

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Aledson Rosa Torres

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
PRÓPOLIS DA *Melipona quadrifasciata quadrifasciata***

Santa Maria – RS

2018

Aledson Rosa Torres

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS
DA *Melipona quadrifasciata quadrifasciata***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Santa Maria – RS

2018

Torres, Aledson Rosa

Caracterização química e avaliação das atividades antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória do própolis da *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* / Aledson Rosa Torres.- 2018.

146 p.; 30 cm

Orientador: Adair Roberto Soares dos Santos

Coorientador: Carlos Fernando de Mello

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Própolis 2. Concentração inibitória mínima 3. TRPV1, TRPA1 e ASICs 4. Vias de sinalização 5. IL-6, IL-10 e IL-17 I. Soares dos Santos, Adair Roberto II. de Mello, Carlos Fernando III. Título.


Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Aledson Rosa Torres

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS
DA *Melipona quadrifasciata quadrifasciata***

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovado em 10 de Maio de 2018:



Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)
(Presidente/Coorientador)



Maria Ester Pereira, Dr^a. (UFSM)



Rosmari Horner, Dr^a. (UFSM)



Róli Rodrigues Simões, Dr^a. (Avantis/FATENP)



Juliano Ferreira, Dr. (UFSC)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família
Em especial a minha esposa Cris e meu filho Mateus,
pelo apoio incondicional em todos os momentos.
Vocês são minha maior conquista,
sem a qual nenhuma outra seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora. A Deus por ter permitido minha caminhada até aqui, e a Nossa senhora por ter me atendido sempre que recorri a sua intersecção, tenho certeza que graças obtive através dela.

Aos meus pais e irmãs, por mesmo de longe sempre se preocuparem comigo. Amo vocês!

Às amadas Mana e Mada (Rosemari Teresinha Dal Forno e Maria Fuganti), vocês que não tendo filhos sempre me amaram como tal, e desde criança me incentivaram aos estudos.

À minha tia Iracena e padrinho Cláudio pelo carinho, amor, incentivo e apoio que sempre me deram.

Ao amigo Carlos Fernando de Mello, a quem sempre admirei. Foi um verdadeiro privilégio tê-lo como professor da graduação, orientador de mestrado e agora coorientador do doutorado.

A minha maior gratidão aos amigos e companheiros de todos os momentos: Rosane, Carol, Fernanda, Fernando e Maurício. Dedico a vocês um especial agradecimento, transcrevendo alguns versos de uma música que traduz o melhor que um amigo pode dizer a outro:

*Amigo velho
Eu te desejo sorte
Desejo tudo de bom
Tô com você até a morte*

*Amigo velho
Eu te desejo paz
Desejo tudo de bom
Acreditando cada dia mais*

*Eu sei você faria o mesmo
Se estivesse em meu lugar
Amigo, você faria o mesmo
E eu tenho alguém com quem contar*

*Das histórias vividas com você
E as risadas que ainda vamos dar
As batalhas vencidas sem saber
Que ainda tinha uma guerra pra lutar*

*Saiba que estou aqui quando sofrer
Estendendo a mão pra te ajudar*

*E eu sei você faria o mesmo,
Amigo velho, amigo velho*

(Fala Mansa: Amigo Velho)

Aos demais colegas de laboratório do LANDI, obrigado por toda ajuda, bem como pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao Sr. Luis Celso Stafaniak por fornecer as amostras de própolis e pela sua dedicação em divulgar a importância de preservar as diversas espécies de abelhas sem ferrão.

À Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia pela oportunidade de realizar essa etapa na minha formação profissional. Em especial a agradeço a secretária do PPGFarm, Zeli, pelo trabalho competente que desempenha.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela cedência dos animais e espaço para realização dos experimentos.

Ao Instituto Federal Catarinense pelo afastamento concedido para realização do doutorado.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Uma mágoa não é motivo para outra mágoa.
Uma lágrima não é motivo pra outra lágrima. Uma
dor não é motivo pra outra dor. Só o riso, o amor e
o prazer merecem revanche. O resto, mais que
perda de tempo...é perda de vida”*

Chico Xavier

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*

AUTOR: Aledson Rosa Torres

ORIENTADOR: Adair Roberto Soares dos Santos

A procura por produtos naturais com aplicação biológica tornou-se de grande interesse da comunidade científica, e não diferentemente, ocorreu com os produtos produzidos pelas abelhas: mel, própolis, cera e pólen. Vários estudos tem sido desenvolvidos sobre a estrutura química e bioatividade da própolis de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Contudo, há uma variedade de mais de 300 espécies de abelhas nativas na fauna brasileira, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (meliponíneos), as quais poucos estudos têm sido realizados; portanto, pouco se conhece a respeito da composição química e atividade de seus produtos e subprodutos. Este trabalho se propôs a investigar a composição química e determinar o potencial antimicrobiano, antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico (EHP) do própolis da *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. A análise química do EHP, através de técnicas colorimétricas e cromatográficas (HPLC-DAD and UPLC-Q/TOF- MS/MS) mostrou que os mesmos são compostos por uma mistura de polifenóis, flavonoides e terpenos. O EHP apresentou atividade antioxidante dose-dependente, sendo a IC_{50} = 241 μ g/mL. A atividade antimicrobiana foi testada contra cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, meticilina resistente e *Enterococcus faecalis*) e gram negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) através do método de microdiluição em caldo. Sendo que o EHP apresentou maior atividade antimicrobiana contra as cepas gram positivas em comparação as cepas gram negativas. O EHP causou lise bacteriana tanto em *S. aureus* como em *E. coli*, indicando que esse pode ser um dos mecanismos pelo qual o EHP exerce seu efeito antimicrobiano. Além disso, a atividade hemolítica do *S. aureus* foi significativamente menor quando incubado na presença de concentrações sub-inibitórias do EHP. Camundongos tratados intragastricamente (i.g.) com EHP (300 e 1000 mg/kg) apresentaram significativa redução do comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina, em ambas as fases do teste. Enquanto que a dose de 300 mg/kg de EHP reduziu a nocicepção no teste da nocicepção induzida por bradicinina, prostagladina E_2 , histamina, forskolina, forbol-12-miristato-13-acetato, capsaicina, cinamaldeído e salina acidificada; sugerindo que o efeito antinociceptivo do EHP se dá não só por bloqueio direto dos receptores TRPV1, TRPA1 e ASIC, mas também através da inibição das vias de sinalização da PKA e PKC. O tratamento com EHP (300 mg/kg/i.g.) reduziu o edema de orelha induzido topicamente por xileno e a atividade inflamatória no teste da peritonite induzida por carragenina; onde o potencial anti-inflamatório da EHP foi estabelecido pela diminuição da migração celular, porcentagem de neutrófilos e teor de proteína no lavado peritoneal, além da diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Assim, esse conjunto de dados suporta, pelo menos em parte, o uso tradicional do extrato hidroalcoólico de própolis da *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*.

Palavras chaves: Própolis, abelhas nativas, concentração inibitória mínima, nociceptores, receptores de potencial transitórios, citocinas anti-inflamatórias.

