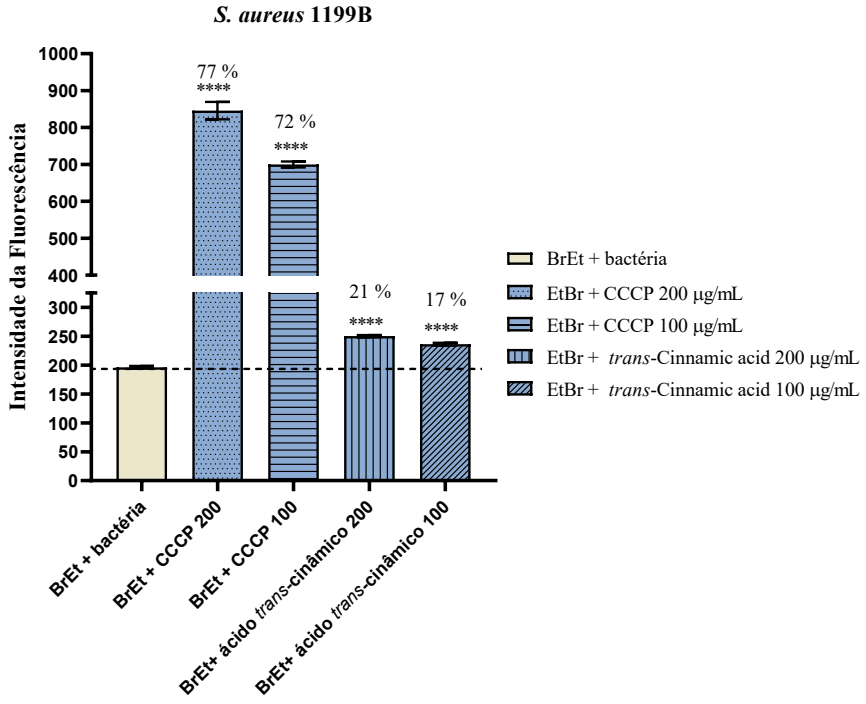


Figura 2. Avaliação da inibição das bombas de efluxo NorA pelo ácido *trans*-cinâmico . Avaliada pela medição da fluorescência de BrEt em *S. aureus* 1199B. **** = $p < 0,0001$ vs BrEt + bactérias. CCCP: Carbonilcianeto m-Clorofenil Hidrazona; BrEt: brometo de etídio

Avaliação da permeabilidade da membrana bacteriana pelo método de fluorescência com SYTOX Green

Observou-se que o ácido *trans*-cinâmico nas concentrações de 50 e 100 µg/mL aumentou significativamente os percentuais de intensidade de fluorescência do SYTOX Green em 29 e 49%, quando comparado ao controle negativo na cepa 1199B de *S. aureus*. Esses dados demonstram que o ácido *trans*-cinâmico atua no aumento da permeabilidade da membrana nas cepas de *S. aureus*, indicando que esse é um dos mecanismos de ação envolvidos na sua atividade. O controle positivo polimixina B aumentou significativamente a permeabilidade de membrana bacteriana, indicando reprodutibilidade do experimento (Figura 3).

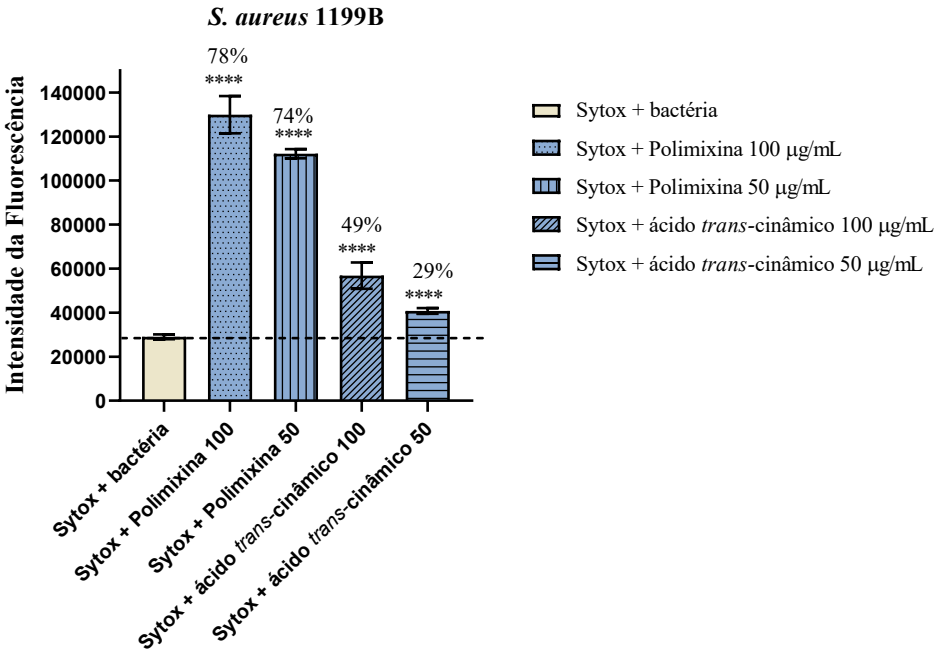


Figura 3. Avaliação da ação do ácido *trans*-cinâmico a 100 µg/mL e 50 µg/mL sobre a permeabilidade da membrana bacteriana de *S. aureus* 1199B. **** $p < 0,0001$ vs Sytox Green + bactérias. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência média.

Ligação molecular entre o ácido *trans*-cinâmico e a bomba de efluxo NorA

Para melhor compreender os resultados observados *in vitro*, foi realizado um estudo de *docking* molecular entre a bomba de efluxo NorA e o ácido *trans*-cinâmico. Ao final do ciclo independente de simulações de *docking* molecular, observou-se que o ácido *trans*-cinâmico

formou um complexo com a bomba de efluxo NorA com uma energia de afinidade (E_A) calculada de −6,4 kcal/mol (Tabela 3), indicando um excelente grau de especificidade do ligante pelo receptor. A seleção da melhor conformação apresentou um valor de RMSD da ordem de 0,136 Å, demonstrando que as simulações foram realizadas dentro de um limite estatístico ideal (Yusuf et al., 2008). Embora a E_A calculada esteja dentro do valor considerado ideal (E_A < −6,0 kcal/mol) (Shityakov e Foerster, 2014), os ligantes utilizados como controle, BrEt, norfloxacina e CPZ ainda apresentaram maior afinidade de ligação com a bomba de efluxo NorA (Tabela 3). Ao final das simulações, ficou evidente que o ácido *trans*-cinâmico se complexou com a bomba de efluxo no mesmo sítio de ligação dos substratos usados como controle, incluindo BrEt e norfloxacina (Figura 4A), interagindo especialmente com resíduos envolvidos no sítio ativo da proteína, como Phe303 e Tyr225, os quais apresentaram uma superfície de cavidade estimada em 474,86 Å² (Figura 4B).

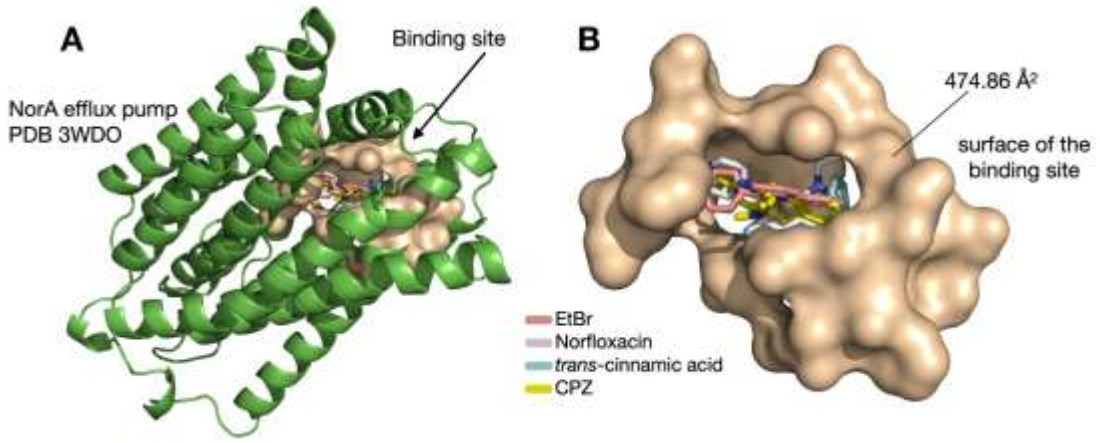


Figura 4. (A) Visualização espacial da bomba de efluxo NorA (PDB 3WDO) com a superfície da cavidade do sítio de ligação do antígeno; e (B) superfície da cavidade do sítio de ligação dos ligantes do brometo de etidio - BrEt, norfloxacina, ácido *trans*-cinâmico e clorpromazina - CPZ, após o ciclo de simulações independentes de *docking* molecular.

Ao analisar as contribuições estruturais, foi possível observar que o ácido *trans*-cinâmico formou interações intermoleculares com resíduos de aminoácidos compartilhados com os substratos, incluindo interações hidrofóbicas com a porção alifática dos resíduos Glu222, Ile244 e Val302, bem como com a porção aromática do resíduo Phe303 (Figura 5A). Destaca-se que a posição aromática do resíduo Tyr225 formou uma interação de empilhamento π (π-*stacking*) de orientação paralela com a porção aromática do ácido *trans*-cinâmico (Figura 5A) e de orientação perpendicular com a CPZ (Figura 5B), com uma

distância calculada de 3,78 Å entre os centros aromáticos. Além disso, a porção aromática do resíduo Phe303 estabelece uma interação hidrofóbica compartilhada entre os ligantes ácido *trans*-cinâmico e CPZ.

As análises sugerem que o ligante interage com fragmentos de aminoácidos frequentemente associados a outros inibidores de NorA (Silva et al., 2022), incluindo a CPZ, o que indica que o ácido *trans*-cinâmico é um forte candidato a inibidor da bomba de efluxo NorA, com potencial para atuar como adjuvante antibiótico (Couto et al., 2008; Kaatz et al., 2003; Medeiros Barreto et al., 2014).

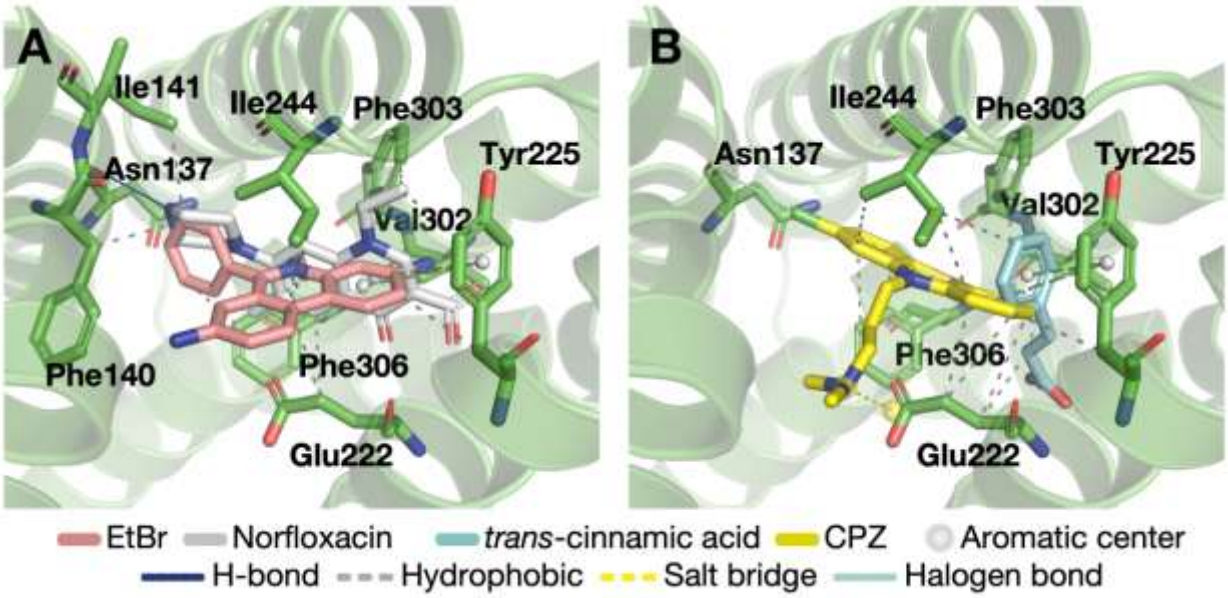


Figura 5. Visualização tridimensional das interações ligante–proteína para os ligantes (A) Brometo de etídio - BrEt e norfloxacina e (B) ácido *trans*-cinâmico e Clorpromazina - CPZ, na bomba de efluxo NorA (PDB 3WDO). O mapa tridimensional inclui a análise das interações observadas ao final das simulações de *docking* molecular, abrangendo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes salinas e ligações halogênio. Resíduos de aminoácidos: Asn137 (Asparagina 137), Phe140 (Fenilalanina 140), Ile141 (Isoleucina 141), Glu222 (Ácido glutâmico 222), Tyr225 (Tirosina 225), Ile244 (Isoleucina 244), Val302 (Valina 302), Phe303 (Fenilalanina 303) e Phe306 (Fenilalanina 306

Os resultados das simulações de *docking* molecular com o domínio transmembrana do complexo NorA-Fab (Figura 6A) demonstram que a bomba de efluxo apresenta maior seletividade quando comparada ao modelo por homologia (PDB 3WDO). A afinidade energética (E_A) do ácido *trans*-cinâmico em relação à estrutura proteica foi calculada em –

5,212 kcal/mol (Tabela 3), em comparação com a E_A observada para a ligação ao modelo homólogo (EA = –6,476 kcal/mol). Ao final do ciclo de simulações independentes, verificou-se que o ácido *trans*-cinâmico se complexou com a bomba de efluxo NorA no sítio de ligação do antígeno, juntamente com os ligantes utilizados como controles, CPZ, BrEt e norfloxacina (Figura 6B). Esse sítio corresponde a uma cavidade proteica com área superficial calculada de 544,05 Å², formada predominantemente por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, incluindo Phe140, Tyr225, Ile244 e Phe303 (Figura 6C), os quais constituem resíduos-chave na descoberta de novos inibidores da bomba de efluxo NorA (Brawley et al., 2022).

