

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"

AValiação DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA CERA DA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona quinquefasciata* (LEPELETIER, 1836) FRENTE CEPAS DO GÊNERO *Candida*

André Nilton Silva Dias¹, Suieny Rodrigues Bezerra¹, Nair Silva Macêdo¹
Zildene de Sousa Silveira¹, Débora de Menezes Dantas¹, Andressa
Guilhermino dos Santos¹, Maria Alicy Neres de Oliveira¹, Maria Flaviana
Bezerra Morais Braga¹, Francisco Assis Bezerra da Cunha¹

Resumo: O uso errôneo de antifúngico contribuiu de forma relevante para a resistência fúngica. Assim, cepas como *Candida albicans* e *Candida tropicalis* são consideradas patógenos de prioridade crítica na busca por novos antimicrobianos. Com isso, surge a busca por novas estratégias, como o uso de produtos naturais, que apresentam moléculas bioativas capazes de atuar como fungicida. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico da cera da abelha *Melipona quinquefasciata* frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Para realização dos ensaios fungicidas foi avaliada a atividade intrínseca da cera e atividade modificadora do fluconazol pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados mostraram que não houve ação antimicrobiana relevante para *C. albicans* e *C. tropicalis*, não havendo valores de IC₅₀ e com CFM a 2.048 µg/mL. A associação do extrato com o fluconazol apresentou IC₅₀ para *C. tropicalis* de 289,2 µg/mL, exibindo efeito semelhante ao fluconazol utilizado sozinho. Mais estudos sobre a atividade fungicida dos produtos de *M. quinquefasciata* são necessários na descoberta de novas moléculas com potencial bioativo.

Palavras-chave: Resistência fúngica. Produtos naturais. Atividade antimicrobiana.

1. Introdução

As infecções fúngicas, nos últimos anos, tem se tornado uma preocupação de escala global na saúde, visto que o uso inadequado de fungicidas tem contribuído para o aumento da resistência à diversas classes de antifungos (Abu-Aqil; Adawi; Huleihel, 2025). Espécies de fungos patogênicos do gênero *Candida*, como *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, são relatados na literatura como fungos oportunistas, causadores de doenças em condições de disbiose podendo causar infecções invasivas sistêmicas (Atiencina-Carrera *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, é essencial o desenvolvimento de estratégias capazes de remediar a resistência fúngica e atuar como coadjuvante na potencialização dos antimicrobianos convencionais. Com isso, os produtos naturais são alvos de estudos por apresentar uma grande diversidade de moléculas bioativas com

¹ Universidade Regional do Cariri, email: andre.nilton@urca.br, suieny.urca@gmail.com, naiirmacedo@gmail.com, zildenesousa15@gmail.com, debora.menezes@urca.br, andressa.guilhermino@urca.br, alicy.neres@urca.br, flaviana.morais@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"

propriedades biológicas distintas, incluindo atividade antifúngica (Barros Cota *et al.*, 2021).

Dentre as fontes de produtos naturais, as abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, são relatadas nas pesquisas por apresentarem bioprodutos como mel, própolis, geoprópolis, cera e pólen fermentado com potencial biológico promissor, como antioxidante (Rocha *et al.*, 2023) e antimicrobiana (Isidorov *et al.*, 2022). A atividade biológica desses bioprodutos deve-se a presença de compostos químicos como os compostos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos e proteínas (dos Santos *et al.*, 2024). As classes de compostos e sua quantidade são influenciadas pelo material botânico coletado por essas abelhas durante o processo de polinização (Campos *et al.*, 2023). A abelha *Melipona quinquefasciata*, conhecida popularmente como Uruçu-do-chão, apresenta como característica de nidificação a construção de colmeias no solo (Sousa *et al.*, 2013). Seus bioprodutos como o mel, é considerado uma iguaria saborosa e bastante valorizada em feiras populares para uso alimentício, ou produção de remédios caseiros (Sousa *et al.*, 2013). No entanto, suas bioatividades ainda não foram relatadas, sendo uma das lacunas acerca da atividade biológica dos bioprodutos dessa espécie.

2. Objetivo

Avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico da cera de *Melipona quinquefasciata* (Lepeletier, 1836), frente cepas fúngicas *Candida albicans* INCQS 40006 e *Candida tropicalis* CFP 319.