ABSTRACT

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF THE PROPOLIS OF *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*

AUTHOR: Aledson Rosa Torres

ADVISOR:: Adair Roberto Soares dos Santos

The demand for natural products with biological application has become of great interest of the scientific community and is not different from the products produced by the bees: honey, propolis, wax and pollen. Several studies have shown the chemical composition and pharmacological properties of africanized bee propolis (*Apis mellifera*). However, there is a variety of more than 300 species of native bees in the Brazilian fauna, known as stingless bees (meliponineos), which few studies have been carried out, so little is known about the chemical composition and bioactivity of their products. This work aimed to investigate the chemical composition and determine the potential antimicrobial, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory potential of the hydroalcoholic extract (EHP) of the propolis of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. The chemical composition of the EHP was determined by colorimetric and chromatography (HPLC-DAD and UPLC-Q/TOF- MS/MS) analysis. Moreover, the UHPLC-MS analyses of *M. quadrifasciata quadrifasciata* indicated as major constituent's phenolic compounds, flavonoids and terpenes. The EHP presented antioxidant extracts presented antioxidant activity in the DPPH assay IC₅₀= 241.8 µg/mL. The bactericidal activity was higher against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, metilicina resistente e *Enterococcus faecalis*) than for gram-negative bacteria (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*). The EHP from presented MIC values lower to gram-positive bacteria than gram-negative bacteria. The EHP caused lysis of the bacterial wall and release of intracellular components in *S. aureus* and *E. coli*, suggesting that this might be one mechanism by which exerts its antibacterial effect EHP. Moreover, the hemolytic activity of *S. aureus* was significantly lower when incubated in the presence of sub-inhibitory concentrations of EHP. Mice treated by intragastric route with EHP (300 and 1000 mg/kg) showed a significant reduction in nociceptive behavior induced by intraplantar formalin injection, in both phases of the test. While EHP (300 mg / kg) was able to reduce nociception induced by bradykinin, prostaglandin E₂, histamine, forskolin, *phorbol 12-myristate 13-acetate*, capsaicin, cinnamaldehyde and acidified saline. Demonstrating that EHP to modulate the activation of nociceptors by interaction direct with the TRPV1, TRPA1 and ASIC channels and by inhibiting the PKA / PKC signaling pathways. In addition, EHP treatment (300 mg/kg/i.g.) inhibited ear edema induced topically by xylene and inflammatory activity in the carrageenan-induced peritonitis test. Where the anti-inflammatory potential of EHP was established by decreased cell migration, percentage of neutrophils and protein content at the inflammatory site, as well as the decrease of the pro-inflammatory cytokines IL-17 and IL-6 and increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Thus, this dataset supports, at least in part, the traditional use of the propolis ethanolic extract of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*.

Keywords: Propolis, stingless bees, minimum inhibitory concentration, transient receptor potential, nociceptors, anti-inflammatory cytokines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i>	28
Tabela 2 – Publicações sobre a composição química e bioatividade do própolis de abelhas nativas.....	32
Tabela 3 – Ação de alguns dos mediadores inflamatórios sobre os nociceptores.....	43
Tabela 4 – Principais citocinas pró e anti-inflamatórias: origens e principais funções.....	52
Tabela 5A– Identificação dos compostos do extrato etanólico bruto de própolis de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> : UPLC-MS/MS ESI-QTOF/análises de espectrometria de massa, no modo de ionização negativo.....	79
Tabela 5B– Identificação dos compostos do extrato etanólico bruto de própolis de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> : UPLC-MS/MS ESI-QTOF/análises de espectrometria de massa, no modo de ionização positivo.....	80
Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (em mg/mL) do EHP frente as bactérias estudadas.....	83
Tabela 7 – Efeito do EHP da <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> no teste de liberação dos constituintes celulares de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) e <i>E. coli</i> (ATCC25922), após 4 h de incubação.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fotografia de um exemplar de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>	29
Figura 2 –	Característica dos favos de cria e da entrada da colmeia da <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>	29
Figura 3 –	Representação simplificada da estimulação nociceptiva e condução do impulso nócico ao SNC.....	38
Figura 4 –	Ativação e modulação dos receptores TRPV1.....	39
Figura 5 –	Mediadores químicos que produzem sensibilização periférica de nociceptores.....	41
Figura 6 –	Tipo de fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC.....	44
Figura 7 –	Vias ascendente e descendente da dor.....	45
Figura 8 –	Eventos celulares e vasculares da inflamação.....	49
Figura 9 –	Delineamento proposto.....	59
Figura 10 –	CLAE-DAD do EHP de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>	76
Figura 11 –	Estruturas química dos constituintes do EHP de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> identificados através de CLAE-DAD.....	77
Figura 12 –	Constituintes majoritários do EHP da <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> : identificados através de UPLC-MS/MS-ESI-QTOF.....	78
Figura 13 –	Determinação da atividade antioxidante (IC ₅₀).....	82
Figura 14 –	Imagem representativa do ensaio de determinação do CIM do EHP para cepa de <i>S. aureus</i>	83
Figura 15A–	Efeito do EHP (1 CIM, 1,26 mg/mL) no crescimento do <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) em função do tempo.....	84
Figura 15B–	Efeito do EHP (1 CIM, 7,72 mg/mL) no crescimento da <i>E. coli</i> (ATCC25922) em função do tempo.....	85
Figura 16 –	Avaliação do efeito do EHP sobre a atividade hemolítica do <i>S. aureus</i> (ATCC 25923).....	87

Figura 17 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida formalina.....	88
Figura 18 – Decurso temporal do efeito antinociceptivo do EHP na fase inflamatória do teste da formalina.....	89
Figura 19 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por bradicinina.....	90
Figura 20 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por PGE ₂	91
Figura 21 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por histamina.....	92
Figura 22 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por PMA.....	93
Figura 23 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por forskolina.....	94
Figura 24 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por capsaicina.....	95
Figura 25 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por cinamaldeído.....	96
Figura 26 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por salina ácida.....	97
Figura 27 – Teste do edema de orelha induzido por xileno.....	98
Figura 28 – Efeito do EHP sobre os parâmetros celulares e quantidade de proteína na peritonite induzida por carragenina.....	100
Figura 29 – Efeito do EHP sobre a produção de interleucinas (IL10, IL17 e IL6) na peritonite induzida por carragenina.....	101
Figura 30 – Infográfico das análises do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do EHP.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato Ciclase
AMPC	Monofosfato Cíclico de Adenosina (do inglês, <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
ASIC	Canais iônicos sensíveis à ácidos (do inglês <i>Acid-Sensing Ion Channels</i>)
ATP	Adenosina Tri Fosfato
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de cérebro e coração (do inglês, Brain Heart Infusion)
BK	Bradicinina
BSA	Albumina Bovina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (do inglês <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a diodo
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (do inglês, Damage-associated molecular patterns)
cm	centímetro
°C	Graus Celsius
DPPH	Difenil-picril-hidrazila
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EPM	Erro Padrão da Média
EHP	Extrato Hidroalcoólico de Própolis
FK	Fosrcolina
g	grama
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico (do inglês <i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>)
H	Histamina
h	hora
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>)
i.g.	Intragastricamente
i.pl.	Intraplantar
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13

IL-17	Interleucina 17
kg	quilograma
LANDI	Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
MRSA	<i>Staphylococcus Aureus</i> resistente à meticilina
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
Na ⁺	íon Sódio
NAV	Receptores de canais de sódio
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
nmol	nanomol
NGF	Fator de Crescimento do Nervo (do inglês <i>Nerve Growth Factor</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, <i>damage-associated molecular pattern molecules</i>)
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal (do inglês <i>Periaqueductal Gray</i>)
PMA	13-acetato-12-meristato de forbol
pg	picograma
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostagladina I ₂
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLP	Fosfolipase
PLA ₂	Fosfolipas A ₂
Rt	Tempo de retenção
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Caldo Soja Tripticaseína (do inglês, <i>Tryptic Soy Broth</i>)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alpha (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
TRPs	Receptores de Potencial Transiente (do inglês, <i>Transient Receptor Potential</i>)
TRPV1	Receptor de Potencial Transiente Vanilóide Tipo 1 (do inglês, <i>Transient Receptor Potential subfamily Vanilloid member 1</i>)
TRPA1	Receptor de Potencial Transiente Anquirina Tipo 1 (do inglês, <i>Transient Receptor Potential subfamily Ankyrin member 1</i>)
TTXr	Receptores resistentes à tetro-dotoxina (do inglês, <i>tetrodoxin-resistant channel</i>)
UPLC	Ultra cromatografia de alta eficiência (do inglês, <i>Ultra performance liquid chromatography</i>)
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
5-HT	Serotonina
α - Alfa	
β - Beta	
γ - Gama	
Δ - Delta	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	Abelhas nativas.....	27
1.1.1	<i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i>	28
1.2	Própolis.....	31
1.3	Resistência Bacteriana.....	34
1.4	A dor.....	37
1.5	Processo inflamatório.....	47
2	JUSTIFICATIVA.....	54
3	OBJETIVOS.....	56
3.1	Objetivos geral.....	56
3.2	Objetivos específicos.....	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
4.1	Delineamento experimental.....	58
4.2	Origem e coleta do própolis.....	59
4.3	Obtenção do extrato.....	60
4.4	Animais.....	60
4.5	Drogas e reagentes.....	61
4.6	Determinação da composição química do EHP.....	62
4.6.1	Análise cromatográfica dos constituintes do EHP.....	62
4.6.1.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-AD)	62
4.6.1.2	Cromatografia UPLC-MS/MS: espectrometria de massa atômica ESI-QTOF.....	62
4.6.2	Determinação do conteúdo de fenóis totais.....	63
4.6.3	Determinação do conteúdo de flavonóides.....	64
4.7	Determinação da atividade antioxidante	64
4.8	Avaliação da atividade antimicrobiana	65
4.8.1	Cepas bacterianas.....	65
4.8.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	65
4.8.3	Avaliação do efeito do EHP sobre a curva de crescimento bacteriano: <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	66