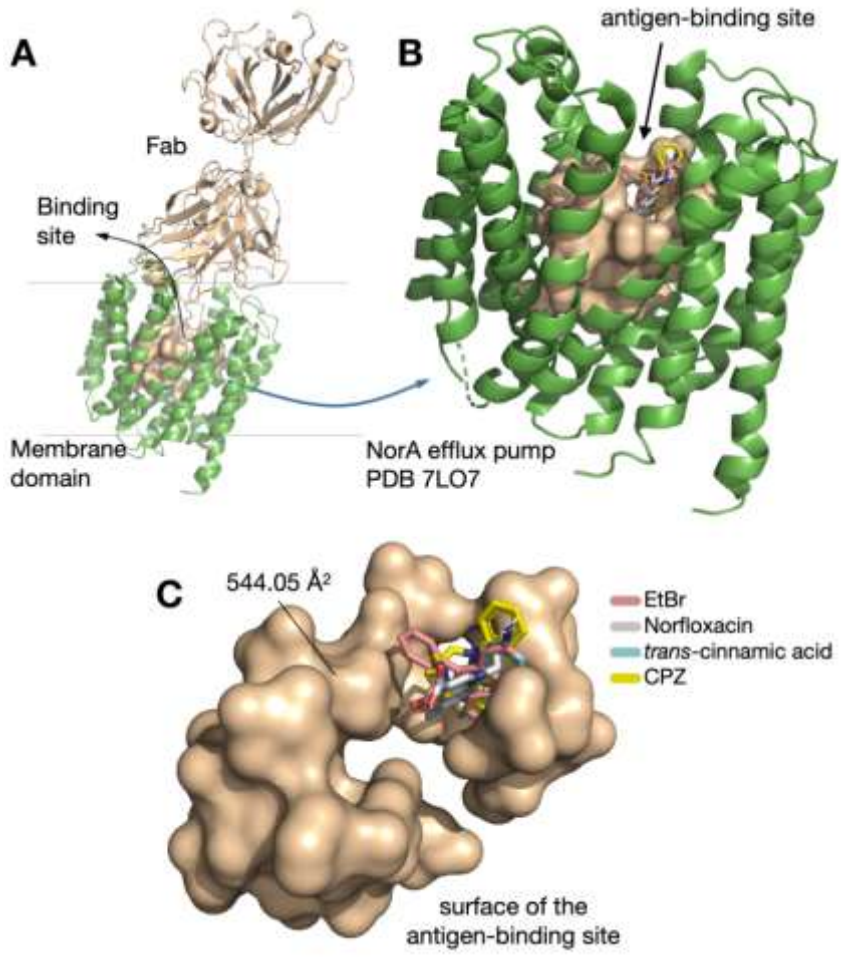


Figura 6. (A) Visualização espacial da bomba de efluxo NorA complexada a fragmentos sintéticos de ligação ao antígeno (Fab); (B) domínio transmembrana com a superfície da cavidade do sítio de ligação ao antígeno (PDB 7LO7); e (C) superfície da cavidade do sítio de ligação dos ligantes Brometo de etídio - BrEt, norfloxacina, ácido *trans*-cinâmico e Clorpromazina - CPZ, após o ciclo de simulações independentes de *docking* molecular.

Uma análise detalhada das contribuições estruturais dos ligantes nas simulações demonstrou que os ligantes utilizados como controle, BrEt e norfloxacina, interagiram com os resíduos que compõem o sítio de ligação ao antígeno (Figura 7). O BrEt formou interações hidrofóbicas com resíduos de cadeia lateral aromática (Phe140, Tyr225 e Phe303), favorecendo seu acoplamento ao sítio ativo da proteína (Figura 7A), enquanto a porção polar da norfloxacina interagiu com a porção polar dos resíduos Thr223 (2,25 Å) e Asp307 (2,65 Å), por meio da formação de ligações de hidrogênio, nas quais as distâncias do doador–aceptor ≥ 2,5 Å caracterizam interações de força moderada a fraca (Imberty et al., 1991). Em contraste, o ligante ácido *trans*-cinâmico exibiu uma série de interações hidrofóbicas análogas às observadas para a CPZ, particularmente com os resíduos Glu222, Tyr225 e Phe303. Essa interação foi atribuída à natureza aromática do ligante. Adicionalmente, o grupo carboxilato do ligante formou uma ligação de hidrogênio com o grupo ácido do resíduo Glu222 (Figura 7B). Esses achados sugerem que o ácido *trans*-cinâmico é capaz de interagir com resíduos-chave do sítio de ligação ao antígeno co-cristalizado no complexo NorA–Fab, indicando que o composto mantém um bom espectro de interações com a bomba de efluxo, mesmo em estruturas mais seletivas.

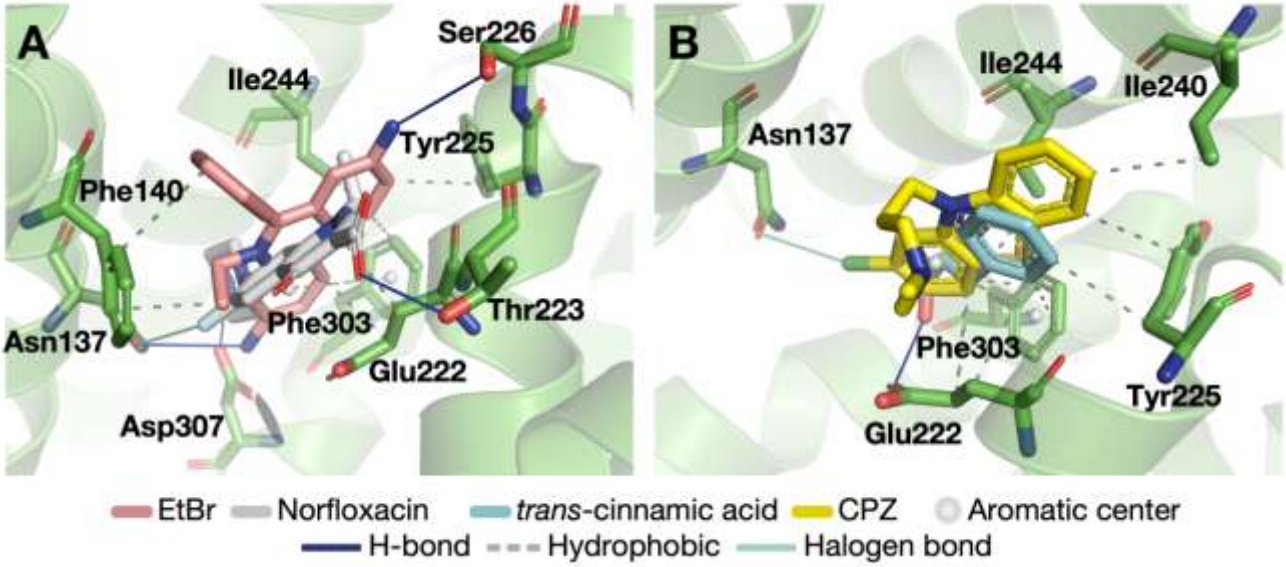


Figura 7. Visualização tridimensional das interações ligante–proteína para os ligantes (A) Brometo de etidio - BrEt e norfloxacina e (B) ácido *trans*-cinâmico e Clorpromazina - CPZ no complexo NorA–Fab (PDB 7LO7). O mapa tridimensional inclui a análise das interações de ligações de hidrogênio (H-*bond*), interações hidrofóbicas e ligações de halogênio observadas ao final das simulações de *docking* molecular. Resíduos de aminoácidos: Phe140 (fenilalanina

140), Asn137 (asparagina 137), Tyr225 (tirosina 225), Thr223 (treonina 223), Glu222 (ácido glutâmico 222), Phe303 (fenilalanina 303), Asp307 (ácido aspártico 307), Ile244 (isoleucina 244), Ser226 (serina 226) e Ile240 (isoleucina 240).

Tabela 3. Dados das simulações de *docking* molecular realizadas entre o ácido *trans*-cinâmico e os ligantes utilizados como controle, CPZ, BrEt e norfloxacina em relação à bomba de efluxo NorA, a partir dos PDBs 3WDO (modelo por homologia) e 7LO7. Detalhes das simulações ligante–proteína expressos quanto ao tipo de interação, resíduo envolvido e distância ligante–resíduo.

PDB	**Ligante**	**RMSD (Å)**	E_A **(kcal/mol)**	**Interações**	
				Tipo	**Resíduos (Distância Å)**
3WDO	ácido *trans*-cinâmico	0,136	–6,476	Hidrofóbica	Glu222 (3,66), Glu222 (3,97), Ile244 (3,96), Val302 (3,48), Phe303 (3,58)
				π-*Stacking*	Tyr225 (3,78)
	CPZ	1,783	–7,082	Hidrofóbica	Glu222 (4,28), Glu222 (3,81), Tyr225 (3,76), Ile244 (4,27), Ile244 (4,02), Val302 (3,80), Phe303 (4,43), Phe306 (3,67), Phe306 (4,23)
				π-*Stacking*	Tyr225 (5,05)
				Ligação de halogênio	Asn137 (3,57)
				Ponte de salina	Glu222 (3,97)
	BrEt	1,942	–8,946	Hidrofóbica	Phe140 (3,70), Ile141 (3,72), Glu222 (3,67), Tyr225 (3,81), Ile244 (3,93), Ile244 (3,60), Phe303 (3,59), Phe306 (3,95), Phe306 (3,71)
				π-*Stacking*	Tyr225 (4,85)
	Norfloxacina	1,902	–7,813	Hidrofóbica	Phe140 (3,70), Ile141 (3,72), Glu222 (3,67), Tyr225 (3,81), Ile244 (3,93), Ile244 (3,60), Phe303 (3,59), Phe306 (3,95), Phe306 (3,71)
				π-*Stacking*	Tyr225 (4,85)
7LO7	ácido *trans*-cinâmico	0,829	–5,212	Hidrofóbica	Glu222 (3,91), Glu222 (3,86), Tyr225 (3,63), Ile244 (3,71), Ile244 (3,70), Phe303 (3,93), Phe303 (3,55), Phe303 (3,77)
				Ligação de hidrogênio	Glu222 (2,44), Glu222 (2,38)
	CPZ	1,792	–6,081	Hidrofóbica	Glu222 (3,67), Tyr225 (3,87), Ile240 (3,65)

			π-*Stacking*	Phe303 (4,79)
			Ligação de halogênio	Asn137 (3,38)
BrEt	1,056	–8,441	Hidrofóbica	Phe140 (3,82), Phe140 (3,54), Glu222 (3,92), Glu222 (3,89), Tyr225 (3,60), Ile244 (3,69), Phe303 (3,82)
			Ligação de hidrogênio	Asn137 (3,06), Ser226 (3,26)
			π-*Stacking*	Phe303 (4,77)
Norfloxacina	1,964	–5,748	Ligação de hidrogênio	Thr223 (2,25), Asp307 (2,65)
			Ligação de halogênio	Asn137 (3,62)

Análise de Otimização Multiparamétrica - MPO e Ensaio de Permeação por Membrana Artificial Paralela - PAMPA

Para Wager et al. (2016), compostos pouco lipofílicos (logP < 3) que são mais polares do que compostos ativos no Sistema Nervoso Central - SNC (TPSA > 40 Å²) apresentam um ótimo alinhamento entre atributos *in vitro* de PKDM, que incluem: alta permeabilidade (P_{app} > $10x10^{-6}$ cm/s) e baixa depuração intrínseca da fração livre no plasma sanguíneo ($CL_{int,u}$ < 8.0 mL/min/kg) (Pettersson *et al.*, 2016).

No mapa de potencial de lipofilicidade molecular (MLP) é possível observar as contribuições polares e lipofílicas da superfície molecular do ácido *trans*-cinâmico (Figura 8A), possibilitando a compreensão das características de difusão passiva na bicamada lipídica celular do composto (Du; Arteca, 1996; Radchenko *et al.*, 2016). Nesta análise, foi possível observar que o ácido *trans*-cinâmico apresenta uma região de superfície polar de 37,30 Å² com forte contribuição do grupo hidroxila (OH) ionizável (espectro de cor vermelho), enquanto a região aromática é majoritariamente hidrofóbica (espectro de cor azul), resultando em um logP na ordem de 2,14, podendo se reduzir a -0,50 em função do grupo carboxila (COOH) doador de hidrogênio com pKa 4,71, indicando a formação de uma espécie desprotonada em pH fisiológico (pH de aproximadamente 7.4).

