

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024

Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DOS POTES DE MEL DA ABELHA *Melipona Subnitida* (DUCKE, 1911)

Larissa Maria Magalhães Siebra¹, Debora de Menezes Dantas¹, Thaís Ferreira da Silva¹, Cristina Rodrigues dos Santos¹, Suieny Rodrigues Bezerra¹, Antonio Henrique Bezerra¹, Ângella Eduarda da Silva Sousa¹, Maria Arlene Pessoa da Silva¹, Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

Resumo: Este estudo avaliou a atividade antibacteriana do extrato etanólico dos potes de mel de *Melipona subnitida* (EEPMMs) contra cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, utilizando a técnica de microdiluição em caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEPMMs e sua associação com antibióticos. O EEPMMs demonstrou atividade antibacteriana direta contra as cepas padrão de *E. coli* e *S. aureus*, com CIM de 32 µg/mL e 114,04 µg/mL, respectivamente. No entanto, não apresentou eficácia contra as cepas multirresistentes de *S. aureus* 10 e *E. coli* 06, bem como contra *P. aeruginosa*, com CIM ≥ 1024 µg/mL. Nos ensaios de associação, o EEPMMs potencializou o efeito dos antibióticos gentamicina e ampicilina em *S. aureus* 10. Também houve uma leve potencialização da CIM da norfloxacin contra *P. aeruginosa* 24. No entanto, para a cepa *E. coli* 06, o EEPMMs não aumentou a eficácia dos antibióticos testados. Em conclusão, o EEPMMs apresenta propriedades antimicrobianas relevantes, sugerindo que produtos derivados de abelhas podem ser uma fonte promissora de novos compostos antibacterianos.

Palavras-chave: *Melipona subnitida*. Abelhas sem ferrão. Atividade antibacteriana. Bactérias multirresistentes.

1. Introdução

O uso excessivo e inadequado de antibióticos fortalece os mecanismos de resistência dos patógenos, tornando o combate às infecções cada vez mais difícil (TANG; MILLAR; MOORE, 2023). Diante disso, é crucial buscar por novos agentes antimicrobianos, bem como, novos compostos capazes de inibir mecanismos de resistência quando usado em combinação com medicamentos convencionais (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020).

Nesse cenário, os produtos naturais se destacam como uma alternativa promissora, pois são fontes de uma variedade de moléculas que podem ser eficazes no controle de microrganismos (DOS SANTOS *et al.*, 2023). Nesse sentido, um grupo notável de insetos que produz substâncias naturais com potencial farmacológico são as abelhas conhecidas popularmente como "abelhas sem ferrão". Essas abelhas são responsáveis pela polinização de

¹ Universidade Regional do Cariri, email: larissa.siebra@urca.br; debora.menezes@urca.br; thais.ferreira@urca.br; cristinase75@gmail.com; suieny.urca@gmail.com; henriquebezerra.urca@gmail.com; angella.eduarda@urca.br; arlene.pessoa@urca.br; cunha.urca@gmail.com

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

aproximadamente 40% a 90% das plantas nativas e cultivadas nos trópicos (SANCHES; PEREIRA; SERRÃO, 2017).

Além disso, seus produtos como mel, própolis, geoprópolis, cera e pólen, são amplamente utilizados na medicina popular e seus efeitos biológicos, têm sido comprovados em vários estudos. Dentre essas abelhas, destaca-se a espécie *Melipona subnitida*, popularmente conhecida como "Jandaíra" (DE SOUSA-FONTOURA *et al.*, 2020). Atividades biológicas como antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2013), cicatrizante, antinociceptivo (DE SOUSA-FONTOURA *et al.*, 2020), e antimicrobiana (JÚNIOR *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2015) são atribuídas aos produtos derivados dessa abelha.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico dos potes de mel produzido pela abelha sem ferrão *Melipona subnitida* contra cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

3. Metodologia

3.1 Coleta e Preparação dos Extratos

A amostra dos potes de mel de *Melipona subnitida* foi coletada em Crato, Ceará, Brasil, em maio de 2022. A amostra foi triturada e submersa em etanol 99,5° por 72 horas. Após este período a amostra foi filtrada e submetida à destilação em um rota-evaporador a vácuo, seguido pela evaporação do excesso de solvente em banho-maria. O extrato etanólico dos potes de mel de *Melipona subnitida* (EEPMMs) teve rendimento de 8,73%.