4.8.4	Avaliação do efeito do EHP sobre a liberação do conteúdo intracelular bacteriano: <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	66
4.8.5	Avaliação do efeito do EHP sobre a atividade hemolítica do <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	67
4.9	Avaliação da atividade antinociceptiva	67
4.9.1	Nocicepção induzida por formalina.....	67
4.9.1.1	Mensuração da espessura (edema) da pata	68
4.9.1.2	Mensuração da temperatura da pata	68
4.9.2	Nocicepção induzida por bradicinina.....	69
4.9.3	Nocicepção induzida por prostaglandina E ₂	69
4.9.4	Nocicepção induzida por histamina.....	70
4.9.5	Nocicepção induzida por PMA (meristato de acetato de forbol)	70
4.9.6	Nocicepção induzida por forskolina.....	71
4.9.7	Nocicepção induzida por capsaicina.....	71
4.9.8	Nocicepção induzida por trans-cinamaldeído.....	72
4.9.9	Nocicepção induzida por salina ácida.....	72
4.10	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	73
4.10.1	Teste do edema de orelha induzido por xileno.....	73
4.10.2	Modelo da peritonite induzida por carragenina.....	73
4.10.2.1	Indução da peritonite.....	74
4.10.2.2	Contagem total e diferencial das células.....	74
4.10.2.3	Quantificação de citocinas.....	74
4.11	Análises estatística	75
5	RESULTADOS.....	76
5.1	Determinação da composição química do EHP.....	76
5.1.1	Análise cromatográfica dos constituintes do EHP.....	76
5.1.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	76
5.1.1.2	Cromatografia por UPLC-MS/MS-ESI-QTOF.....	77
5.1.2	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonoides.....	81
5.2	Determinação da atividade antioxidante.....	82
5.3	Determinação da atividade antimicrobiana	82
5.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	82
5.3.2	Efeito do EHP sobre a curva de crescimento bacteriano: <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	84

5.3.3	Efeito do EHP sobre a liberação do conteúdo intracelular bacteriano: <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	85
5.3.4	Efeito do EHP sobre a atividade hemolítica do <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	86
5.4	Determinação da atividade antinociceptiva	87
5.4.1	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por formalina.....	87
5.4.2	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por bradicinina.....	89
5.4.3	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por prostaglandina E ₂	90
5.4.4	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por histamina	92
5.4.5	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por PMA.....	93
5.4.6	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por forskolina.....	94
5.4.7	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por capsaicina.....	95
5.4.8	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por trans-cinamaldeído.....	96
5.4.9	Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por salina ácida.....	97
5.5	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	98
5.5.1	Efeito do EHP a formação de edema induzido pela aplicação tópica de xileno.....	98
5.5.2	Efeito do EHP sobre parâmetros inflamatórios na peritonite induzida por carragenina.....	99
6.	DISCUSSÃO.....	102
7.	CONCLUSÕES.....	112
	REFERÊNCIAS.....	114
	APÊNDICE A – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	127
	APÊNDICE B – TABELA ILUSTRATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS “IN VITRO”.....	131
	APÊNDICE C – TABELA ILUSTRATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS “IN VIVO” E “EX VIVO”	132
	APÊNDICE D – RESUMO ILUSTRATIVO DOS ARTIGOS.....	135
	APÊNDICE E - PRINT DA FOLHA DE APRESENTAÇÃO DO ARTIGO.....	136

ANEXO A – SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO).....	137
ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E REMESSA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (CNPQ).....	138
ANEXO C – DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE MATERIAL DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (UFSC).....	139
ANEXO D – CERTIFICADO DE SUBMISSÃO DE PROJETO A COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA-UFSC).....	140
ANEXO E – LICENÇAS PARA USO DE FIGURAS.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 ABELHAS NATIVAS

As abelhas nativas apesar de pouco conhecidas pela população, já constituíam a fauna brasileira, muito antes da introdução das espécies exóticas (européias) pelos jesuítas no Brasil (NOGUEIRA-NETO, 1997). Encontram-se descritas mais de 1600 espécies de abelhas nativas pertencentes a fauna nativa brasileira e estima-se que esse número possa chegar a 3000 espécies (SILVEIRA et al., 2002).

As abelhas nativas sem ferrão, também conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, distinguem-se das exóticas, entre outras características, por possuírem ferrão atrofiado. Porém, não são abelhas indefesas, pois possuem diferentes estratégias de defesas, que variam de acordo com a espécie em questão, o inimigo e ecossistema em que vivem, como por exemplo, depositar própolis sobre os invasores de suas colônias, morder com as mandíbulas, enroscar-se nos cabelos ou até mesmo depositar secreções alcalis sobre a pele dos intrusos (WITTER, BLOCHTEIN, 2009).

As abelhas indígenas sem ferrão são encontradas nas regiões de clima tropical e sub-tropical como nas Américas do Sul e Central, África, Sudoeste da Ásia e Austrália. No Brasil existem em torno de 300 a 400 espécies destas abelhas distribuídas em todo território nacional, embora as espécies diferem de região para região. Em Santa Catarina ocorrem naturalmente aproximadamente 35 espécies (EPAGRI, 2018). A maioria das espécies constroem seus ninhos em troncos de árvores, mourões de cerca e fendas de rochas. São as principais polinizadoras das regiões tropicais, sendo a tribo Meliponini responsável pela polinização de aproximadamente 90% das árvores nativas no Brasil, constituindo peça chave para a manutenção do ecossistema em que habitam. Nesse contexto, a degradação do meio ambiente, principalmente o desmatamento, é a maior ameaça a sua preservação, e consequentemente da flora local. São extremamente dependentes da preservação da flora nativa, necessitando de um ambiente contínuo para poder encontrar espécimes não aparentadas para se reproduzirem. Além disso, a baixa capacidade de voo da abelha rainha contribui para a não regeneração das colônias destruídas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Historicamente, tiveram seu mel, própolis e pólen utilizado pelos indígenas e populações dos cerrados e caatinga como fonte de alimento ou medicamento tradicional. Sendo que, recentemente, o interesse pela diversidade de méis e subproduto da meliponicultura, tem garantido a conservação das espécies nativas e o desenvolvimento de estratégias para sua preservação.

Entre as espécies de abelhas indígenas sem ferrão destacamos a *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, como importante produtora de mel e subprodutos, a qual tornou-se objeto do nosso estudo.

1.1.1 *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*.

A abelha indígena sem ferrão, *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) é popularmente conhecida como Mandaçaia, palavra indígena que significa vigia bonito. Pertencente a Tribo Meliponini, do gênero das Meliponas (Tabela 1), é uma abelha social brasileira, com potencial para meliponicultura e polinização.

Tabela 1 – Classificação da *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*

Classificação	
Reino: Animália	Subfamília: Apinae
Filo: Arthropoda	Tribo: Meliponini
Classe: Insecta	Gênero: Melipona
Ordem: Hymenoptera	Espécie: <i>M. quadrifasciata</i>
Família: Apidae	Subespécie: <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>

Fonte: Abelhas Brasileiras, sistemática e Identificação (SILVEIRA, MELLO, ALMEIDA, 2002), diagramação própria.

Abelha de característica robusta, com tamanho médio de 10 a 11 mm de comprimento, cabeça e tórax preto de aspecto brilhante, abdômen característico com quatro faixas amarelas contínuas, transversais ao eixo do corpo e com asas ferrugíneas (Figura 1) (SILVEIRA, MELLO, ALMEIDA, 2002).

Figura 1 – Fotografia de um exemplar de *M. quadrifasciata quadrifasciata*



Fonte: Instituto rã-bugio para conservação da biodiversidade
http://www.ra-bugio.org.br/invertebrados_abelhas.php. Acessado em 13/022018.