Quando os descritores relacionados à lipofilicidade (logP) e à polaridade (TPSA) foram alinhados, foi possível observar que o ácido *trans*-cinâmico se encontra em um espaço físico-químico ocupado por candidatos a fármacos com múltiplas propriedades otimizadas (MPO) do sistema de classificação biofarmacêutica da Pfizer, Inc (Hughes *et al.*, 2008),

especialmente pelo valor calculado de logP < 3 (Figura 8B), resultando em uma pontuação de MPO na ordem de 5,62 (em uma escala de 0 a 6) que expressa a ordem de conveniência dos atributos físico-químicos em suas propriedades farmacocinéticas (Tabela 4).

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do ácido *trans*-cinâmico calculadas e aplicadas aos critérios de classificação da Pfizer, Inc.

Propriedades	**Valor**	**T^0**
logP	2,14	1,00
logD a pH 7,4	-0,50	1,00
MW	148,16 g/mol	1,00
TPSA	37,30 Å²	0,86
Grupos OH	1	0,75
pKa	0,00 (básico) 4,71 (ácido)	1,00
Pontos MPO	5,62	
Regra da Pfizer	Aceito (logP < 3)	

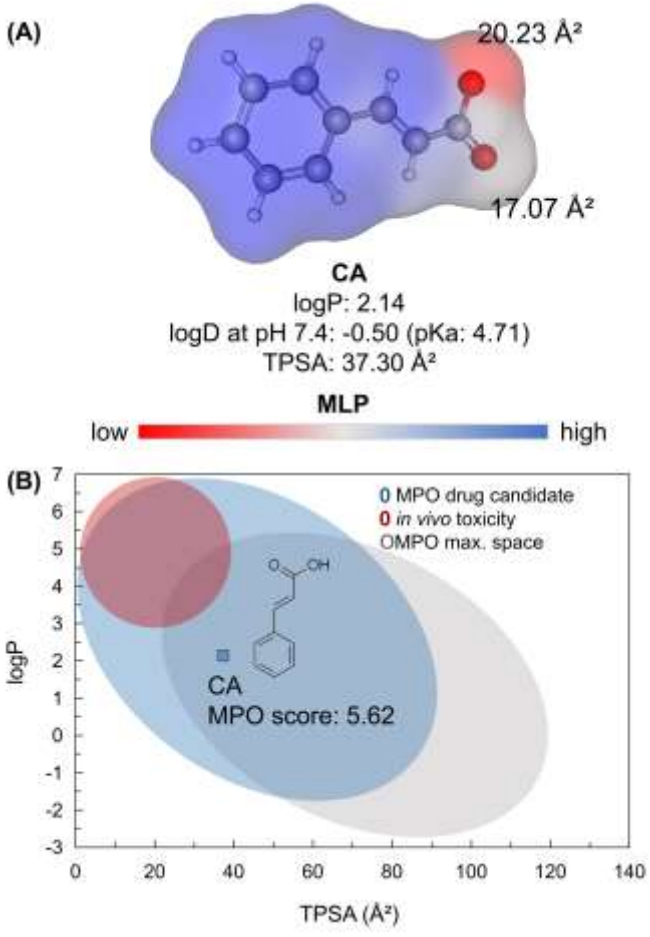


Figura 8. Análises farmacocinéticas preditivas baseadas em (A) mapa de potencial de

lipofilicidade molecular (MLP) e (B) alinhamento entre descritores de lipofilicidade (logP) e polaridade (TPSA) para estimar a viabilidade farmacocinética do ácido *trans*-cinâmico

Os descritores PAMPA expressam os atributos farmacocinéticos relacionados à permeabilidade celular de pequenas moléculas (Rácz et al., 2023; Sun et al., 2017). Essa capacidade está diretamente associada à absorção oral e à estabilidade metabólica de candidatos a fármacos (Johnson et al., 2009). O teste preditivo PAMPA guiado por inteligência artificial (IA) (Figura 9A) demonstrou que o ácido *trans*-cinâmico ocupa um espaço fisicoquímico característico de compostos que apresentam alta permeabilidade celular efetiva ($logP_{app,A\rightarrow B} \geq -5{,}0$ cm/s) em células Caco-2 e estabilidade metabólica adequada, resultando em baixa depuração do fármaco no sistema de microssomos hepáticos (CLMicro ≤ 10 μL/min/mg), de acordo com o banco de dados *DrugBank*® (Swanson et al., 2024). Essas características estão associadas a fármacos que demonstram elevada viabilidade celular. No contexto da descoberta de agentes antimicrobianos, esses resultados sugerem que o composto apresenta baixa taxa de efluxo para o meio extracelular (Zurnacı et al., 2021).

Além disso, a predição consensual do PAMPA (permeabilidade celular efetiva) indicou que o ácido *trans*-cinâmico pode apresentar um valor de $P_{app,A\rightarrow B}$ em células Caco-2 superior a $2{,}0 \times 10^{-5}$ cm/s (Figura 9B), sugerindo absorção substancial no tecido celular que compõe o intestino humano. Por outro lado, foi observado um valor predito de $P_{app,A\rightarrow B}$ de aproximadamente 1×10^{-4} cm/s na linhagem celular MDCK, indicando que o composto pode apresentar maior permeabilidade em membranas celulares mais seletivas, o que favorece o efeito antimicrobiano, enquanto o baixo risco de efluxo mediado pela glicoproteína P (P_{eff} P-gp) assegura elevada biodisponibilidade oral do composto no plasma sanguíneo.

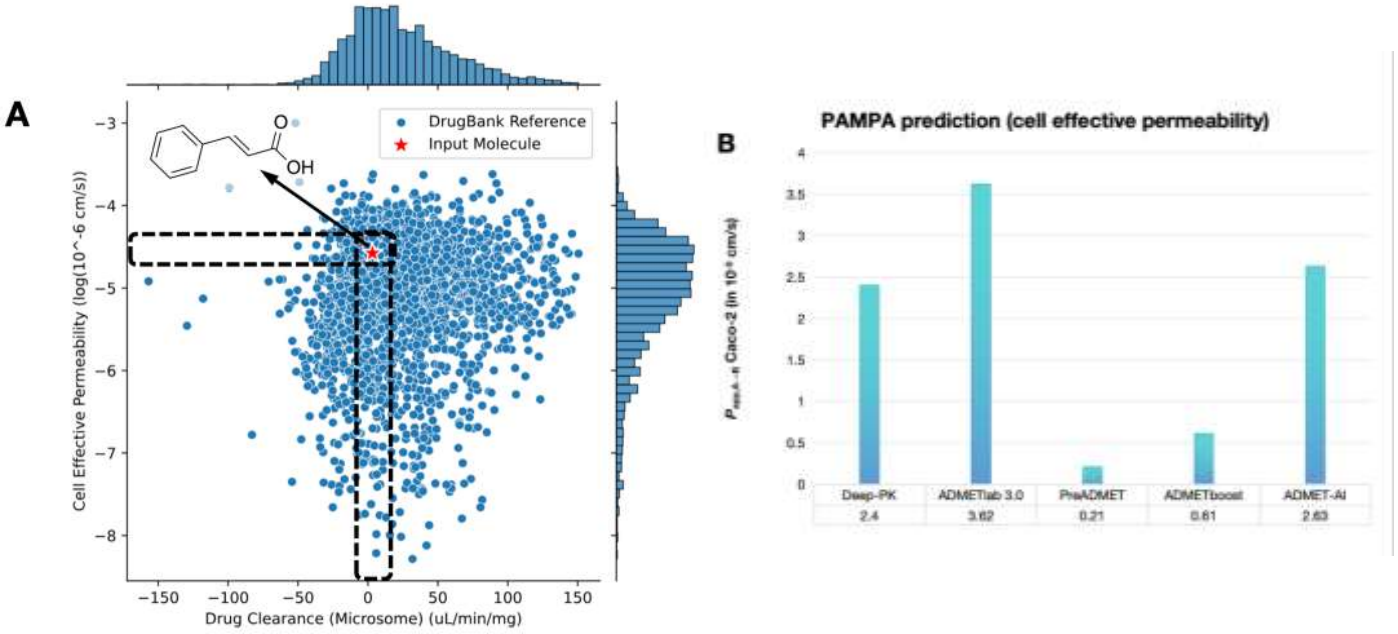


Figura 9. (A) Teste de similaridade guiado por inteligência artificial (IA) com compostos depositados no banco de dados *DrugBank*®, considerando os descritores de permeabilidade celular efetiva ($logP_{app,A\rightarrow B}$ em células Caco-2) e depuração do fármaco no sistema de microssomos hepáticos humanos; e (B) predição consensual multiplataforma dos descritores PAMPA expressos em $P_{app,A\rightarrow B}$ em células Caco-2.

Além disso, a baixa lipofilicidade do composto avaliado em pH fisiológico, bem como o baixo volume de distribuição (VD) predito de 0,56 L/kg, indicam que a fração molecular livre se distribui tanto no plasma sanguíneo quanto nos tecidos biológicos (Pires et al., 2018), enquanto o baixo $CL_{int,u}$ estimado em 4,84 mL/min/kg sugere que o volume de distribuição sistêmica do composto permanece majoritariamente livre no plasma, sem ligação significativa às proteínas plasmáticas.

Por outro lado, a depuração no sistema de microssomos hepáticos (CL_{Micro}) foi estimada em aproximadamente 6,70 µL/min/mg, assim como uma baixa depuração em células hepatocitárias (0,72 µL/min/10^6 células), sugerindo que o composto é liberado de forma gradual do ambiente intracelular e, consequentemente, apresenta alta viabilidade celular (Tabela 5). Esse atributo está relacionado à baixa probabilidade de o composto atuar como substrato das isoformas do citocromo P450 (2C9, 2D6 e 3A4) no fígado humano (Tabela 5), indicando maior resistência ao metabolismo de fase I. Esse perfil favorece a estabilidade metabólica intracelular e uma maior distribuição sistêmica, além de reduzir as chances de indução de resposta hepatotóxica (Yu et al., 2014).

Tabela 5. Propriedades farmacocinéticas expressas em descritores PAMPA: P_{app}, P_{eff} e $CL_{int,u}$, e descritores de metabolismo de fármacos, expressos em substratos CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 e descritor de lesão hepática induzida por fármacos (DILI).

Propriedade	**Valor**	**Fonte**
P_{app} Caco-2	$2{,}4\times10^{-5}$ cm/s	*Deep-PK*
P_{app} MDCK	$1{,}7\times10^{-4}$ cm/s	*Deep-PK*
P_{eff} P-gp	Não-substrato (Alta confiança)	*Deep-PK*
VD	0,56 L/kg	*Deep-PK*
Substrato CYP2C9	36,36%	*AI Drug Lab*
Substrato CYP2D6	59,57%	*AI Drug Lab*
Substrato CYP3A4	39,73%	*AI Drug Lab*
$CL_{int,u}$	4,84 mL/min/kg	*Deep-PK*
DILI (potencial de lesão hepática induzida por fármacos)	41,33%	*AI Drug Lab*

Discussão

A diversidade estrutural e as atividades biológicas presentes nos produtos naturais são uma fonte valiosa para o desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse estudo, nossos resultados mostraram que o ácido *trans*-cinâmico não exibiu atividade antibacteriana direta contra a cepa de *S. aureus* que possui a proteína de efluxo NorA.

No entanto, no estudo de Alves et al. (2013), foi observado que o ácido cinâmico apresentou atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas, incluindo *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), apresentando uma CIM superior a 1 mg/mL. Os autores desse estudo associaram esse efeito a presença do grupo carboxílico na estrutura da molécula do ácido cinâmico, tendo como função principal a de receptor de prótons.

Os resultados de Almawla et al. (2024) demonstram que o ácido cinâmico apresentou atividade antibacteriana sobre isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *S. aureus*, com uma CIM de 125 μg/mL para todos os isolados avaliados. Os potenciais antimicrobianos dos ácidos fenólicos têm sido associados com base em sua estrutura química, sendo o comprimento e a posição da cadeia saturada e a quantidade de substituições no anel benzênico central, os principais fatores responsáveis por essa atividade antibacteriana (Kumar; Goel, 2019).

Uma segunda linha de investigação é a terapia combinada, que utiliza a associação de antibióticos com compostos naturais ou sintéticos, sendo uma das estratégias viáveis para controlar patógenos multirresistentes e para reverter a resistência bacteriana através de vários mecanismos, incluindo a inibição do efluxo ativo. Esses agentes terapêuticos combinados apresentam atividade antibacteriana, reduzindo a CIM dos antibióticos combinados (Singh *et al.*, 2022).

No presente estudo observou-se que a combinação do ácido *trans*-cinâmico com norfloxacina potencializou a atividade antibiótica, reduzindo a CIM da norfloxacina. Além disso, a combinação com brometo de etídio reduziu a CIM do ErBr de 128 µg/mL para 64 µg/mL. Na literatura, não há relatos sobre a atividade modificadora da resistência bacteriana pelo ácido *trans*-cinâmico através da inibição do efluxo ativo presente na cepa de *S. aureus* portadora da bomba de efluxo NorA, sendo esse o primeiro estudo a avaliar essa atividade.