3. Metodologia

3.1 Microrganismos e meio de cultura

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (CA INCQS 40006) e *Candida tropicalis* (CT CFP 319). Os meios de cultura empregados foram *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) e *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB), preparados conforme as instruções do fabricante, solubilizados em água destilada e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

3.2 Preparação de inóculos e soluções

As cepas foram cultivadas em placas contendo meio de cultura *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) a 37 °C por 24 horas. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada à escala de McFarland ($0,5 \times 10^3$ UFC). Foram feitas diluições: 100 µL do inóculo para 4900 µL de SDB (diluição 1/50) e 400 µL dessa solução para 7600 µL de SDB (diluição 1/20), seguindo o método do CLSI (2017). O extrato etanólico da cera de *M. quinquefasciata* e o fluconazol foram solubilizados em 0,5% de DMSO e completados com SDB, alcançando uma concentração matriz de 1.024 µg/mL.

3.3 Curva de viabilidade Celular e Concentração Inibitória de 50 % (IC₅₀)

A curva de viabilidade celular e a IC₅₀ foram determinadas por microdiluição em caldo. Foram adicionados 100 µL de meio de cultura em placas de 96 poços, com microdiluição de produtos e/ou fluconazol (1.024 a 2 µg/mL) e 10 µL de inóculo em cada poço. O teste foi realizado em quadruplicata, incubando as

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"

placas a 37 °C por 24 horas. As análises foram feitas em espectrofotômetro ELISA a 630 nm, e os dados permitiram calcular a IC₅₀ e construir a curva de viabilidade celular. Controles de esterilidade e de diluição dos extratos foram preparados substituindo o inóculo por solução salina.

3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima - CFM

Os ensaios para determinar a CFM foram realizados conforme (Fonseca *et al.*, 2022) para avaliar o efeito do extrato da cera na viabilidade das células de *Candida*. Foram transferidos 10 µL de cada poço das placas de curva de viabilidade (exceto controles) para placas de Petri com meio SDA, utilizando um cartão-guia. As placas foram incubadas por 24 horas e avaliadas quanto à presença de colônias fúngicas. A menor concentração sem crescimento das cepas foi considerada a CFM do extrato.

3.5 Avaliação da atividade modificadora do fluconazol

O efeito combinado do extrato da cera com fluconazol foi avaliado para verificar se o extrato potencializava a ação do fungicida. O extrato foi testado em concentração subinibitória (MC/8). As placas receberam 100 µL de uma solução com meio, produto e inóculo, e o fluconazol foi adicionado em concentrações de 1.024 a 2 µg/mL. Poços foram reservados para controle de crescimento e de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, e a leitura foi feita por espectrometria a 630 nm.

3.6 Análise estatística

Foi aplicada uma ANOVA *two-way* para comparar os valores de cada concentração de extrato, utilizando o teste *post-hoc* de Bonferroni. Os experimentos foram realizados em triplicata, e a análise estatística foi feita com o software GraphPad Prism, versão 6.01.

4. Resultados

Os resultados mostraram que não foi possível calcular a IC₅₀ para a cepa INCQS 40006 de *Candida albicans* com o extrato da cera de Uruçu-do-chão (*M. quinquefasciata*). A associação do extrato com fluconazol também não resultou em IC₅₀, mesmo em concentrações de até 1.024 µg/mL. O fluconazol isolado apresentou uma IC₅₀ de 16,46 µg/mL. Quanto à CFM, tanto o extrato isolado quanto sua associação com fluconazol tiveram uma CFM de 2.048 µg/mL, indicando que o extrato não inibiu o crescimento da cepa nem potencializou o fluconazol (Figura 1). Na literatura, não há trabalhos acerca das atividades biológicas dos produtos de *M. quinquefasciata*. No entanto, estudos com os bioprodutos de outras abelhas do gênero demonstraram potencial antifúngico promissor, como relatado no trabalho de Campos *et al.*, (2023), utilizando o extrato etanólico da própolis da abelha *M. quadrifasciata anthidioides*, apresentou CIM de 14,25 µg/mL e CFM de 18,42 µg/mL para *C. albicans* ATCC 10231; para *C. albicans* ESA 100 resistente a anfotericina B com CIM de 15,75 µg/mL e CFM de 19,58 µg/mL, e para *C. albicans* ESA 97 resistente a anfotericina B com CIM de 16,50 µg/mL e CFM de 20,75 µg/mL.