Constroem seus ninhos em cavidades pré-existentis (ocos de árvores e ninhos abandonados), sendo que a entrada do ninho possui raias divergentes de barro e espaço que permite a entrada de uma abelha de cada vez. Suas colônias são constituídas por 300-400 indivíduos, possuem favos de cria horizontais protegidos por invólucro construído com cerume e não possuem células reais. Os potes de alimentos são ovóides com 3 a 4 cm de altura (NOGUEIRA-NETO, 1997) (Figura 2).

Figura 2 – Característica dos favos de cria e da entrada da colmeia da
M. quadrifasciata quadrifasciata



Fonte: <http://www.meliponarioeidamandacaia.com/2011/02/mandacaia-do-sertao-melipona-mandacaia.html> e <http://meliponario-irmaosnocete.blogspot.com.br/2017/05/mandacaia.html>. Acessadas em 13/02/2018.

Suas castas são determinadas por fatores genéticos e alimentares e seu desenvolvimento compreende um período de 38 dias, 5 dias de desenvolvimento da fase embrionária (ovo), 15 dias em estágio larval e 18 dias de estágio pupal (KERR, NIELSEN, 1966; ROSSINI, 1989). Quando ameaçadas apresentam o comportamento de voar sobre as pessoas, esbarrando sobre a pele, mas raramente beliscam (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Sua incidência abrange os estados Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Bahia e Sergipe (BATALHA-FILHO et al., 2010).

1.2 PRÓPOLIS

O própolis é definido como “uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, ao qual as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração do produto final (BRASIL, 2001). Sendo o própolis “*in natura*” composto por 50% de resinas, 30% de graxas, 10% de óleos essenciais, 5 % de pólen e 5% de outros compostos orgânicos (GOMEZ-CARAVACA et al, 2006). Uma particularidade das abelhas pertencente a tribo Meliponini é produzir uma variedade de própolis denominada de geoprópolis, que consiste em uma mistura de resinas, graxas, óleos essenciais e pólen acrescido de barro (BARTH, 2006). Este produto é utilizado pelas abelhas com a finalidade de selar as colmeias, protegendo-as contra a invasão de predadores. Contribui também na manutenção da temperatura da colmeia, além de proteger contra a proliferação de fungos e bactérias (MARCUCCI, 1996; SANTOS et al., 2017). Com características e propriedades biológicas variadas, sua composição química está diretamente relacionada com a flora da região, época da colheita, com a técnica empregada para extração e com a espécie da abelha (MARCUCCI, 1995).

É importante destacar que, conceitualmente, quando refere-se ao própolis, faz-se referência ao própolis de abelhas melíferas, da espécie *Apis mellifera*. A qual, estudos científicos atribuem uma infinidade de propriedades tais como: anti-inflamatória e antimicrobiana (BOSIO et al., 2000; SILICI, KUTLUCA, 2005; DRAGO et al., 2000); antitumoral, antioxidante (BANSKOTA et al., 2000; ALDEMANN, 2005; TEIXEIRA et al., 2008), imunomodulatória (SFORCIN, 2007), hepatoprotetora (com efeito sobre a regeneração tecidual), citotóxica, entre outras (BANSKOTA et al., 2000). Várias classes de substâncias isoladas foram identificadas e quantificadas, as quais destacamos: flavonoides, entre eles a classe das flavonas preniladas e benzopirano, além de benzofenona, ésteres do ácido caféico, triterpenoides, entre outros (CHEN et al., 2003; BANSKOTA et al., 2000). Dentre esses destacam-se os flavonoides e ácidos fenólicos aos quais atribuí-se grande parte das atividades biológicas do própolis. Atualmente, a grande procura pelo própolis da *Apis mellifera* se dá em razão do Artepecilin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) o qual tem despertado interesse pelas suas propriedades antitumorais, antimicrobiana e antioxidante (PAREDES-GUZMAN et al., 2003, ENDO et al., 2018, BHARGAVA et al., 2018).

Entretanto, existem poucos estudos sobre as mais de 300 espécies de abelhas nativas brasileiras, de maneira que ainda pouco se conhece a respeito da composição e atividade de seus produtos e subprodutos. Em recente levantamento realizado no Chemical Abstract (database) foram encontradas somente 35 publicações a respeito da composição química do própolis das Meliponas (SANTOS et al., 2017).

Na Tabela 2, destacamos algumas publicações sobre composição química e a bioatividade do própolis das abelhas nativas brasileiras criadas em diferentes da federação. Contudo, a composição química e as propriedades biológicas do própolis das abelhas nativas criadas em Santa Catarina ainda carece de investigação.

Tabela 2 – Publicações sobre a composição química e bioatividade do própolis de abelhas nativas brasileiras

Espécie	Autor/Ano	Título
<i>M. orbigny</i> (Manduri do Mato Grosso)	Santos et al., 2017.	Chemical profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee <i>Melipona orbigny</i> .
<i>Scaptotrigona depillis</i> e <i>M. quadrifasciata anthiodioides</i>	Bonamigo et al., 2017.	Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: <i>Scaptotrigona depillis</i> and <i>Melipona quadrifasciata anthiodioides</i> .
<i>M. fasciculata</i> (Tiúba)	Bartolomeu et al., 2016.	Combinatorial effects of geopropolis produced by <i>Melipona fasciculata</i> Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells.
<i>M. scutellaris</i>	Ribeiro-Júnior et al, 2015.	Gastroprotective Effect of Geopropolis from <i>Melipona scutellaris</i> Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin.
<i>T. fiebrigi</i> (Jataí)	Campos et al., 2015.	Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Jataí).

<i>M. orbignyi</i> (Manduri do Mato Grosso)	Campos <i>et al.</i> , 2014.	Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from <i>Melipona orbignyi</i> (Hymenoptera, Apidae).
<i>Scaptotrigona aff. postica</i>	Farias <i>et al.</i> , 2014.	Effects of Stingless Bee Propolis on Experimental Asthma.
<i>M. fasciculata</i> (Tiúba)	Dutra <i>et al.</i> , 2014.	Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee <i>Melipona fasciculata</i> Smith.
<i>M. scutellaris</i> (Uruçu Nordestina)	da Cunha <i>et al.</i> , 2013.	Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee <i>Melipona scutellaris</i> geopropolis.
<i>M. subnitida</i> (Jandira)	de Souza <i>et al.</i> , 2013.	Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by <i>Melipona subnitida</i> (Jandaíra) Bees.
<i>Scaptotrigona sp.</i> (Guaraipo)	Martin <i>et al.</i> , 2013.	Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns.
<i>M. scutellaris</i> (Uruçu Nordestina)	Franchin <i>et al.</i> , 2012.	Diminuição da hipernocicepção inflamatória através da inibição de IL-1 β e TNF- α .
<i>M. fasciculata</i> Smith (Tiúba)	Liberio <i>et al.</i> , 2011.	Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee <i>Melipona fasciculata</i> Smith.
<i>T. angustula</i> (Jataí)	Miorin <i>et al.</i> , 2003.	Antibacterial activity of honey and propolis from <i>Apis mellifera</i> and <i>Tetragonisca angustula</i> against <i>Staphylococcus aureus</i> .

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, Acessado em 13/02/108.
(diagramação própria).

1.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Durante séculos a principal causa de morte humana foi em decorrência de infecções por microrganismos que pela natureza epidêmica foram capazes de aterrorizar comunidades e de interferir no destino de nações, promovendo profunda mudanças de hábitos e costumes. Com a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, ocorreu uma revolução no tratamento das infecções causadas por bactérias Gram positivas. Com o avanço das ciências, novas drogas contra os microrganismos foram descobertas e produzidas sinteticamente e em escala industrial, surgindo novos antimicrobianos, reduzindo assim o índice de mortes por doenças infecciosas (OLIVEIRA et al., 2011).

Por sua vez, a resistência a agentes antimicrobianos não é um fenômeno recente, no início dos anos 40 Abraam & Chain (1940) detectaram a presença de β -lactamases, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas. Posteriormente, em meados de 1950, foram registrados os primeiros surtos hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, fato consolidado na década de 1960 pelo surgimento do primeiro caso de resistência às recém descobertas penicilinas β -lactâmicas, como a meticilina. Sendo que, no final da década de 1970, as ocorrências de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) alcançaram o status de pandemia, situação agravada, em 2002 nos Estados Unidos, pelo surgimento do o primeiro caso de resistência total de *S. aureus* a vancomicina (OLIVEIRA e SILVA, 2008; COHEN e TARTASKY, 1997; ALANIS, 2005).