No entanto, na literatura há estudos conduzidos com outros ácidos fenólicos, como o de Santos et al. (2018) que verificou que o ácido cafeico e o ácido gálico potencializaram a atividade do antibiótico norfloxacina frente a mesma cepa utilizada no presente estudo, a SA-1199B portadoras da proteína de efluxo NorA. No estudo de Santos et al. (2018) também foi demonstrado que esses dois ácidos fenólicos apresentaram atividade na reversão da resistência bacteriana pela inibição da bomba de efluxo NorA avaliada através da redução da CIM do brometo de etidio.

Uma potencialização de duas vezes na atividade de antibióticos promovida por inibidores de bombas de efluxo (EPIs) pode parecer modesta, porém trata-se de um achado frequente em estudos sobre resistência bacteriana. A literatura relata resultados semelhantes em cepas de *Staphylococcus aureus*, nas quais dois diterpenos isolados de *Lycopus europaeus* — metil-1α-acetoxi-7α,14α-diidroxi-8,15-isopimaradien-18-oato (2) e metil-1α,14α-diacetoxi-7α-hidroxi-8,15-isopimaradien-18-oato (3), embora não apresentassem atividade antibacteriana isoladamente, reduziram a CIM da eritromicina de 256 µg/mL para 128 µg/mL, resultando em uma potencialização de duas vezes. Esse efeito também foi observado para outros diterpenos do tipo isopimarano identificados no estudo, bem como para os diterpenoides 5,9-diidroxigeranillinalol e 9-acetoxi-5-hidroxigeranillinalol (Durães et al., 2019; Gibbons et al., 2003; Hussein; Rodríguez, 2000).

Embora muitos inibidores de bombas de efluxo (EPIs) promovam potencializações superiores a duas vezes, há relatos de compostos que apresentam aumentos mais modestos na eficácia dos antibióticos. Por exemplo, o composto CD15-3 atuou como inibidor da diidrofolato redutase (DHFR) de *Escherichia coli* e de suas variantes resistentes ao

trimetoprim, resultando em um aumento de aproximadamente duas vezes no IC_{50} tanto para cepas do tipo selvagem quanto para cepas resistentes (Zhang et al., 2021). Além disso, o inibidor de bomba de efluxo PAβN (β-naftilamida de fenilalanina-arginina) demonstrou uma potencialização de 2 a 4 vezes da atividade antibiótica contra diferentes cepas bacterianas (Kimishima et al., 2024).

Neste estudo, utilizou-se a clorpromazina (CPZ) como inibidor de bomba de efluxo. Kaatz et al. (2003) demonstraram que a clorpromazina afeta o fluxo de potássio através da membrana em *S. aureus* e pode interferir na função de proteínas de transporte que dependem da força próton-motriz para energizar a translocação de substratos. No estudo de Kong et al. (2016), os resultados indicaram que a CPZ compromete a integridade da membrana celular bacteriana e reduz a expressão gênica em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) que expressam o gene de resistência *mecA*. Além disso, os dados sugerem que a CPZ afeta uma proteína sensor-indutora por meio da desorganização da membrana celular do MRSA (Kong et al., 2016).

A CPZ (clorpromazina) e o CCCP (carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona) não são inibidores diretos das bombas de efluxo bacterianas. A ação dessas moléculas está associada a alterações na permeabilidade da membrana e/ou na força próton-motriz (PMF), comprometendo indiretamente a capacidade das bombas de efluxo de exportar substâncias tóxicas. O CCCP, por exemplo, é conhecido por dissipar a PMF, reduzindo a energia disponível para o funcionamento dessas bombas (Sharma et al., 2019). Além disso, tais alterações podem levar a outros efeitos fisiológicos na célula, como a inibição da atividade metabólica (Remm et al., 2022).

A expressão do gene *norA* é regulada negativamente por *MgrA*. A inativação de *MgrA* aumenta a expressão de *norA*, resultando em maior resistência a fluoroquinolonas e outros antimicrobianos. Dependendo da constituição genética da cepa, a proteína reguladora MgrA pode atuar como repressor ou ativador da expressão de *norA* (Ubukata; Itoh-Yamashita; Konno, 1989).

Para corroborar os dados sobre a inibição da proteína de efluxo NorA na cepa 1199B de *S. aureus*, analisou-se a capacidade do ácido *trans*-cinâmico de aumentar o acúmulo de brometo de etídio na célula bacteriana através da emissão de fluorescência. De acordo com Whittle et al. (2019), o brometo de etidio é uma ferramenta eficaz para avaliar o acúmulo intracelular em cepas bacterianas, pois só emite fluorescência quando ligado ao DNA. Assim, o nível de fluorescência do BrEt reflete diretamente o acúmulo intracelular do corante, fornecendo uma indicação clara da eficácia de mecanismos de efluxo ativo.

Portanto, o aumento da fluorescência observado nesse estudo para a cepa 1199B tratada com ácido *trans*-cinâmico confirma a inibição da bomba de efluxo NorA através de um maior acúmulo de BrEt , reforçando a hipótese de que o ácido *trans*-cinâmico atua como um inibidor da NorA. Esses dados são consistentes com os ensaios anteriores que mostraram a redução da CIM do antibiótico em presença do ácido *trans*-cinâmico , evidenciando sua eficácia na modulação da resistência bacteriana mediada por efluxo ativo.

Além disso, os resultados encontrados no presente estudo indicam que o ácido *trans*-cinâmico contribui para o aumento da permeabilidade da membrana na cepa de *S. aureus*, sugerindo que esse composto pode estar agindo sobre esse mecanismo de resistência. Para avaliar essa permeabilização, foi utilizado o corante fluorescente SYTOX Green, que tem como característica a incapacidade de atravessar membranas celulares intactas, mas penetra facilmente em células com membranas danificadas, e uma vez no interior da célula, o corante se liga ao DNA, emitindo fluorescência (Johnson; Criss, 2013; McKenzie *et al.*, 2016).

Antibióticos como a polimixina B causam danos à membrana bacteriana, resultando em um aumento significativo da fluorescência em células tratadas, quando comparadas a células não tratadas. Esse comportamento foi observado no uso do ácido *trans*-cinâmico, reforçando a hipótese de que o aumento da permeabilidade da membrana bacteriana seja um dos mecanismos responsáveis pela sua ação.

Pesquisas anteriores sobre inibidores de bombas de efluxo estabeleceram uma relação entre essas bombas e o potencial de membrana, associando sua inibição ao influxo de prótons através da membrana interna. Esse processo é responsável pela hiperpolarização da membrana, levando a alterações no estado redox celular (Whittle et al., 2024). Os resultados do presente estudo sugerem que o ácido *trans*-cinâmico pode interferir na atividade da bomba de efluxo NorA.

A técnica de *docking* molecular foi empregada para investigar e elucidar as atividades inibitórias do ácido *trans*-cinâmico sobre a bomba de efluxo NorA. Os resultados demonstraram que interações hidrofóbicas entre o ligante e os resíduos Tyr225 e Phe303 desempenham um papel fundamental na estabilidade do complexo ligante–receptor, em ambos os modelos proteicos utilizados nas simulações (PDB 3WDO e 7LO7). Essas interações hidrofóbicas são essenciais para fornecer a energia necessária à formação e manutenção da ligação entre o ácido *trans*-cinâmico e a proteína-alvo, contribuindo significativamente para a afinidade de ligação e a eficácia inibitória (Pinheiro et al., 2021). Em conjunto com as propriedades farmacocinéticas preditas, expressas por descritores PAMPA, estima-se uma viabilidade celular favorável, baseada na elevada permeabilidade

passiva celular e na taxa reduzida de depuração tanto em hepatócitos celulares quanto no sistema microssomal humano (Pettersson *et al*., 2016).

Conclusão

A combinação do ácido *trans*-cinâmico com norfloxacina potencializou a atividade antibiótica, reduzindo a CIM da norfloxacina sobre a cepa de *S. aureus* portadora da proteína de efluxo NorA. Além disso, a combinação do ácido *trans*-cinâmico com brometo de etídio também reduziu a sua CIM. Corroborando com esses achados, o ácido *trans*-cinâmico aumentou significativamente a emissão de fluorescência do BrEt, indicando maior acúmulo intracelular, o que sugere que esse composto inibe a bomba de efluxo NorA.

As simulações de molecular *docking* mostraram que o ácido *trans*-cinâmico pode atuar como inibidor da bomba de efluxo NorA ao mostrar interações ligante-proteína em comum com o inibidor CPZ, incluindo interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr225 e Phe303, enquanto os descritores farmacocinéticos mostraram que o composto apresenta uma boa permeabilidade celular, em função do equilíbrio entre lipofilicidade e polaridade, favorecido pela presença de um grupo carboxilato desprotonado.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BPI 04/2022: BP5 00197-00174.01.00/22) e CNPq-PQ2 (Bolsa 306008/2022-0). FUNCAP (Bolsas#: ITR-0214-00060.01.00/23, UNI-0210-00337.01.00/23, FPD-0213-00088.01.00/23). Agradecemos ao CNPq pelo apoio concedido ao projeto PDJ 2023 - Chamada CNPq nº 32/2023 - Pós-Doutorado Júnior, processo 172358/2023-0.

Referências

Almawla, S.O.G., Dali, L., Ragheb, Y.M., Edan, A.I., Ahmed, M.M., Abdulkareem, A.H., Waheeb, A.I., 2024. Antibacterial and antibiofilm activity of cinnamic acid against Multidrug-resistant bacteria isolated from Ramadi Teaching hospitals, Iraq. J. Appl. Nat. Sci. 16, 356–363. https://doi.org/10.31018/jans.v16i1.5115

Alves Borges Leal, A.L., Teixeira da Silva, P., Nunes da Rocha, M., Marinho, E.M., Marinho, E.S., Marinho, M.M., Bandeira, P.N., Sampaio Nogueira, C.E., Barreto, H.M., Rodrigues Teixeira, A.M., Silva dos Santos, H., 2021. Potentiating activity of Norfloxacin by

synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. Microb. Pathog. 155, 104894. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104894

ALVES, M.J., FERREIRA, S.C.F.R., FROUFE, H.J.., ABREU, R.M.V., MARTINS, A., PINTADO, M., 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and *Docking* studies. J. Appl. Microbiol. 115, 346–357.

Bateman, A., 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 47, D506–D515. https://doi.org/10.1093/nar/gky1049

Brawley, D.N., Sauer, D.B., Li, J., Zheng, X., Koide, A., Jedhe, G.S., Suwatthee, T., Song, J., Liu, Z., Arora, P.S., Koide, S., Torres, V.J., Wang, D.-N., Traaseth, N.J., 2022. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. Nat. Chem. Biol. 18, 706–712. https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9

Chakansin, C., Yostaworakul, J., Warin, C., Kulthong, K., Boonrungsiman, S., 2022. Resazurin rapid screening for antibacterial activities of organic and inorganic nanoparticles: Potential, limitations and precautions. Anal. Biochem. 637, 114449. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114449

Chen, P., Xu, Z., Wang, X., He, J., Yang, J., Wang, J., Chattipakorn, N., Wu, D., Tang, Q., Liang, G., Chen, T., 2023. Discovery of new cinnamic derivatives as anti-inflammatory agents for treating acute lung injury in mice. Arch. Pharm. (Weinheim). 356. https://doi.org/10.1002/ardp.202200191

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira, J.P., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. Chemotherapy 54, 328–330. https://doi.org/10.1159/000151267

Couto, I., Costa, S.S., Viveiros, M., Martins, M., Amaral, L., 2008. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. J. Antimicrob. Chemother. 62, 504–513. https://doi.org/10.1093/jac/dkn217

da Rocha, M.N., da Fonseca, A.M., Dantas, A.N.M., dos Santos, H.S., Marinho, E.S., Marinho, G.S., 2024. *In silico* Study in MPO and Molecular *Docking* of the Synthetic Drynaran Analogues Against the Chronic Tinnitus: Modulation of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor. Mol. Biotechnol. 66, 254–269. https://doi.org/10.1007/s12033-023-00748-5

Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., Blair, J.M.A., 2023. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. Nat. Rev. Microbiol. 21, 280–295. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y

dos Santos, J.F.S., Tintino, S.R., de Freitas, T.S., Campina, F.F., Irwin, I.R., Siqueira-Júnior, J.P., Coutinho, H.D.M., Cunha, F.A.B., 2018. In vitro e *In silico* evaluation of the inhibition of *Staphylococcus aureus* efflux pumps by caffeic and gallic acid. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 57, 22–28. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.03.001

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., Luisi, B.F., 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nat. Rev. Microbiol. 16, 523–539. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6

Du, Q., Arteca, G.A., 1996. Modeling lipophilicity from the distribution of electrostatic potential on a molecular surface. J. Comput. Aided. Mol. Des. 10, 133–144. https://doi.org/10.1007/BF00402821

Durães, F., Pinto, M., Sousa, E., 2019. Medicinal Chemistry Updates on Bacterial Efflux Pump Modulators. Curr. Med. Chem. 25, 6030–6069. https://doi.org/10.2174/0929867325666180209142612

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F., Forli, S., 2021. AutoDock Vina 1.2.0: New *Docking* Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. J. Chem. Inf. Model. 61, 3891–3898. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203