3.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana

3.2.1 Cepas bactérias e substâncias

Foram usadas cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Pseudomonas aeruginosa* 03 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). Os antibióticos utilizados no teste foram gentamicina, norfloxacin e ampicilina. O EEPMMs foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1024 µg/mL para os testes.

3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por microdiluição em caldo adaptado de CLSI, (2008). A CIM foi definida como a menor concentração em que não foi observado crescimento bacteriano (ANDREWS, 2001). Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.3 Modificação do Efeito dos Antibióticos

O EEPMMs, em concentração subinibitória (CIM/8) (COUTINHO *et al.*, 2008), foi combinado com antibióticos (gentamicina, norfloxacin e ampicilina)

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

para verificar a potencialização da atividade antibiótica contra as cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* 24, *E. coli* 06 e *S. aureus* 10. Nos testes, 150 µL de cada inóculo bacteriano suspenso em soro fisiológico, correspondente a 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ (UFC)/mL, foi adicionado juntamente com o extrato (MIC/8) e completo com BHI. Essa mistura foi transferida para placas de microdiluição de 96 poços, onde se adicionaram 100 µL de antibiótico em diluições seriadas (1:1), variando de 512 µL a 0,5 µL/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. O crescimento bacteriano foi avaliado com 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). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4. Resultados

O EEPMMs exibiu atividade antibacteriana direta contra as cepas padrão de *E. coli* e *S. aureus*, com valores de CIM de 32 µg/mL e 114,04 µg/mL, respectivamente (Tabela 1). No entanto, não demonstrou atividade antibacteriana clinicamente relevante contra as cepas padrão e multirresistentes de *P. aeruginosa*, nem contra as cepas multirresistentes de *S. aureus* 10 e *E. coli* 06, que apresentaram valores de CIM ≥ 1024 µg/mL (Tabela 1).

O estudo de dos Santos *et al.*, (2023), utilizando o extrato de geoprópolis desta mesma abelha (fração de acetato de etila), também observou uma atividade antibacteriana direta contra as cepas padrão de *S. aureus* e *E. coli*, com valores de MIC de 64 µg/mL para ambas as cepas. Contudo, os resultados deste mesmo extrato para as cepas multirresistentes de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* demonstraram uma atividade antibacteriana direta.

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas (CIM, µg/mL) dos extratos etanólicos dos Potes de mel de *Melipona subnitida* sobre cepas bacterianas.

Substâncias	PA-24	SA-10	EC-06	PA-ATCC	SA-ATCC	EC-ATCC
Potes de mel	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	32	114,04

Nos ensaios de associação, o EEPMMs potencializou o efeito dos antibióticos gentamicina e ampicilina em cepa de *S. aureus* 10, reduzindo a CIM da gentamicina de 17,95 µg/mL para 12,69 µg/mL, e da ampicilina de 71,83 µg/mL para 32 µg/mL. Na associação com a norfloxacin a EEPMMs não potencializou a CIM deste antibiótico em *S. aureus* 10 (tabela 2).

Para a cepa de *P. aeruginosa* 24, a associação com o EEPMMs também demonstrou uma leve potencialização da CIM da norfloxacin, reduzindo a CIM de 2,82 µg/mL para 2 µg/mL. Contudo, a combinação do EEPMMs com os antibióticos gentamicina e ampicilina não alterou os valores da CIM (tabela 2).