Vários são os mecanismos para que os microrganismos desenvolvam resistência contra as drogas, tais como: os relacionados a produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos, a formação de biofilmes, os relacionados a composição bioquímica da parede celular (conferindo impermeabilidade a determinadas substâncias), os relacionados a impenetrabilidade do antibiótico pela diminuição de receptores de membrana ou pela existência de proteínas de exportação de substâncias nocivas ao metabolismo celular, as bombas de efluxo. Apesar de a resistência bacteriana poder desenvolver-se mesmo que não haja contato prévio da bactéria com o antibiótico, através de mecanismos genéticos (resistência intrínseca, mutação ou transferência horizontal de genes resistentes) (KARAM et al., 2016; CERCEO et al. 2016; OLIVEIRA e SILVA, 2008), a exposição dos microrganismos aos agentes antimicrobianos é o principal responsável pelo desenvolvimento de

resistência antimicrobiana a drogas. O uso indiscriminado de antibióticos, seja em humanos ou em animais, aumenta a probabilidade de produção de mecanismos de resistência antimicrobiana a drogas, podendo ocorrer contra uma ou a várias drogas antibióticas, sendo descritos então como microrganismos multirresistentes (De BUS et al., 2013).

Considera-se também a contaminação do meio ambiente com os antibióticos como sendo mais uma variável deste problema de saúde pública. O solo possui muitos microorganismos não pesquisados e não cultiváveis, isto aumenta o risco de indução de resistência, representando um reservatório de novos mecanismos de indução à resistência microbiana, sendo de origem natural ou por processo antropogênico (SU, J-Q, et al., 2014). Além disso, antibióticos têm sido utilizados em grande escala nas criações animais, e quando não são totalmente metabolizadas pelo organismo animal acabam por contaminar o solo, água superficial e subterrânea, favorecendo a ocorrência da resistência de microrganismos aos agentes antibióticos (REGINATO e LEAL, 2010).

A crescente ocorrência de microrganismos resistentes às diferentes classes de antimicrobianos tem sido uma constante nas últimas décadas, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública (TANSIRICHAIIYA et al., 2018). Estimativas de 2014 afirmavam que se medidas de controle não fossem adotadas, nos padrões de crescimento que a resistência antimicrobiana se encontrava, causaria a morte de 10 milhões de pessoas, todos os anos, até 2050 (O'NEILL, 2014 apud EXNER et al., 2017). Ainda, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, a resistência antimicrobiana afeta além da área da saúde outros setores da sociedade, com impacto que vai desde o aumento dos riscos de saúde a perdas econômicas devido à redução de produtividade causada por doenças (em pessoas e animais) e custos mais elevados de tratamento (BRASIL/ANVISA, 2017).

Desta forma diversas iniciativas têm sido propostas para prevenir ou minimizar essa situação. A Organização Mundial de Saúde desenvolveu um plano de ação global sobre a resistência antimicrobiana, com o objetivo de garantir, pelo maior tempo possível, a continuidade do sucesso do tratamento e prevenção de doenças infecciosas com medicamentos eficazes, de qualidade e seguros, utilizados de forma responsável e acessível (BRASIL/ANVISA, 2017).

Estratégias de combate a resistência antimicrobiana devem incluir ações como eliminação de fontes de desenvolvimento de resistência e reservatórios para

bactérias multirresistentes seja de origem humana, hospitalar, industrial ou da agricultura. Além da diminuição da produção, prescrição e consumo de antibióticos, deve-se desenvolver políticas educacionais voltadas a população em geral e também aos profissionais de saúde. Programas estratégicos de utilização de antibióticos em medicina humana e veterinária, na odontologia, na criação de animais, e na produção e conservação de alimentos devem ser desenvolvidos e implantados (EXNER et al., 2017).

Nesse sentido, sendo este problema considerado grave e de saúde pública, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária determinou, através da Resolução Deliberativa Colegiada nº 44, de 26 de outubro de 2010 em seu Art. 2º, que a dispensação de medicamentos à base de antimicrobianos seja de venda sob prescrição, ou seja, somente poderá ser efetuada a venda destes medicamentos mediante receita de controle especial, pretendendo-se minimizar o livre acesso a essas drogas para que de forma indireta possa reduzir a resistência microbiana (BRASIL/ANVISA, 2010). E a RDC nº 20 / 2011, publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 9 / 5 / 2011, que regulamenta a venda de antibióticos obrigatoriamente com receituário controlado (BRASIL/ANVISA, 2011).

Condição de que a taxa de descoberta de novos antimicrobianos não consegue acompanhar a capacidade das bactérias em tornar-se resistentes aos antibióticos (KARAM et al., 2016), pesquisadores tem voltado, nos últimos 10 anos, a atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à nova diversidade química (CLARDY e WALSH, 2004). Nesse contexto, pesquisas com produtos naturais pode acelerar o processo de descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana, sendo extremamente importante no cenário de rápido desenvolvimento de resistência pelas bactérias aos agentes terapêuticos disponíveis.

1.4 A DOR

Conviver com a dor para alguns indivíduos é quase uma constante. O que superficialmente nos faz pensar que uma existência livre de dor seria ideal. Porém, a capacidade de perceber a dor é vital para nossa sobrevivência, sendo um componente chave da defesa natural do organismo (BURMA, et al., 2016).

A dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrito nos termos de tal dano” (IASP, 2017). Consiste portanto, em uma experiência complexa, envolvendo não somente a transdução do estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo, de forma que é influenciada por fatores fisiológicos e psicológicos (TJØLSEN, HOLE, 1997; JULIOS, BASBAUM, 2001). Diferentemente de nocicepção, termo designado para caracterizar o processo neural de codificação de estímulos nocivos (SMITH, 2017).

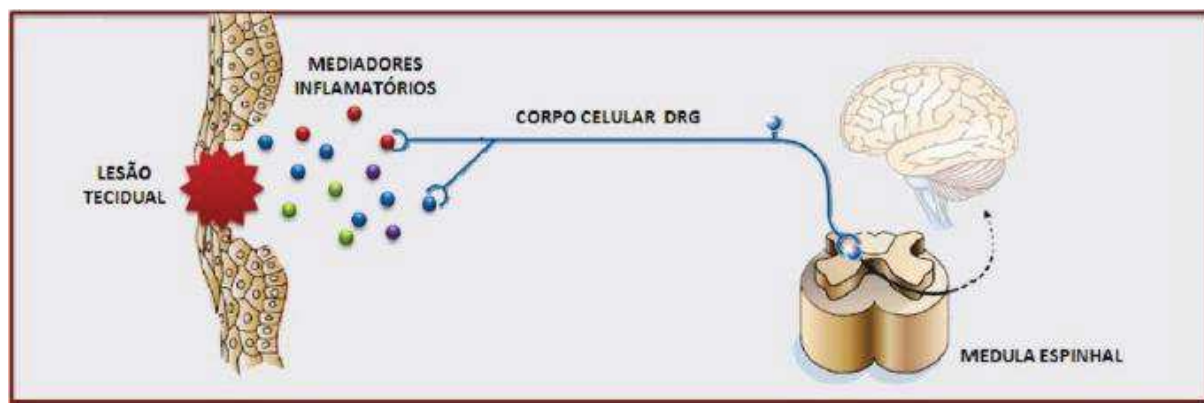
A dor crônica é um problema global de proporções epidêmicas. Estima-se que 20 % dos adultos sofrem de dor crônica, algo em torno de 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo (GOLDBERG e MCGEE, 2011). Sendo que, 50 a 65% das pessoas que são acometidas por dor crônica, encontram-se incapacitadas de exercitar-se, realizar atividades normais, como caminhar, dirigir, e até mesmo dormir, ou seja, são incapazes de manter um estilo de vida independente e com qualidade (ABDU-SAAD, 2010; SMITH et al., 2000). Nesse contexto, tanto a dor crônica como a dor aguda, infringem um alto custo social e econômico, levando a necessidade urgente da realização de estudos para melhor entender suas causas e para descobrir terapias mais eficazes (BURNA et al., 2016). A descoberta de novos alvos e desenvolvimento de melhores analgésicos enfrentam o desafio de transpor os resultados obtidos em modelos animais (pré-clínicos) em terapias de dor em seres humanos (BURNA et al., 2016).