Feng, L.S., Cheng, J.B., Su, W.Q., Li, H.Z., Xiao, T., Chen, D.A., Zhang, Z.L., 2022. Cinnamic acid hybrids as anticancer agents: A mini-review. Arch. Pharm. (Weinheim). 355, 1–8. https://doi.org/10.1002/ardp.202200052

Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Veitch, N.C., Gray, A.I., 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. Phytochemistry 62, 83–87. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00446-6

Hassanzadeh, S., ganjloo, S., Pourmand, M.R., Mashhadi, R., Ghazvini, K., 2020. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. Microb. Pathog. 139, 103850. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103850

Hughes, J.D., Blagg, J., Price, D.A., Bailey, S., DeCrescenzo, G.A., Devraj, R. V., Ellsworth, E., Fobian, Y.M., Gibbs, M.E., Gilles, R.W., Greene, N., Huang, E., Krieger-Burke, T., Loesel, J., Wager, T., Whiteley, L., Zhang, Y., 2008. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 4872–4875. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.071

Hussein, A.A., Rodríguez, B., 2000. Isopimarane Diterpenoids from Lycopus europaeus. J. Nat. Prod. 63, 419–421. https://doi.org/10.1021/np990519c

Imberty, A., Hardman, K.D., Carver, J.P., Perez, S., 1991. Molecular modelling of protein-

carbohydrate interactions. *Docking* of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. Glycobiology 1, 631–642. https://doi.org/10.1093/glycob/1.6.631

Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.-C.J., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L., 1996. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. J. Med. Chem. 39, 3107–3113. https://doi.org/10.1021/jm9509410

Jiang, D., Zhao, Y., Wang, X., Fan, J., Heng, J., Liu, X., Feng, W., Kang, X., Huang, B., Liu, J., Zhang, X.C., 2013. Structure of the YajR transporter suggests a transport mechanism based on the conserved motif A. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 14664–14669. https://doi.org/10.1073/pnas.1308127110

Johnson, M.B., Criss, A.K., 2013. Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells. J. Vis. Exp. https://doi.org/10.3791/50729

Johnson, T.W., Dress, K.R., Edwards, M., 2009. Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 5560–5564. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.045

Kaatz, G.W., Moudgal, V. V., Seo, S.M., Kristiansen, J.E., 2003. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 719–726. https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.719-726.2003

Kimishima, A., Honsho, M., Terai, J., Wasuwanich, P., Honma, S., Matsui, H., Hanaki, H., Asami, Y., 2024. Efflux pump inhibitor, phenylalanine-arginine beta-naphthylamide analog potentiates the activity of 5-O-mycaminosyltylonolide for multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antibiot. (Tokyo). 77, 331–333. https://doi.org/10.1038/s41429-024-00713-7

Kong, R., Kang, O.-H., Seo, Y.-S., Mun, S.-H., Zhou, T., Shin, D.-W., Kwon, D.-Y., 2016. The inhibition effect of Chlorpromazine against the β-lactam resistance of MRSA. Asian Pac. J. Trop. Med. 9, 542–546. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.04.008

Korošec, B., Sova, M., Turk, S., Kraševec, N., Novak, M., Lah, L., Stojan, J., Podobnik, B., Berne, S., Zupanec, N., Bunc, M., Gobec, S., Komel, R., 2014. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). J. Appl. Microbiol. 116, 955–966. https://doi.org/10.1111/jam.12417

Kumar, N., Goel, N., 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. Biotechnol. Reports 24, e00370.

https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370

Lekshmi, M., Ammini, P., Adjei, J., Sanford, L.M., Shrestha, U., Kumar, S., Varela, M.F., 2018. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. AIMS Microbiol. 4, 1–18. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.1

Li, T., Wang, Z., Guo, J., de la Fuente-Nunez, C., Wang, J., Han, B., Tao, H., Liu, J., Wang, X., 2023. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. Sci. Total Environ. 860, 160461. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160461

Macêdo, N.S., de Sousa Silveira, Z., da Silva Sousa, Â.E., Menezes Dantas, D., Bispo Monteiro, A.L., Silva dos Santos, H., Bezerra da Cunha, F.A., 2023. Floral Visitation, Phytochemical and Biological Activities of Bioproducts from *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A Review. Chem. Biodivers. 20. https://doi.org/10.1002/cbdv.202301451

Marinho, E.M., Batista de Andrade Neto, J., Silva, J., Rocha da Silva, C., Cavalcanti, B.C., Marinho, E.S., Nobre Júnior, H.V., 2020. Virtual screening based on molecular *Docking* of possible inhibitors of Covid-19 main protease. Microb. Pathog. 148, 104365. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104365

Martins, M., Couto, I., Viveiros, M., Amaral, L., 2010. Identification of Efflux-Mediated Multi-drug Resistance in Bacterial Clinical Isolates by Two Simple Methods. pp. 143–157. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-279-7_11

McAleese, F., Petersen, P., Ruzin, A., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Bradford, P.A., 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 1865–1871. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1865-1871.2005

McKenzie, K., Maclean, M., Grant, M.H., Ramakrishnan, P., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., 2016. The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. Microbiology 162, 1680–1688. https://doi.org/10.1099/mic.0.000350

Medeiros Barreto, H., Cerqueira Fontinele, F., Pereira de Oliveira, A., Arcanjo, D.D.R., Cavalcanti dos Santos, B.H., de Abreu, A.P.L., Douglas Melo Coutinho, H., Alves Carvalho da Silva, R., Oliveira de Sousa, T., Freire de Medeiros, M. das G., Lopes Citó, A.M. das G., Dantas Lopes, J.A., 2014. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by Lippia origanoides H.B.K. in Methicillin Resistant

Staphylococcus aureus. Biomed Res. Int. 2014, 1–7. https://doi.org/10.1155/2014/305610

Morais Oliveira-Tintino, C.D., da Silva, F.E.F., Santiago, G.M.P., das C. L. Pinto, F., Pessoa, O.D.L., da Fonseca, A.M., Paulo, C.L.R., dos Santos, H.S., Marinho, M.M., dos Santos, J.L., Moura, T.F., Freitas, P.R., de Araújo, A.C.J., de Almeida, R.S., Tintino, S.R., Coutinho, H.D.M., 2025. Molecular *Docking* and Antibacterial Activity of Campesterol Derivatives Against *Staphylococcus aureus* , Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa Multiresistant Strains. Chem. Biodivers. 22. https://doi.org/10.1002/cbdv.202401073

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated *Docking* with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. 30, 2785–2791. https://doi.org/10.1002/jcc.21256

Njoku, D.I., Guo, Q., Dai, W., Chen, J.L., Mao, G., Sun, Q., Sun, H., Peng, Y.-K., 2023. The multipurpose application of resazurin in micro-analytical techniques: Trends from the microbial, catalysis and single molecule detection assays. TrAC Trends Anal. Chem. 167, 117288. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117288

Nouni, C., Theodosis-Nobelos, P., Rekka, E.A., 2023. Antioxidant and Hypolipidemic Activities of Cinnamic Acid Derivatives. Molecules 28, 1–12. https://doi.org/10.3390/molecules28186732

Oliveira-Tintino, C.D. de M., Santana, J.E.G., Alencar, G.G., Siqueira, G.M., Gonçalves, S.A., Tintino, S.R., Menezes, I.R.A. de, Rodrigues, J.P.V., Gonçalves, V.B.P., Nicolete, R., Ribeiro-Filho, J., da Silva, T.G., Coutinho, H.D.M., 2023. Valencene, Nootkatone and Their Liposomal Nanoformulations as Potential Inhibitors of NorA, Tet(K), MsrA, and MepA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus* Strains. Pharmaceutics 15, 2400. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102400

Oliveira, R.C., Bandeira, P.N., Lemos, T.L.G., dos Santos, H.S., Scherf, J.R., Rocha, J.E., Pereira, R.L.S., Freitas, T.S., Freitas, P.R., Pereira-Junior, F.N., Marinho, M.M., Marinho, E.M., Marinho, E.S., Nogueira, C.E.S., Coutinho, H.D.M., Teixeira, A.M.R., 2022. *In silico* and in vitro evaluation of efflux pumps inhibition of α,β-amyrin. J. Biomol. Struct. Dyn. 40, 12785–12799. https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1976277

Pal, S., Misra, A., Banerjee, S., Dam, B., 2020. Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples. J. King Saud Univ. - Sci. 32, 939–945. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.06.002

Pettersson, M., Hou, X., Kuhn, M., Wager, T.T., Kauffman, G.W., Verhoest, P.R., 2016. Quantitative Assessment of the Impact of Fluorine Substitution on P-Glycoprotein (P-gp) Mediated Efflux, Permeability, Lipophilicity, and Metabolic Stability. J. Med. Chem. 59, 5284–5296. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00027

Pinheiro, P., Santiago, G., Da Silva, F., De Araujo, A., De Oliveira, C., Freitas, P., Rocha, J., De Araujo Neto, J., Da Silva, M., Tintino, S., De Menezes, I., Coutinho, H., Da Costa, J., 2021. Antibacterial activity and inhibition against *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by ferulic acid and its esterified derivatives. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 11, 405–413. https://doi.org/10.4103/2221-1691.321130

Pires, D.E. V., Kaminskas, L.M., Ascher, D.B., 2018. Prediction and Optimization of Pharmacokinetic and Toxicity Properties of the Ligand. pp. 271–284. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_14

Rácz, A., Vincze, A., Volk, B., Balogh, G.T., 2023. Extending the limitations in the prediction of PAMPA permeability with machine learning algorithms. Eur. J. Pharm. Sci. 188, 106514. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106514

Radchenko, E. V., Dyabina, A.S., Palyulin, V.A., Zefirov, N.S., 2016. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds. Russ. Chem. Bull. 65, 576–580. https://doi.org/10.1007/s11172-016-1340-0

Ranaweera, K.H., Grainger, M.N.C., French, A.D., Mucalo, M.R., 2023. Construction and demolition waste repurposed for heavy metal ion removal from wastewater: a review of current approaches. Int. J. Environ. Sci. Technol. 20, 9393–9422. https://doi.org/10.1007/s13762-023-05029-x

Remm, S., Earp, J.C., Dick, T., Dartois, V., Seeger, M.A., 2022. Critical discussion on drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol. Rev. 46. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab050

Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., Söding, J., 2012. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. Nat. Methods 9, 173–175. https://doi.org/10.1038/nmeth.1818

Rocha, J.E., de Freitas, T.S., da Cunha Xavier, J., Pereira, R.L.S., Junior, F.N.P., Nogueira, C.E.S., Marinho, M.M., Bandeira, P.N., de Oliveira, M.R., Marinho, E.S., Teixeira, A.M.R., dos Santos, H.S., Coutinho, H.D.M., 2021. Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular *Docking* of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. Biomed. Pharmacother.

140, 111768. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111768

Rodrigues, M.P., Tomaz, D.C., Ângelo de Souza, L., Onofre, T.S., Aquiles de Menezes, W., Almeida-Silva, J., Suarez-Fontes, A.M., Rogéria de Almeida, M., Manoel da Silva, A., Bressan, G.C., Vannier-Santos, M.A., Rangel Fietto, J.L., Teixeira, R.R., 2019. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. Eur. J. Med. Chem. 183. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111688

Santos, E.L., Freitas, P.R., Araújo, A.C.J., Almeida, R.S., Tintino, S.R., Paulo, C.L.R., Ribeiro-Filho, J., Silva, A.C.A., Silva, L.E., Amaral, W. do, Deschamps, C., Junior, J.P.S., Filho, J.M.B., de Sousa, G.R., Coutinho, H.D.M., 2021. Phytochemical characterization and antibiotic potentiating effects of the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) and beta-caryophyllene. South African J. Bot. 143, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.07.046

Schaenzer, A.J., Wright, G.D., 2020. Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. Trends Mol. Med. 26, 768–782. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.001

Sharma, A., Gupta, V.K., Pathania, R., 2019. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens. Indian J. Med. Res. 149, 129–145. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17

Shityakov, S., Foerster, C., 2014. *In silico* predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. Adv. Appl. Bioinforma. Chem. 23. https://doi.org/10.2147/AABC.S63749

Silva, J., Esmeraldo Rocha, J., da Cunha Xavier, J., Sampaio de Freitas, T., Douglas Melo Coutinho, H., Nogueira Bandeira, P., Rodrigues de Oliveira, M., Nunes da Rocha, M., Machado Marinho, E., de Kassio Vieira Monteiro, N., Ribeiro, L.R., Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes, R., Machado Marinho, M., Magno Rodrigues Teixeira, A., Silva dos Santos, H., Silva Marinho, E., 2022. Antibacterial and antibiotic modifying activity of chalcone (2E)-1-(4′-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps: In vitro and *In silico* approaches. Microb. Pathog. 169, 105664. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105664

Silva, J.T. da C., Bezerra, J.J.L., Moura, T.F., Cruz, R.P., Oliveira, Maraiza Gregorio Costa, A.R., Rodrigues, F.C., Arthur de Oliveira Borges, J., Sousa, T.R.R. de, Morais-Braga, M.F.B., Coutinho, H.D.M., Almeida-Bezerra, J.W., 2024. Phytochemical analysis and evaluation of the antibacterial and antibiotic potentiation activities of the aqueous extract of *Cordia oncocalyx* Allemão (Boraginaceae). Pharm. Sci. Adv. 2, 100042.