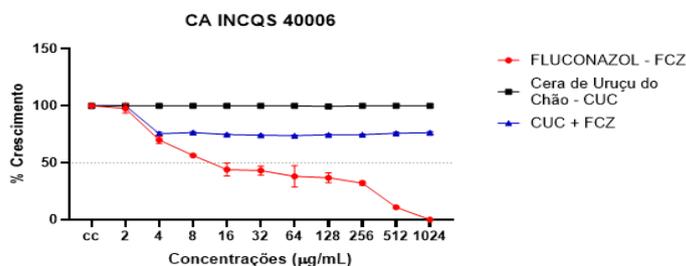
IX SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXVII Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 08 de NOVEMBRO de 2024



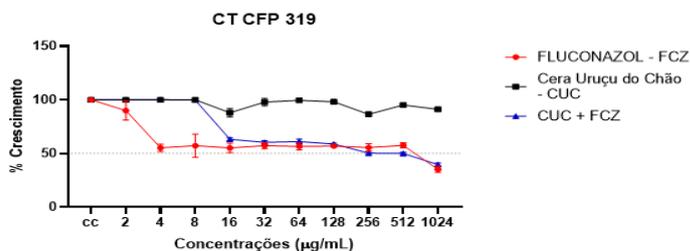
Tema: "CIÊNCIA, TECNOLOGIA E AMBIENTE: MÚLTIPLOS SABERES E FAZERES"

Figura 1 - Curva de viabilidade celular e atividade modificadora do fluconazol associado ao extrato etanólico de cera de *M. quinquemasciata* frente *C. albicans*



Para a cepa *C. tropicalis* CFP 319, não foi possível calcular a IC₅₀ com o extrato isolado. Contudo, a associação do extrato com fluconazol resultou em uma IC₅₀ de 289,2 µg/mL, indicando um efeito semelhante ao fluconazol utilizado isoladamente. Em relação à CFM, tanto o extrato quanto sua combinação com fluconazol não mostraram efeito fungicida clinicamente relevante, apresentando uma CFM de 2.048 µg/mL (figura 2). Diferindo desses resultados, o estudo de Júnior *et al.* 2019 demonstrou atividade antifúngica do extrato de geoprópolis de *M. subnitida* para *C. albicans* e *C. tropicalis* com CIM de 500 µg/mL, além de demonstrar a presença de compostos flavonoides e chalconas que estão relacionadas com a atividade antimicrobiana apresentada.

Figura 2 - Curva de viabilidade celular e atividade modificadora do fluconazol associado ao extrato etanólico de cera de *M. quinquemasciata* frente *C. tropicalis*



5. Conclusão

Conclui-se que os resultados indicaram que o extrato da cera de *M. quinquemasciata* não apresentou atividade antifúngica direta contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, não conseguindo reduzir o crescimento fúngico em 50%. A associação do extrato com fluconazol não mostrou efeito fungicida ou fungistático para *C. albicans*, impossibilitando o cálculo da IC₅₀. No entanto, para *C. tropicalis*, a combinação com fluconazol apresentou efeito semelhante com o fluconazol isoladamente, resultando em uma IC₅₀ de 289,2 µg/mL. Assim, são necessários mais estudos sobre a atividade biológica e a composição química dos bioprodutos de *M. quinquemasciata* para identificar novas moléculas bioativas com ação antimicrobiana.

6. Agradecimentos

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"

Agradecimento ao CNPq pelo apoio concedido ao projeto PDJ2023 – Chamada CNPq N° 32/2023 Pós-doutorado Júnior, processo 172358/2023-0. E FUNCAP (BPI 04/2022 N°: BP5-00197-00174.01.00/22).

7. Referências

ABU-AQIL, George; ADAWI, Samar; HULEIHEL, Mahmoud. Early and swift identification of fungal-infection using infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 325, n. April 2024, p. 125101, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125101>.

ATIENCIA-CARRERA, María Belén *et al.* Evaluation of the biofilm life cycle between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. August, p. 1–16, 2022.

BARROS COTA, B. *et al.* Antifungal activity of extracts and purified saponins from the rhizomes of *Chamaecostus cuspidatus* against *Candida* and *Trichophyton* species. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 130, n. 1, p. 61–75, 2021.

CAMPOS, Jaqueline Ferreira *et al.* Antimicrobial Activity of Propolis from the Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2023.

DOS SANTOS, Darlan *et al.* CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THREE TYPES OF AMAZONIAN *Melipona* spp. GEOPROPOLIS. **Química Nova**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 1–5, 2024. Disponível em: https://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9623&nomeArquivo=A R2023-0169.pdf.

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**, [s. l.], v. 204, n. 6, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02959-x>.

ISIDOROV, Valery A. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Argentinian Propolis of Four Species of Stingless Bees. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 22, 2022.

ROCHA, Vítor Moreira *et al.* Stingless bee propolis: composition, biological activities and its applications in the food industry. **Food Production, Processing and Nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00146-z>.

SOUSA, Janaína Maria Batista *et al.* Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 1765–1774, 2013.