Os fisiologistas diferem os termos dor e nocicepção, onde a palavra dor tem origem do latim: *dolore*, que significa sofrimento, enquanto que nocicepção diz respeito aos sinais que chegam ao sistema nervoso central em decorrência da ativação de receptores localizados nas terminações periféricas sensoriais dos neurônios aferentes primários, os nociceptores (FEIN, 2011). Os nociceptores são ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, desencadeando potenciais

de ação que se propagam pelas fibras aferentes de primeira ordem até o corno dorsal da medula espinal, onde os sinais nociceptivos são processados e acendem ao cérebro, pelos neurônios de segunda ordem (Figura 3).

Os mecanismos relacionados com a percepção e processamento da dor consistem: 1) Transdução, que é o processo de ativação dos nociceptores; 2) Transmissão, a propagação do impulso nervoso, gerado no nociceptor, ao sistema nervoso central; 3) Processo de supressão da dor ativado pelas próprias vias nociceptivas (VANDERMEULEN, 2000).

Figura 3 – Representação simplificada da estimulação nociceptiva e condução do impulso nócico ao SNC.



Após uma lesão tecidual ocorre liberação de mediadores químicos que ativam nociceptores e esses interagem com as fibras do tipo C e A δ . Essas fibras entram na medula espinal pelo corno dorsal, onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem que ascendem para o SNC.

Fonte: Marcon, 2009, adaptado de: Julius & Basbaum, 2001.

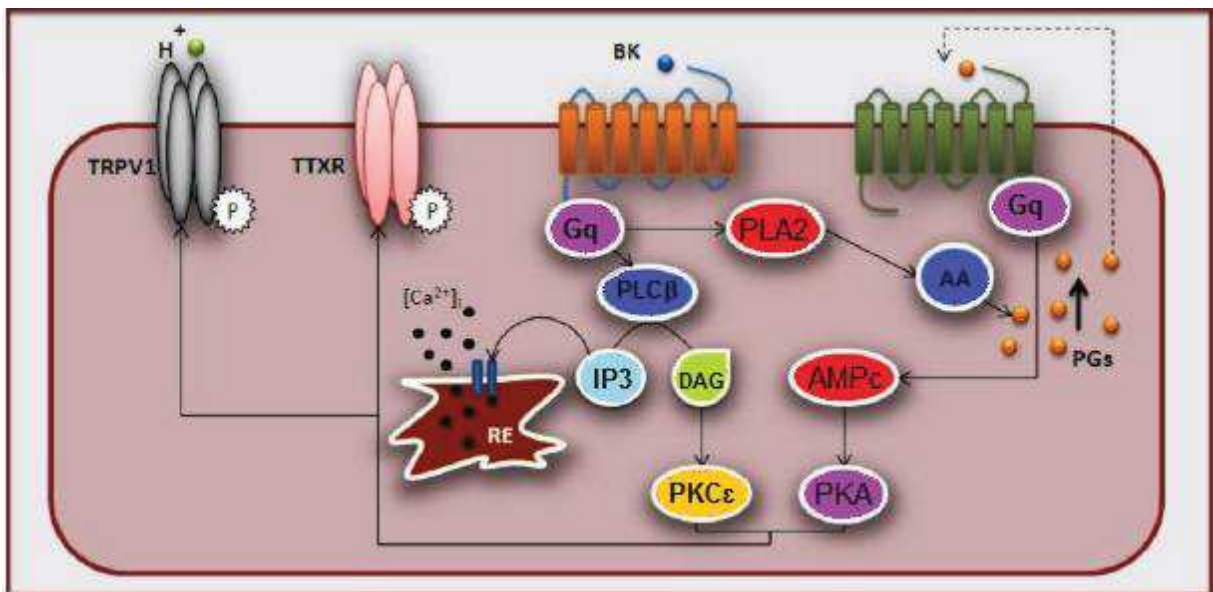
A transdução do sinal ocorre em decorrência da alteração conformacional do nociceptor em nível molecular. O disparo para o processo de transdução é devido a uma mudança do potencial de membrana na célula nociceptiva. Entre os vários tipos de receptores existentes, os de interesse nesse trabalho são: TRPs (receptor de potencial transitório), ASICs (canais de sódio sensíveis a ácido) e receptores de mediadores químicos, tais como: bradicinina, histamina e PGE₂.

O canal de receptor TRPV1 (receptor de potencial transitório tipo vaniloide1) é expresso por neurônios sensoriais aferentes primários da via da dor. Composto por quatro subunidades idênticas que se organizam em um canal permeável catiônico não seletivo, possuem seis domínios transmembrana ladeado por regiões intracelulares contendo C-terminal (carboxi-terminal) e N-terminal (amino-terminal), exibindo sítios

de ligação distintos para seus agonistas. Desempenha papel fundamental na detecção de uma variedade de estímulos nocivos (HAZAN et al., 2015; FEIN, 2011).

Em resposta a agonistas exógenos como a capsaicina, o receptor TRPV1 abre o poro do canal, que é permeável a sódio e cálcio e despolariza as fibras A-δ e C. Porém o TRPV1 não é ativado somente pela capsaicina, mas também por soluções com pH abaixo de 6,5, temperaturas elevadas (> 42 ° C) e indiretamente por mediadores pró-inflamatórios como, bradicinina, prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), fator de crescimento neuronal (NGF), histamina e adenosina-trifosfato (ATP), os quais sensibilizam os nociceptores ao diminuir seu limiar de ativação (WHITE et al., 2010) (Figuras 4).

Figura 4 – Ativação dos receptores TRPV1



Mediadores, como a bradicinina (BK) ativam receptores acoplados a proteína Gq, e culminam na ativação da proteína quinase Cε (PKCε). A PKCε fosforila o receptor TRPV1 e canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina (TTXr) os deixando sensíveis a abertura. A BK pode ativar a fosfolipase A2 (PLA2) que degrada fosfolípidios de membrana (PLP) e produz o ácido araquidônico (AA) culminando na formação de prostaglandinas (PGs). As PGs atuam em receptores acoplados a proteína Gs, na qual ativa a adenilato ciclase (AC), formando adenosina monofosfato cíclico (AMPc) através do consumo de ATP. O AMPc, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), que irá fosforilar alguns alvos intracelulares, como os TTXr e o TRPV1, os deixando sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos.

Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum, 2001.

Embora o papel do TRPV1 como quimiosensor já tenha sido detalhada, ainda pouco se conhece sobre a estequiometria da ativação de TRPV1. Sabe-se que a capsaicina ligada a uma única subunidade é suficiente para a máxima permanência do canal aberto, no entanto para obter o mesmo efeito com prótons, todos os quatro

locais de ligação a prótons são necessários, demonstrando uma estequiometria distinta da ativação de TRPV1 através de dois dos seus diferentes domínios de ligação agonista (HAZAN et al, 2015).

Outro tipo de receptor sensível a temperatura é o receptor do tipo TRPA1 (receptor de potencial transitório, da subfamília anquirina membro um). O TRPA1 é semelhante ao TRPV1 em termos de estrutura, função e localização e é ativado por estimulação ao frio ($<17^{\circ}\text{C}$), indiretamente por bradicinina (WHITE et al., 2010) e diretamente por compostos irritantes como mostarda, canela, alho e gás lacrimogêneo, os quais despertam a sensação dolorosa de queimação ou picada.

TRPA1 coloca-se extensivamente com o TRPV1 nos neurônios sensoriais primários e está funcionalmente inter-relacionado com TRPV1.

Embora estruturalmente não relacionados e não seletivos, as funções dos receptores TRPV1 e TRPA1 interligam-se consideravelmente, em relação à dor neurogênica e inflamatória, sendo coexpressos na maioria dos nervos sensoriais respondendo, ambos, a uma variedade de estímulos nocivos (FERNANDES, FERNANDES, KEEBLE, 2012).