Nos ensaios com *E. coli* 06, o EEPMMs não aumentou a eficácia de nenhum dos antibióticos testados (tabela 2).

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Dados anteriores sobre a associação do extrato de geoprópolis de *M. subnitida* (fração de acetato de etila) com os antibióticos norfloxacin, gentamicina e ampicilina contra a cepa *S. aureus* corroboram os achados desta pesquisa, uma vez que essa combinação também resultou na potencialização do efeito dos antibióticos (DOS SANTOS *et al.*, 2023). No entanto, os dados de associação para as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* descritos por dos Santos *et al.*, (2023) diferem dos resultados deste estudo.

As atividades biológicas dos produtos de *M. subnitida* são frequentemente atribuídas à sua composição química, rica em compostos fenólicos, como flavonoides e fenilpropanóides. Entre os constituintes mais citados na literatura estão: naringenina, ácido gálico, isorhamnetina, éter metílico de kaempferol, éter dimetílico de quercetina, 3-O-metil-quercetina, 5-O-metil aromadendrina, 5-O-metil kaempferol, 6-O-*p*-cumaroil-*D*-galactopiranos, 7-O-metil aromadendrina (DANTAS *et al.*, 2024).

Tabela 2. Redução da CIM dos antibióticos Norfloxacin, Gentamicina e Ampicilina em cepa de *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 24

Substâncias	PA-24 µg/mL	SA-10 µg/mL	EC-06 µg/mL
Norfloxacin	2,82	256	64
Norf+EEPMMs	2	256	64
Gentamicina	8	17,95	64
Gent+EEPMMs	8	12,69	64
Ampicilina	1024	71,83	1024
Amp+sulbactam	10,07	5,65	32
Amp+EEPMMs	1024	32	1024

5. Conclusão

Dessa forma, o EEPMMs apresenta atividade antibacteriana clinicamente relevante contra as cepas padrão de *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, o EEPMMs potencializou o efeito dos antibióticos como gentamicina e ampicilina em cepa de *S. aureus* 10. Em conclusão, o EEPMMs apresenta propriedades antimicrobianas relevantes, sugerindo que produtos derivados da abelha *M. subnitida* podem ser uma fonte promissora de compostos antibacterianos.

6. Agradecimentos

FUNCAP; [BPI 04/2022 BP5-0197-00174.01.00/ 22]; CNPq [PDJ 32/2023 Junior Postdoctoral-172358/2023-0].

7. Referências

IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. suppl_1, p. 5–16, 2001.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 11th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- COUTINHO, H. D. M. *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.
- DANTAS, D. *et al.* Chemical Characterization and Biological Activities of Jandaíra Stingless Bee Products (*Melipona subnitida* , Ducke, 1911): A Brief Review. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2024.
- DE SOUSA-FONTOURA, D. M. N. *et al.* Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 367–373, 2020.
- DOS SANTOS, D. *et al.* Antibacterial and Toxic Activity of Geopropolis Extracts from *Melipona subnitida* (Ducke, 1910) (Hymenoptera: Apidae) and *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera: Apidae). **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 20, n. 11, 2023.
- ELSHIKH, M. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 1015–1019, 2016.
- FERREIRA, J. *et al.* Chemical profile and antioxidant activity of geopropolis from *Melipona subnitida* collected inside and outside the nest. **Química Nova**, [s. l.], n. January, p. 1–8, 2022.
- JÚNIOR, U. P. S. *et al.* Geopropolis gel for the adjuvant treatment of candidiasis – formulation and in vitro release assay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 278–286, 2019.
- SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Acciones farmacológicas de extractos de propóleos de abejas sin aguijón (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 50–57, 2017.
- SOUSA, D. M. N. de *et al.* Phytochemical screening, in vitro toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bees geopropolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s. l.], v. 9, p. 134–140, 2015.
- SOUZA, S. A. De *et al.* Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2013, p. 1–5, 2013.
- TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 80, 2023.