https://doi.org/10.1016/j.pscia.2024.100042

Singh, K., Coopoosamy, R.M., Gumede, N.J., Sabiu, S., 2022. Computational Insights and *In Vitro* Validation of Antibacterial Potential of Shikimate Pathway-Derived Phenolic Acids as NorA Efflux Pump Inhibitors. Molecules 27. https://doi.org/10.3390/molecules27082601

Siqueira, M.M.R., Freire, P. de T.C., Cruz, B.G., de Freitas, T.S., Bandeira, P.N., Silva dos Santos, H., Nogueira, C.E.S., Teixeira, A.M.R., Pereira, R.L.S., Xavier, J. da C., Campina, F.F., dos Santos Barbosa, C.R., Neto, J.B. de A., da Silva, M.M.C., Siqueira-Júnior, J.P., Douglas Melo Coutinho, H., 2021. Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. Eur. J. Pharm. Sci. 158, 105695. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105695

Stephen, J., Salam, F., Lekshmi, M., Kumar, S.H., Varela, M.F., 2023. The Major Facilitator Superfamily and Antimicrobial Resistance Efflux Pumps of the ESKAPEE Pathogen *Staphylococcus aureus*. Antibiotics 12. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020343

Sun, H., Nguyen, K., Kerns, E., Yan, Z., Yu, K.R., Shah, P., Jadhav, A., Xu, X., 2017. Highly predictive and interpretable models for PAMPA permeability. Bioorg. Med. Chem. 25, 1266–1276. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.049

Swanson, K., Walther, P., Leitz, J., Mukherjee, S., Wu, J.C., Shivnaraine, R. V, Zou, J., 2024. ADMET-AI: a machine learning ADMET platform for evaluation of large-scale chemical libraries. Bioinformatics 40. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btae416

Teixeira, C., Ventura, C., Gomes, J.R.B., Gomes, P., Martins, F., 2020. Cinnamic derivatives as antitubercular agents: Characterization by quantitative structure–activity relationship studies. Molecules 25. https://doi.org/10.3390/molecules25030456

Ubukata, K., Itoh-Yamashita, N., Konno, M., 1989. Cloning and expression of the norA gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 1535–1539. https://doi.org/10.1128/AAC.33.9.1535

Uddin, T.M., Chakraborty, A.J., Khusro, A., Zidan, B.R.M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M.K.H., Gajdács, M., Sahibzada, M.U.K., Hossain, M.J., Koirala, N., 2021. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. J. Infect. Public Health 14, 1750–1766. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020

Wager, T.T., Hou, X., Verhoest, P.R., Villalobos, A., 2016. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. ACS Chem. Neurosci. 7, 767–775. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00029

Wager, T.T., Hou, X., Verhoest, P.R., Villalobos, A., 2010. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. ACS Chem. Neurosci. 1, 435–449. https://doi.org/10.1021/cn100008c

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. 46, W296–W303. https://doi.org/10.1093/nar/gky427

Whittle, E.E., Legood, S.W., Alav, I., Dulyayangkul, P., Overton, T.W., Blair, J.M.A., 2019. Flow Cytometric Analysis of Efflux by Dye Accumulation. Front. Microbiol. 10, 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02319

Whittle, E.E., Orababa, O., Osgerby, A., Siasat, P., Element, S.J., Blair, J.M.A., Overton, T.W., 2024. Efflux pumps mediate changes to fundamental bacterial physiology via membrane potential. MBio 15. https://doi.org/10.1128/mbio.02370-24

Wilson, D.N., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., O'Neill, A.J., 2020. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. Nat. Rev. Microbiol. 18, 637–648. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z

Yan, J., Zhang, G., Pan, J., Wang, Y., 2014. α-Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular *Docking* . Int. J. Biol. Macromol. 64, 213–223. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.007

Yilmaz, S., Sova, M., Ergün, S., 2018. Antimicrobial activity of *trans*-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. J. Appl. Microbiol. 125, 1714–1727. https://doi.org/10.1111/jam.14097

Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., Konno, M., 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. J. Bacteriol. 172, 6942–6949. https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6942-6949.1990

Yu, K., Geng, X., Chen, M., Zhang, J., Wang, B., Ilic, K., Tong, W., 2014. High Daily Dose and Being a Substrate of Cytochrome P450 Enzymes Are Two Important Predictors of Drug-Induced Liver Injury. Drug Metab. Dispos. 42, 744–750. https://doi.org/10.1124/dmd.113.056267

Yuen, H.L., Chan, S.Y., Ding, Y.E., Lim, S., Tan, G.C., Kho, C.L., 2023. Development of a Novel Antibacterial Peptide, PAM-5, via Combination of Phage Display Selection and Computer-Assisted Modification. Biomolecules 13, 466.

https://doi.org/10.3390/biom13030466

Yusuf, D., Davis, A.M., Kleywegt, G.J., Schmitt, S., 2008. An Alternative Method for the Evaluation of *Docking* Performance: RSR vs RMSD. J. Chem. Inf. Model. 48, 1411–1422. https://doi.org/10.1021/ci800084x

Zhang, Y., Chowdhury, S., Rodrigues, J. V, Shakhnovich, E., 2021. Development of antibacterial compounds that constrain evolutionary pathways to resistance. Elife 10. https://doi.org/10.7554/eLife.64518

Zurnacı, M., Şenturan, M., Şener, N., Gür, M., Altınöz, E., Şener, İ., Altuner, E.M., 2021. Studies on Antimicrobial, Antibiofilm, Efflux Pump Inhibiting, and ADMET Properties of Newly Synthesized 1,3,4-Thiadiazole Derivatives. ChemistrySelect 6, 12571–12581. https://doi.org/10.1002/slct.202103214

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Este estudo investigou os perfis químicos e atividades biológicas dos extratos etanólicos dos potes de mel (EEHPTa) e pólen (EEPPTa) de *Tetragonisca angustula*. A análise por CLAE-Q-TOF-MS/MS revelou a presença de 11 compostos no EEHPTa e 9 no EEPPTa, incluindo cirsimaritina, 3′-prenilnaringenina, xantohumol, lespedezaflavanona B e ácido 19α-hidroxi-ursólico em ambos os extratos. A quantificação por CLAE/DAD demonstrou concentrações específicas de compostos, destacando a naringenina e a apigenina no EEHPTa e o ácido *trans*-cinâmico e a apigenina no EEPPTa.

Os extratos apresentaram atividade antibacteriana, com o EEHPTa e o EEPPTa exibindo eficácia contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O EEPPTa mostrou maior potencialização de antibióticos contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*, enquanto o EEHPTa foi mais eficaz contra *P. aeruginosa*. Ambos os extratos demonstraram capacidade de reduzir a concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos em ensaios de associação, sugerindo uma ação sinérgica.

A avaliação antifúngica revelou que o EEHPTa foi mais eficaz do que o EEPPTa contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. A combinação de ambos os extratos com fluconazol potencializou sua ação contra *C. albicans*, mas não apresentou o mesmo efeito para *C. tropicalis*. Além disso, o EEHPTa demonstrou maior redução na viabilidade celular em comparação com o EEPPTa.

Neste estudo, também foi avaliada a atividade antibacteriana e inibidora de efluxo do ácido *trans*-cinâmico, um dos compostos mais frequentemente encontrados nos bioprodutos de *Tetragonisca angustula*, conforme apontado em estudos da revisão de literatura. O ácido *trans*-cinâmico destacou-se como um inibidor da bomba de efluxo NorA em *S. aureus*, reduzindo a CIM do antibiótico norfloxacina e do brometo de etídio, marcador da atividade de proteínas de efluxo utilizado nos ensaios de inibição desse mecanismo. Ensaios de acúmulo intracelular de brometo de etídio e de permeabilidade de membrana utilizando o SYTOX Green confirmaram sua atuação na inibição da bomba de efluxo e no aumento da permeabilidade da membrana bacteriana. Estudos de *docking* molecular corroboraram a interação do ácido *trans*-cinâmico com a proteína NorA, mostrando alta afinidade e interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr225 e Phe303.

Adicionalmente, análises farmacocinéticas indicaram que o ácido *trans*-cinâmico possui propriedades físico-químicas adequadas, incluindo alta permeabilidade celular e baixa lipofilicidade, sugerindo boa absorção oral e biodisponibilidade. Esses resultados destacam o potencial dos extratos de *T. angustula* e do ácido *trans*-cinâmico como agentes terapêuticos e adjuvantes em tratamentos antimicrobianos.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

- Foram identificados 11 compostos no extrato etanólico dos potes de mel de *T. angustula* (EEPMTa) e 9 compostos no extrato etanólico dos potes de pólen de *T. angustula* (EEPPTa).
- Os extratos EEPMTa e EEPPTa mostraram capacidade de potencializar a atividade da norfloxacina contra *Staphylococcus aureus*, reduzindo a CIM pela metade (de 256 para 128 μg/mL).
- O EEHPTa potencializou o efeito do antibiótico gentamicina, reduzindo a CIM de 8 para 4 μg/mL, evidenciando sua capacidade de reverter a resistência ao aminoglicosídeo.
- O EEPMTa foi mais eficaz contra leveduras (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) do que o EEPPTa, apresentando valores de CI_{50} consideravelmente menores
- A combinação do ácido *trans*-cinâmico com norfloxacina potencializou a atividade antibiótica, reduzindo a CIM da norfloxacina sobre a cepa de *S. aureus* portadora da proteína de efluxo NorA.
- O ácido *trans*-cinâmico aumentou significativamente a emissão de fluorescência do BrEt, indicando maior acúmulo intracelular, o que sugere que esse composto inibe a bomba de efluxo NorA.
- As simulações de *docking* molecular mostraram que o ácido *trans*-cinâmico pode atuar como inibidor da bomba de efluxo NorA ao mostrar interações ligante-proteína em comum com o inibidor CPZ, incluindo interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr225 e Phe303.
- Os descritores farmacocinéticos mostraram que o ácido *trans*-cinâmico apresenta uma boa permeabilidade celular, em função do equilíbrio entre lipofilicidade e polaridade, favorecido pela presença de um grupo carboxilato desprotonado.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Foram realizados ensaios para avaliar a atividade antibacteriana do composto isolado ácido *trans*-cinâmico contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Escherichia coli*, além de sua atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Esses resultados serão incluídos em um quarto manuscrito.

A identificação dos compostos nos extratos etanólicos dos potes de mel e potes de pólen de *Tetragonisca angustula* foi realizada por meio de CLAE-QTOF-MS/MS. Como perspectiva para pesquisas futuras em nível de pós-doutorado, pretende-se adquirir comercialmente os compostos identificados a fim de avaliar sua atividade antibacteriana e sua capacidade de inibir mecanismos de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras de bombas de efluxo. Adicionalmente, estão previstos ensaios de PCR em tempo real para investigar a influência desses compostos sobre a expressão gênica dos genes responsáveis pela codificação das proteínas de efluxo. Também está prevista a realização de ensaios *in silico* de docagem molecular para avaliar a interação dos compostos identificados com as bombas de efluxo.

ABD JALIL, Mohd Azri; KASMURI, Abdul Razak; HADI, Hazrina. Stingless bee honey, the natural wound healer: A review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 2, p. 66–75, 2017.

ADISAKWATTANA, Sirichai. Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 163, 2017. Disponível em: https://www.mdpi.com/2072-6643/9/2/163.

AGHAMOHAMMAD, Shadi; ROHANI, Mahdi. Antibiotic resistance and the alternatives to conventional antibiotics: The role of probiotics and microbiota in combating antimicrobial resistance. **Microbiological Research**, v. 267, n. November 2022, p. 127275, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127275.

AGU, P. C. *et al.* Molecular *docking* as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2.

AHMED, Sirwan Khalid *et al.* Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. **Journal of Medicine, Surgery, and Public Health**, v. 2, n. January, p. 100081, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100081.

ALDASORO MAYA, Elda Miriam *et al.* Stingless bee keeping: Biocultural conservation and agroecological education. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 2023.

ALDULAIMI, Omar A. Pharmacognosy Reviews. **Phcog Rev**, v. 11, p. 123–127, 2017.

ALGAMMAL, Abdelazeem M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3255–3265, 2020.

ALLEN, Darren R.; MCWHINNEY, Brett C. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 40, n. 3, p. 135–146, 2019.

AMANN, Valerie; KISSMANN, Ann-kathrin; FIRACATIVE, Carolina. Biofilm-Associated Candidiasis: Pathogenesis, Prevalence, Challenges and Therapeutic Options. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 460, p. 1–34, 2025.

ANDERSON, K. E. *et al.* An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 4, p. 431–444, 2011.

Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00040-011-0194-6.

ANDREWS, Jennifer M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. S1, p. 5–16, 2001.

ARUNG, Enos Tangke *et al.* Saudi Journal of Biological Sciences Cytotoxicity effect of honey , bee pollen , and propolis from seven stingless bees in some cancer cell lines. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 7182–7189, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.017.

ASSIS, Francisco *et al.* Use of Stingless Bee Propolis and Geopropolis against Cancer — A Literature Review of Preclinical Studies. 2021.

AYOBAMI, Olaniyi *et al.* Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 11, n. 1, p. 443–451, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030196.