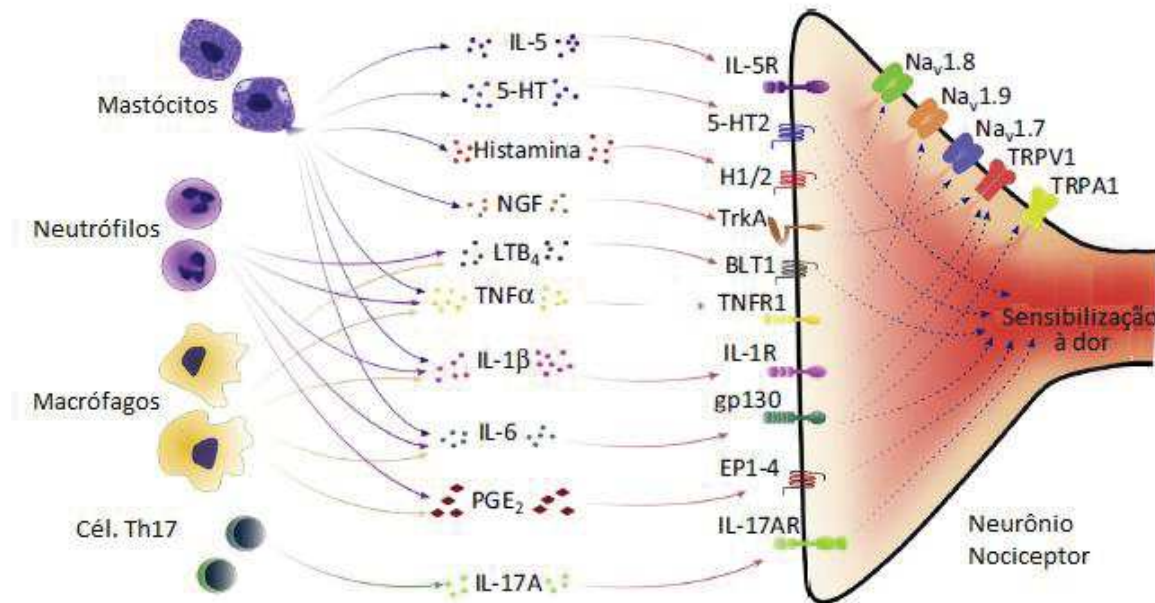
O aumento da concentração de prótons pode ativar não só TRPV1, mas também os canais de sódio sensíveis a ácido (ASICs). Os receptores ASICs são trímeros de proteínas e podem ser compostos de diferentes combinações de subunidades, designadas ASC1 a ASC4. Após a descoberta e clonagem, os ASICs tornaram-se os principais candidatos a sensor de prótons extracelulares (FEIN, 2011). A expressão de ASICs encontra-se aumentada em situações inflamatórias, uma vez que as lesões teciduais inflamatórias levam a acidificação do tecido lesionado.

Os canais de íons de detecção de ácido (ASICs) são canais catiônicos de prótons expressos em todo o sistema nervoso. Os receptores ASICs são ativados durante as flutuações ácidas do pH, e que eles estão envolvidos na transmissão sináptica excitadora. As ASIC também podem induzir degeneração neuronal e morte durante acidose extracelular patológica causada por isquemia, inflamação auto-imune e lesão traumática (VICK, ASKWITH, 2015).

Por sua vez existem os receptores para mediadores químicos. Esses mediadores interagem com canais iônicos na membrana plasmática dos nociceptores. Podendo agir diretamente nos canais de íons controlados por ligantes (ionotrópicos) ou indiretamente via receptores acoplados à proteína G ou receptores de tirosina quinase (metabotrópicos) (FEIN, 2011). Como pode-se observar na Figura 5, vários

são os receptores que participam na nocicepção, no entanto, abordaremos em nosso estudo os receptores de bradicinina, histamina e prostaglandina E₂.

Figura 5 – Mediadores químicos e interleucinas que produzem sensibilização periférica dos nociceptores



Liberação de mediadores químicos por células imunes que produzem sensibilização periférica de nociceptores. Durante a inflamação, células imunes residentes e recrutadas nos tecidos segregam mediadores moleculares que atuam nos terminais nervosos periféricos dos neurônios nociceptores para produzir sensibilização à dor. Nestes neurônios, as vias de sinalização intracelular específicas de citocinas, lipídios e fator de crescimento conduzem a fosforilação e / ou abertura de canais iônicos Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, TRPV1 e TRPA1, levando a uma maior geração de potencial de ação e sensibilidade à dor. Após a degranulação, os mastócitos liberam Interleucina 5 (IL-5), serotonina (5-HT), histamina e fator de crescimento nervoso (NGF) que atuam sobre IL-5R, 5-HT₂, receptor de histamina 2 (H₂), TrkA, e neurônios nociceptores, respectivamente, para produzir sensibilização à dor. Os neurônios de Nociceptores também são sensibilizados pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α), IL-1 β e IL-6 produzidos por mastócitos, macrófagos e neutrófilos. A ativação do TNF α receptor 1 (TNFR1) leva à fosforilação dos canais Nav1.9. A ativação do receptor 1 de IL-1 (IL-1R1) aumenta a expressão de TRPV1 por nociceptores, enquanto a IL-6 liga a gp130 em nociceptores e isso aumenta a expressão de TRPV1 e TRPA1, aumentando a capacidade de resposta ao calor e produtos químicos reativos. A prostaglandina E₂ (PGE₂) liberada por macrófagos e outras células imunes inatas também sensibiliza neurônios nociceptores através dos receptores PGE₂ 1-4 (EP1-4). As células Th17 e as células g δ T também podem sensibilizar neurônios nociceptores através da liberação de IL-17A e sinalização neuronal de IL-17RA.

FONTE: PINHO-RIBEIRO, VERRI, CHIU, 2017.

A bradicinina age distintivamente sobre dois tipos de receptores (BK1 e BK2) do tipo acoplados a proteína G. Os receptores BK1 são fracamente expressos, mas podem ser regulados na presença de citocinas e endotoxinas nas lesões teciduais. O BK2 por sua vez, são expressos constitutivamente, em particular nas células endoteliais. Enquanto os receptores BK2 são ativados pela bradicinina intacta, os

receptores B1 são ativados preferencialmente pelos metabólitos de carboxipeptidase das quininas, des-Arg9-bradicinina e des-Arg10-kallidina. Uma diferença importante entre os dois subtipos é que o B2 ao contrário do receptor B1 é internalizado rapidamente e se dessensibiliza, sendo as respostas induzidas pelo receptor de bradicinina B1 mais persistentes. Portanto, os receptores bradicinina B1 representam um novo alvo terapêutico em doenças inflamatórias (MORE et al., 2014). Além disso, estudos demonstraram que a injeção intraplantar de BK produz hipersensibilidade térmica em camundongos selvagens, porém não em nocautes para TRPV1, mostrando que o canal TRPV1 é necessário ao desenvolvimento da hipersensibilidade térmica induzida por bradicinina (CHUANG et al 2001).

A histamina é um potente mediador de numerosas reações fisiológicas, induz a inflamação, dor e coceira através da estimulação das fibras sensoriais do tipo C não mielinizadas. Seus efeitos são mediados pela sua ligação a quatro subtipos de receptores (H1, H2, H3 e H4) acoplados à proteína G. O receptor H1 ativado, estimula as vias sinalizadoras do fosfolípide inositol e do diacilglicerol levando ao aumento do cálcio intracelular. Além disso o H1 ativa as vias das fosfolipase D e fosfolipase A, o qual sensibiliza/ativa TRPV. Além disso, sua ativação pode levar a ativação do fator de transcrição NFκB, envolvidos nas doenças alérgicas (CRIADO et al., 2010; LUO et al., 2015). Ainda nesse contexto, a administração intraplantar de histamina, em ratos, resulta em respostas nociceptivas através da ativação do receptor histaminérgico local do tipo H1 (CARSTENS et al., 1997).

A PGE₂ desempenha importante função tanto na inflamação como na nocicepção. As ações da PGE₂ resultam da sua interação com uma família de receptores acoplados a proteína G, receptores prostanóides E (EP1, EP2, EP3 ou EP4), com sete domínios transmembrana, produzindo diferentes segundos mensageiros. O receptor EP está acoplado à PKA via proteína G estimulante (Gs), que ativa a enzima adenilato ciclase (AC). A enzima AC catalisa a conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) que, por sua vez ativa a PKA. A PKA fosforila proteínas sensibilizando receptores do tipo TRPV1, os deixando sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos (FEIN, 2011; JULIUS, BASBAUM, 2001). A injeção de PGE₂ intraplantar em camundongos induz de maneira dose-dependente o comportamento nociceptivo. Além disso, estudos demonstram que ocorre redução na latência da retirada da pata, ou seja hiperalgesia térmica, após a injeção de PGE₂ intraplantar, e esse comportamento mostrou-se

significativamente reduzido em camundongos nocaute para TRPV1 (KASSUYA et al, 2007; MORIYAMA et al., 2005). A Tabela 3 sintetiza alguns dos efeitos da ativação ou sensibilização de alguns dos receptores de mediadores químicos sobre o processo nociceptivo.