BANERJEE, Atanu *et al.* How fungal multidrug transporters mediate hyper resistance through DNA amplification and mutation. *Molecular Microbiology*, v. 118, n. 3, p. 3–15, 2022.

BANG, Hyun Bae *et al.* High-level production of trans-cinnamic acid by fed-batch cultivation of *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 68, n. September 2017, p. 30–36, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.026.

BANKOVA, Vassya; TRUSHEVA, Boryana; POPOVA, Milena. Propolis extraction methods: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 734–743, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426.

BARREIRAS, Diego Groto *et al.* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Agrarian Sciences Journal**, p. 1–5, 2019.

BARROS, Simone Santos Oliveira *et al.* The bee fauna (Hymenoptera, Apoidea) in Cerrado and Cerrado-Amazon Rainforest transition sites in Tocantins state, Northern Region of Brazil. **Biota Neotropica**, v. 22, n. 3, 2022.

BELAY, Wubetu Yihunie *et al.* Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, n. August, p. 1–26, 2024.

BEZERRA, Antonio Henrique et al. Antibacterial Activity and Antibiotic Potentiation of *Melipona rufiventris* Bioproducts Against Multidrug-Resistant Bacteria. **Natural Product**

Communications, v. 20, n. 6, p. 1–11, 2025b.

BEZERRA, Suieny Rodrigues et al. Phenolic Compound Profile, Antimicrobial Activity, and Adjuvant Potential of Ethanolic Extracts From Bioproducts of *Melipona quinquefasciata* (Lepeletier, 1836). **Chemistry & Biodiversity**, v. 22, p. e00134, 2025a.

BHASKAR, Baki Vijaya *et al.* Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of nora efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3237–3252, 2016.

BLAIR, Jessica M. A. *et al.* Expression of homologous RND efflux pump genes is dependent upon AcrB expression: implications for efflux and virulence inhibitor design. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 424–431, 2015. Disponível em: https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dku380.

BONAMIGO, Thaliny *et al.* Antioxidant , Cytotoxic , and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil : *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata* anthidioides. v. 2017, 2017.

BORGES, Rafael Cabral *et al.* A dataset of multi-functional ecological traits of Brazilian bees. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41597-020-0461-3.

BRAZ, Vânia Santos; MELCHIOR, Karine; MOREIRA, Cristiano Gallina. *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–9, 2020.

BURATA, Olive E. *et al.* Still rocking in the structural era: A molecular overview of the small multidrug resistance (SMR) transporter family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 10, p. 102482, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102482.

CACIQUE, Ane Patrícia *et al.* Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) g. don. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 44, p. 1–12, 2020.

CAMPBELL, Alistair John *et al.* High bee functional diversity buffers crop pollination services against Amazon deforestation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 326, p. 107777, 2022. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880921004813.

CENDRA, Maria del Mar; TORRENTS, Eduard. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. **Biotechnology Advances**, v. 49, p. 107734, 2021. Disponível em:

https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107734.

CHAMBERS, Jacob R.; CHERNY, Kathryn E.; SAUER, Karin. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* dispersed cells to antimicrobial agents is dependent on the dispersion cue and class of the antimicrobial agent used. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, p. 1–18, 2017.

CHANDRA, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 2001.

CHEN, Deborah Huiwen; FRANKEL, Gad. Enteropathogenic Escherichia coli: Unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98, 2005.

CHEUNG, Gordon Y.C.; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688.

CHIȘ, Adriana Aurelia *et al.* Microbial Resistance to Antibiotics and Effective Antibiotherapy. **Biomedicines**, v. 10, n. 5, 2022.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - CLSI. **Clinical and Laboratory Standars Institute**, v. 32, n. 2, p. 18, 2015.

COMBEY, Rofela. Microbial and Qualitative Analyses of Stingless Bee Bread using Dry Preservation Methods. **Euro J Zool Res**, v. 5, n. 1, p. 45–50, 2017. Disponível em: www.ischolarsresearchlibrary.com.

CORTOPASSI-LAURINO, Marilda *et al.* Review article Global meliponiculture : challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275–292, 2006. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006027.

COSTA, Sofia Santos *et al.* Genetic diversity of norA, coding for a main efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. JAN, p. 1–11, 2019.

COUTINHO, Henrique D.M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant Escherichia coli by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.

CZAJKA, Karolina M. *et al.* Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic Candida Species. **Cells**, v. 12, n. 22, p. 1–33, 2023.

DA CRUZ FERREIRA, Rodrigo *et al.* Essential and Potentially Toxic Elements from Brazilian Geopropolis Produced by the Stingless Bee Melipona quadrifasciata anthidioides

Using ICP OES. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 9, p. 3527–3539, 2021. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/s12011-020-02455-7.

DADGOSTAR, Porooshat. Antimicrobial resistance: implications and costs. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3903–3910, 2019.

DARBY, Elizabeth M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280–295, 2023.

DAVIS, Jennifer L.; PAPICH, Mark G. Antimicrobial Therapy. *In*: EQUINE INFECTIOUS DISEASES. [*S. l.*]: Elsevier, 2014. p. 571-584.e5. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781455708918000658.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672–1703, 2011.

DELGADO, Cesar; MEJÍA, Kember; RASMUSSEN, Claus. Management practices and honey characteristics of *Melipona eburnea* in the peruvian amazon. **Ciencia Rural**, v. 50, n. 12, p. 1–10, 2020.

DENG, Xin *et al.* Expression of multidrug resistance efflux pump gene norA Is iron responsive in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 7, p. 1753–1762, 2012.

DENNING, David W. Review Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8.

DESBOIS, Andrew P.; SMITH, Valerie J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2010.

DIGGLE, Stephen P.; WHITELEY, Marvin. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 166, n. 1, p. 30–33, 2020.

DIVAKAR, Sharma; LAMA, Misba; ASAD U., Kan. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities | Enhanced Reader. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 76, p. 1–10, 2019.

DOS SANTOS, Murilo Moreira; ISHIDA, Kelly. We need to talk about *Candida tropicalis*: Virulence factors and survival mechanisms. Medical Mycology, v. 61, n. 8, p. myad075, 2023.

DU, Dijun *et al.* Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6.

DURANTI, Sabrina *et al.* crossm Prevalence of Antibiotic Resistance Bifidobacteria. v. 83, n. 3, p. 1–14, 2017.

ELBAHNSI, Ahmad *et al.* ATP-Binding Cassette and Solute Carrier Transporters: Understanding Their Mechanisms and Drug Modulation Through Structural and Modeling Approaches. **Pharmaceuticals**, v. 17, p. 1602, 2024.

ENRIGHT, Mark C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 11, p. 7687–7692, 2002.

FAJARDO, Alicia *et al.* The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. 1–6, 2008.

FAN, Fang Mei *et al. Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 60, n. 5–6, p. 106673, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106673.

FARHAN, Mohammed Sami *et al.* Review of Virulence Factors in *Candida*. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 75–82, 2024.

FENG, Lian Shun *et al.* Cinnamic acid hybrids as anticancer agents: A mini-review. **Archiv der Pharmazie**, v. 355, n. 7, p. 1–8, 2022.

FONSECA, Victor Juno Alencar *et al.* Lectins ConA and ConM extracted from *Canavalia ensiformis* (L.) DC and *Canavalia rosea* (Sw.) DC inhibit planktonic Candida albicans and *Candida tropicalis*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, p. 1–11, 2022.

FOURNIER, Bénédicte; ARAS, Rahul; HOOPER, David C. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 3, p. 664–671, 2000.

FÜRNKRANZ, Ursula; WALOCHNIK, Julia. Nosocomial infections: Do not forget the parasites!. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–21, 2021.

GARCIA, Ítalo Rodrigues *et al.* Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. **Life Sciences**, v. 295, n. October 2021, 2022.

GARCIA-EFFRON, Guillermo. Molecular markers of antifungal resistance: potential uses in routine practice and future perspectives. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 2021.

GIANNINI, Tereza Cristina *et al.* Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–13, 2017.

GNANAMANI, Arumugam; HARIHARAN, Periasamy; PAUL-SATYASEELA, Maneesh. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, p. 1–26, 2018.

GOH, Lucky Poh Wah *et al.* A review of stingless bees' bioactivity in different parts of the world. **Journal of Medicine and Life**, v. 16, n. 1, p. 16–21, 2023.

GOULD, Ian M. *et al.* New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 2, p. 96–104, 2012.

GRACE, Delia; FETSCH, Alexandra. *Staphylococcus aureus* —A Foodborne Pathogen. *In*: *Staphylococcus aureus*. [*S. l.*]: Elsevier, 2018. p. 3–10.

GRIMSEY, Elizabeth M. *et al.* Chlorpromazine and Amitriptyline Are Substrates and Inhibitors of the AcrB Multidrug Efflux Pump. **mBio**, v. 11, n. 3, 2020. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00465-20.

HARGROVE, Tatiana Y. *et al.* Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14α-demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6728–6743, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M117.778308.

HASSAN, Karl A. *et al.* Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7–8, p. 450–454, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001.

HASSAN, Karl A. *et al.* Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 50, p. 20254–20259, 2013.

HENRIQUES, Mariana; WILLIAMS, David. Pathogenesis and virulence of candida albicans and candida glabrata. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1–3, 2020.

HUANG, Lulu *et al.* Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, 2022.

IBE, Chibuike; POHL, Carolina Henritta. Epidemiology and drug resistance among Candida pathogens in Africa: *Candida auris* could now be leading the pack. **The Lancet Microbe**, p.

10–11, 2024.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia *et al.* Hábitos De Coleta De Tetragon Isca Angustula Angustula. **Bolm. Zool. Univ. S. Paulo**, v. 8, p. 115–131, 1984.

ISIDOROV, Valery A. *et al.* Chemical composition of volatile components in the honey of some species of stingless bees. **Food Control**, v. 146, n. July 2022, 2023.

JAFFÉ, Rodolfo *et al.* Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. n. September 2018, p. 1164–1177, 2019.

JARIREMOMBE, Rodney C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance of E. coli. *In*: ESCHERICHIA COLI - OLD AND NEW INSIGHTS. [*S. l.*]: IntechOpen, 2023. Disponível em: https://www.intechopen.com/chapters/83120.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1086–1094, 1993.

KADEŘÁBKOVÁ, Nikol; MAHMOOD, Ayesha J. S.; MAVRIDOU, Despoina A. I. Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. **Antimicrobials and Resistance**, v. 2, n. 37, p. 1–9, 2024.

KATSIPOULAKI, Myrto *et al. Candida albicans* and Candida glabrata: global priority pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 2, p. 1–44, 2024.

KAVANAUGH, Logan G. *et al.* Structural and functional diversity of Resistance-Nodulation-Division (RND) efflux pump transporters with implications for antimicrobial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 3, 2024.

KEIGHLEY, Caitlin *et al. Candida tropicalis* — A systematic review to inform the W or ld Health Organization of a fungal pr ior ity pathogens list. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myae040, 2024.

KHAN, Hassan Ahmed; BAIG, Fatima Kanwal; MEHBOOB, Riffat. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019.

KLENOTIC, Philip A. *et al.* Structural and functional diversity of desmosomes. **Chem Rev**, v. 121, n. 9, p. 5378–5416, 2021.

KORNELSEN, Vanessa; KUMAR, Ayush. Update on multidrug resistance efflux pumps in Acinetobacter spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. 1–16, 2021.

KOWALSKA-KROCHMAL, Beata; DUDEK-WICHER, Ruth. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–21, 2021.

KUMAR, Ayush; SCHWEIZER, Herbert P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486–1513, 2005.

KUMAR, Vikram *et al.* Antibiotic adjuvants: synergistic tool to combat multi-drug resistant pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. December, p. 1–14, 2023.

LAMUT, Andraž *et al.* Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2460–2504, 2019.

LEE, Yunjin; ROBBINS, Nicole; COWEN, Leah E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2023.

LEE, Yunjin; ROBBINS, Nicole; COWEN, Leah E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2023.

LEONHARDT, Sara Diana; BLÜTHGEN, Nico. A Sticky Affair: Resin Collection by Bornean Stingless Bees. **Biotropica**, v. 41, n. 6, p. 730–736, 2009.

LI, Yunxiao *et al.* Understanding the mechanisms of resistance to azole antifungals in Candida species. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 7, n. 3, p. 1–16, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaf106.

LIMA, Ângela C.de O. *et al.* Hydroxycinnamic acid-spermidine amides from Tetragonisca angustula honey as anti-Neospora caninum: In vitro and in silico studies. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 98, n. 6, p. 1104–1115, 2021.

LIMA, C.O. *et al.* Ferulic acid as major antioxidant phenolic compound of the Tetragonisca angustula honey collected in Vera Cruz-Itaparica Island, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–10, 2024.

LIMA, J. S. *et al.* Insects and spiders on Acacia mangium (Fabaceae) saplings as bioindicators for the recovery of tropical degraded areas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–11, 2024.

LIMA, Ricardo; RIBEIRO, Felipe C; COLOMBO, Arnaldo L. The emerging threat antifungal- resistant Candida tropicalis in humans , animals , and environment. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 1–11, 2022.

LOCHER, Kaspar P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters.

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 364, n. 1514, p. 239–245, 2009.

LOCKHART, Shawn R.; CHOWDHARY, Anuradha; GOLD, Jeremy A.W. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 818–832, 2023.

LOPES, Alberto Jorge Oliveira *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by Scaptotrigona a ffi nis postica : in silico , in vitro , and in vivo Studies. **Antioxidants**, v. 9, n. 103, 2020.

LORRAIN, Bénédicte *et al.* Evolution of analysis of polyhenols from grapes, wines, and extracts. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1076–1100, 2013.

LU, Min. Structures of multidrug and toxic compound extrusion transporters and their mechanistic implications. **Channels**, v. 10, n. 2, p. 88–100, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2015.1106654.

LU, Zihao *et al.* Quaternary ammonia compounds in disinfectant products: evaluating the potential for promoting antibiotic resistance and disrupting wastewater treatment plant performance. **Environmental science advances**, v. 3, p. 208–226, 2024.

MACEDO, Jamile De Paiva; DIAS, Vanessa Cordeiro. Antifungal resistance: why are we losing this battle?. **Future Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 1027–1040, 2024.

MACÊDO, Nair Silva *et al.* Floral Visitation, Phytochemical and Biological Activities of Bioproducts from *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 12, 2023. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202301451.

MALMIR, Somayeh *et al.* Molecular Mechanisms of Resistance to Conventional Antibiotics in Bacteria. **International Journal of Medical Reviews**, v. 5, n. 3, p. 118–129, 2018.

MĂRGĂOAN, Rodica *et al.* Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 1–33, 2019.

MASUNGI, C. *et al.* Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. **Pharmazie**, v. 63, n. 3, p. 194–199, 2008.

MCKENZIE, Karen *et al.* The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. **Microbiology**, v. 162, n. 9, p. 1680–1688, 2016. Disponível em:

https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000350.

MENEZES, Cristiano *et al.* The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. *In*: POT-HONEY. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 153–171. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4960-7_10.

MENEZES, Debora D. *et al.* Microbial Pathogenesis Naringenin as potentiator of norfloxacin efficacy through inhibition of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus.* **Microbial Pathogenesis,** v. 203, n. 2024, 2025.

MENG, Xuan-Yu *et al.* Molecular *Docking*: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011. Disponível em: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4099&volume=7&issue=2&spage=146.

MICHENER, Charles D. The Meliponini. *In*: POT-HONEY. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 3–17. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4960-7_1.

MILLER, William R.; ARIAS, Cesar A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 598–616, 2024. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w.

MOHAMED, Mohamed Yousif Ibrahim; HABIB, Ihab. Pathogenic E. coli in the Food Chain across the Arab Countries: A Descriptive Review. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 1–18, 2023.

MOHAMMAD, Salma Malihah; MAHMUD-AB-RASHID, Nor-Khaizura; ZAWAWI, Norhasnida. Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 957, 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/957.

MORAIS-BRAGA, Maria Flaviana B. *et al.* Psidium guajava L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 200–207, 2016.

MOUSSATOVA, Anastassiia *et al.* ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1757–1771, 2008.

MULANI, Mansura S. *et al.* Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, 2019.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, 2016.

NAMI, Sanam *et al.* Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: A

comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. August 2018, p. 333–344, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.075.

NASROLLAHIAN, Sina; GRAHAM, Jay P.; HALAJI, Mehrdad. A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of E. coli. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, n. April, p. 1–28, 2024.

NATARO, James P.; KAPER, James B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NGALIMAT, Mohamad Syazwan *et al.* A Review on the Association of Bacteria with Stingless Bees. **Sains Malaysiana**, v. 49, n. 8, p. 1853–1863, 2020. Disponível em: http://www.ukm.my/jsm/pdf_files/SM-PDF-49-8-2020/8.pdf.

NISHINO, Kunihiko *et al.* Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. December, p. 1–13, 2021.

NOBLE, Suzanne M.; GIANETTI, Brittany A.; WITCHLEY, Jessica N. Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96–108, 2017.

NOGUEIRA, David Silva. Overview of Stingless Bees in Brazil (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **EntomoBrasilis**, v. 16, p. e1041, 2023.

NORDIN, Abid *et al.* Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 73, p. 91–102, 2018. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157518302953.

NOUNI, Christina; THEODOSIS-NOBELOS, Panagiotis; REKKA, Eleni A. Antioxidant and Hypolipidemic Activities of Cinnamic Acid Derivatives. **Molecules**, v. 28, n. 18, p. 1–12, 2023.

OLLERTON, Jeff. Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, p. 353–376, 2017.

PAKBIN, Babak; BRÜCK, Wolfram M.; ROSSEN, John W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/22/18/9922.

PARK, Won Sun *et al.* Benzyl Isothiocyanate Attenuates Inflammasome Activation in Pseudomonas aeruginosa LPS-Stimulated THP-1 Cells and Exerts Regulation through the MAPKs/NF-κB Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1–10, 2022.

PEDRO, Silvia Regina De Menezes. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014.

PEREIRA, Yara Faustino *et al.* Modulation of the antibiotic activity by the Mauritia flexuosa (Buriti) fixed oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other multidrug-resistant (MDR) bacterial strains. **Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 1–8, 2018.

PERRON, Quentin *et al*. Deep generative models for ligand-based de novo design applied to multi-parametric optimization. **Journal Computacional Chemistry**, p. 692–703, 2022.

PIDDOCK, Laura J V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 382–402, 2006.

PLAZA, Merichel *et al.* **Polyphenols analysis and related challenges**. Elsevier Inc., 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00006-3.

POKHAREL, Pravil; DHAKAL, Sabin; DOZOIS, Charles M. The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, 2023.

POPOVA, Milena *et al.* A Preliminary Study of Chemical Profiles of Honey , Cerumen , and Propolis of the African Stingless Bee Meliponula ferruginea. 2021.

PRISTOV, K.E.; GHANNOUM, M.A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X19301491.

PUUMALA, Emily *et al.* Advancements and challenges in antifungal therapeutic development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, 2024.

QIN, Shugang *et al.* Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–27, 2022.

QUISTGAARD, Esben M. *et al.* Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 123–132, 2016.

RAMÓN-SIERRA, Jesús *et al.* Partial characterization of ethanolic extract of Melipona beecheii propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 319–324, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.002.

RANNEH, Yazan *et al.* Honey and its nutritional and anti- inflammatory value. v. 5, p. 1–17,

2021.

RASKO, David A.; SPERANDIO, Vanessa. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117–128, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nrd3013.

RASMUSSEN, Claus. Stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) of the Indian subcontinent: Diversity, taxonomy and current status of knowledge. v. 3647, n. May, p. 401–428, 2013.

REYGAERT, Wanda C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

ROCHA, Janaína E. *et al.* ADMET study, spectroscopic characterization and effect of synthetic nitro chalcone in combination with norfloxacin, ciprofloxacin, and ethidium bromide against *Staphylococcus aureus* efflux pumps. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 163–173, 2023. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fcp.12830.

ROCHA, Vítor Moreira *et al.* Stingless bee propolis: composition, biological activities and its applications in the food industry. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 5, n. 1, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s43014-023-00146-z.

ROEMER, Terry; KRYSAN, Damian J. Unmet Clinical Needs , and New Approaches. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, p. a019703, 2014.

ROSSI, Elio *et al.* Pseudomonas aeruginosa adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 331–342, 2021. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5.

RUNGELRATH, Viktoria; DELEO, Frank R. *Staphylococcus aureus*, Antibiotic Resistance, and the Interaction with Human Neutrophils. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 34, n. 6, p. 452–470, 2021.

SABNIS, Akshay *et al.* Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. **eLife**, v. 10, p. 1–26, 2021.

SAHOO, R. N. *et al.* Review on the use of Molecular *docking* as the First Line Tool in Drug Discovery and Development. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 5, 2022. Disponível em: https://www.ijpsonline.com/articles/review-on-the-use-of-molecular-*docking*-as-the-first-line-tool-in-drug-discovery-and-development-4751.html.

SAI-UT, Samart *et al.* Optimization of extraction of phenolic compounds and antioxidants

from passion fruit and rambutan seeds using response surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, n. November, p. 100888, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100888.

SALMA, Malihah Mohammad; NOR, Khaizura Mahmud Ab Rashid; NORHASNIDA, Zawawi. Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. **Molecules**, v. 26, p. 1–29, 2021.

SANGLARD, Dominique *et al.* Susceptibilities of Candida albicans multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 10, p. 2300–2305, 1996.

SATO, Ayami *et al.* Morphological and biological characteristics of *Staphylococcus aureus* biofilm formed in the presence of plasma. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 5, p. 668–676, 2019.

SEUKEP, Armel Jackson *et al.* Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 277–290, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002.

SHANAHAN, Maggie; SPIVAK, Marla. Resin use by stingless bees: A review. **Insects**, v. 12, n. 8, 2021.

SHARMA, Aditya Kumar *et al.* Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 1–10, 2016.

SHIN, Jonghoon; PRABHAKARAN, Vasantha Srinivasan; KIM, Kwang sun. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 209–214, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.043.

SHITYAKOV, Sergey; FOERSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, p. 23, 2014. Disponível em: http://www.dovepress.com/in-silico-predictive-model-to-determine-vector-mediated-transport-prop-peer-reviewed-article-AABC.

SIASAT, Pauline Ann; BLAIR, Jessica M A. Microbial Primer: Multidrug efflux pumps. **Microbiology**, v. 169, p. 001370, 2023.

SILVA, Jacilene *et al.* Antibacterial and antibiotic modifying activity of chalcone (2E)-1-(4′-aminophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus*

carrying NorA and MepA efflux pumps: In vitro and in silico approaches. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105664, 2022. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401022002777.

SILVA, Patricia Lima Morais *et al.* Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC–MS. **Food Research International**, v. 102, n. June, p. 536–543, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.036.

SILVEIRA, Zildene de Sousa *et al.* Microbial Pathogenesis Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the NorA and TetK efflux pumps of *Staphylococcus aureus* by p - coumaric acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 200, p. 107318, 2025.

SOUSA, Janaína Maria *et al.* Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 84, p. 61–68, 2016.

SOUZA, Bruno *et al.* Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 867–875, 2006. Disponível em: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200008&lng=es&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 17 dez. 2024.

SOUZA, Carla Miquez *et al.* Chemical and microbiological characterization of "samburá" from two stingless bee species. **Journal of Apicultural Research**, v. 61, n. 1, p. 70–78, 2022.

SOVA, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749–767, 2012. Disponível em: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=12&issue=8&spage=749.

TANG, Ka Wah Kelly; MILLAR, Beverley C.; MOORE, John E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, v. 80, n. June, p. 1–11, 2023.

TANG, Patrick *et al.* BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the SARS-CoV-2 Delta variant in Qatar. **Nature Medicine**, v. 27, n. 12, p. 2136–2143, 2021.

THAKUR, Mamta; NANDA, Vikas. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 98, p. 82–106, 2020. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419310210.

THAKUR, Vaibhav; UNIYAL, Ankit; TIWARI, Vinod. A comprehensive review on

pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. **European Journal of Pharmacology**, v. 903, n. December 2020, p. 174151, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174151.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, Erubiel *et al.* The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n. 1, 2022.

TRAN, Trong D *et al.* Lessons from Exploring Chemical Space and Chemical Diversity of Propolis Components. 2020.

URBAN-CHMIEL, Renata *et al.* Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1079, 2022. Disponível em: https://www.mdpi.com/2079-6382/11/8/1079.

URBANEK, Aneta K. *et al.* The Role of Ergosterol and Sphingolipids in the Localization and Activity of Candida albicans' Multidrug Transporter Cdr1p and Plasma Membrane ATPase Pma1p. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, 2022.

VANREPPELEN, Giel; WUYTS, Jurgen; DIJCK, Patrick Van. Sources of Antifungal Drugs. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 171, p. 1–20, 2023.

VITIELLO, Antonio *et al.* Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. **Biomedicines**, v. 11, p. 1063, 2023.

WHITTLE, Emily E. *et al.* Flow Cytometric Analysis of Efflux by Dye Accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. October, p. 1–10, 2019.

WHO. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024**, 2024. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461.

WHO. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**, 2022. v. 1

WILSON, Daniel N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 35–48, 2014.

WITTMANN, D. Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee Trigona (Tetragonisca) angustula (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 16, n. 2, p. 111–114, 1985.

YANG, Shih Chun *et al.* Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 6, p. 811–825, 2017.

YILMAZ, S.; SOVA, M.; ERGÜN, S. Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates.

Journal of Applied Microbiology, v. 125, n. 6, p. 1714–1727, 2018.

YOSHIDA, H. *et al.* Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6942–6949, 1990.

ZECCONI, Alfonso; SCALI, Federico. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, n. 1–2, p. 12–22, 2013.

ZHOU, Gang *et al.* Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Microorganisms**, v. 11, p. 1690, 2023.

ZOAITER, Malak *et al.* Carbonyl Cyanide 3-Chloro Phenyl Hydrazone (CCCP) Restores the Colistin Sensitivity in Brucella intermedia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2106, 2023. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2106.

ZUZA-ALVES, Diana L.; SILVA-ROCHA, Walicyranison P.; CHAVES, Guilherme M. An update on Candida tropicalis based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–25, 2017.

ZWEDEN, Jelle S. van *et al.* Hovering guards of the stingless bee Tetragonisca angustula increase colony defensive perimeter as shown by intra- and inter-specific comparisons. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 65, n. 6, p. 1277–1282, 2011.