Tabela 3 – Ação de alguns dos mediadores inflamatórios sobre nociceptores

Mediador inflamatório	Ação sobre os nociceptores	Características e efeitos
Substância P	Ativação e/ou sensibilização	Hiperálgia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato
Prostaglandinas	Ativação e/ou sensibilização	Hiperálgia em modelos de dor inflamatória e neuropática sensível aos inibidores da ciclooxigenase
NO	Sensibilização	Indução a analgesia ou hiperálgia, dependente da concentração
Bradicinina	Ativação e/ou sensibilização	Hiperálgia mediada por receptores B2 e B2, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor aguda e crônica (neuropática). Sensibilização de receptores TRPV1
NGF (fator de crescimento neuronal)	Sensibilização	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1
Interleucinas pró-inflamatórias (IL-1B, IL-6, IL-8) e fator de necrose tumoral, TNF- α	Sensibilização	Hiperálgia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica (neuropática)

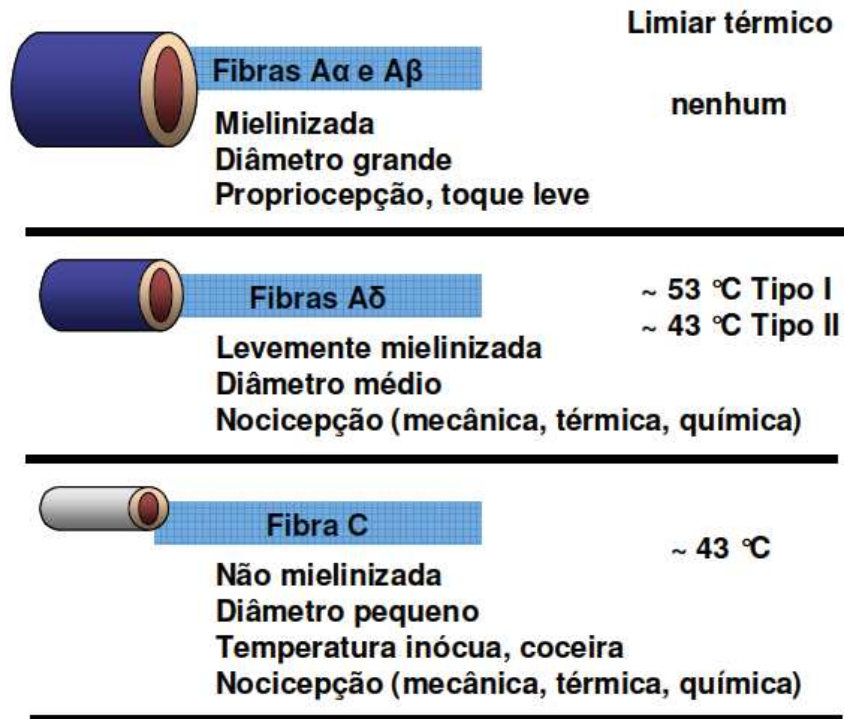
Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2006.

A transmissão ou propagação do impulso nervoso, gerado no nociceptor, ao sistema nervoso central, ocorre através das fibras nociceptivas.

As fibras aferentes de primeira ordem, relacionadas à transmissão dos estímulos nocivos, foram classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro, grau de mielização e velocidade de condução do estímulo em A- α , A- β , A- δ ou C. As fibras A- α e A- β , com alta velocidade de condução (>30 m/s), são altamente mielinizadas e com baixo limiar de ativação, responsáveis pela transmissão de estímulos proprioceptivos (toque leve e pressão). Enquanto que as fibras A- δ , pouco mielinizada (2-30 m/s) e a C, amielinizada (< 2 m/s), são primariamente nociceptores, estando

relacionadas com a detecção de estímulos nocivos de origem mecânica, térmica e química (BASBAUM et al., 2009) (Figura 6).

Figura 6 – Tipo de fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC.



Fonte: adaptado de JULIUS & BASBAUM (2001).

Ambas as fibras C e A- δ transmitem estímulos sensoriais térmicos, sendo que a característica de resposta dos nociceptores a diferentes temperaturas só foi melhor compreendida após a clonagem do receptor TRPV 1.

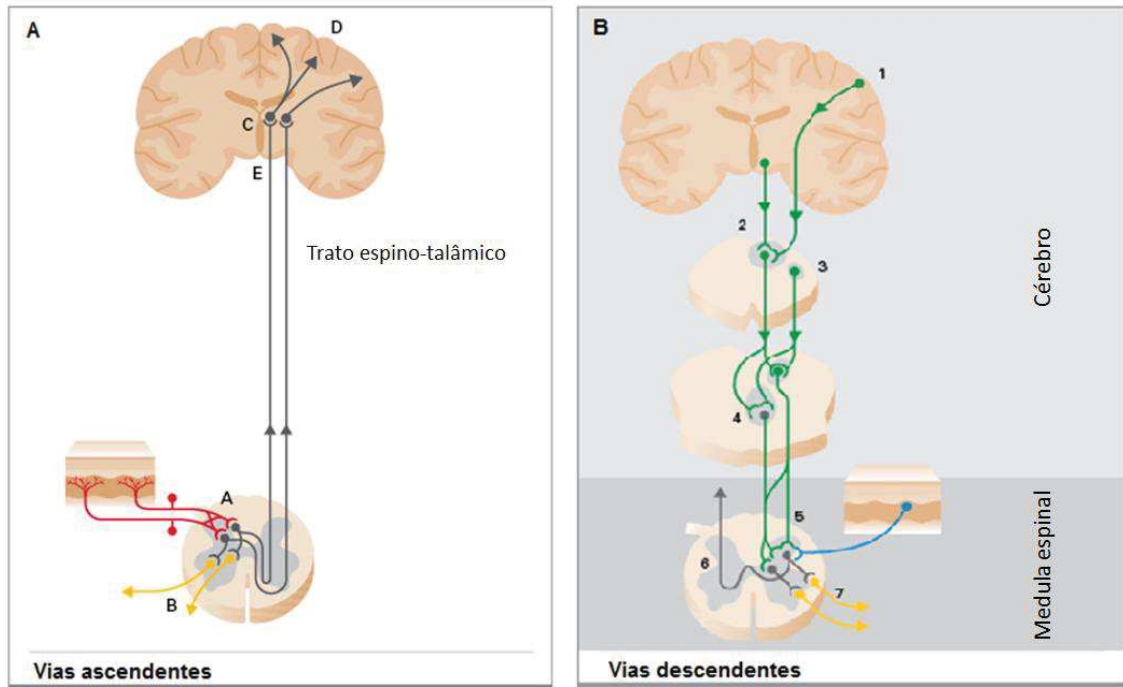
Uma vez transmitido o estímulo nociceptivo ao neurônio de segunda ordem, este acende para áreas supraespinais. Sendo as principais vias de condução do estímulo nociceptivo ao SNC os tratos espinotalâmico, espinoreticular o trato espinomesencefálico. Uma vez que o estímulo alcança o tálamo, neurônios de terceira ordem o transmitem ao córtex somatossensorial e cingular.

A ativação desses centros específicos do cérebro, integra estímulos sensoriais, experiências emocionais, respostas autonômicas e motoras que coletivamente moldam nossa percepção de dor.

O processo de supressão da dor é ativado pelas próprias vias nociceptiva ou via inibitórias (descendentes da dor). Essas vias englobam os sistemas opioidérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos, gabaérgicos, dopaminérgicos e canabinóides

endógenos (BASBAUM et al., 2009; MILLAN, 2002) (Figura 7A e B).

Figura 7 – Vias ascendente e descendente da dor



Em (A) vias ascendente da dor: a partir da estimulação periférica, o impulso é transmitido pelas fibras dos neurônios primários até o corno dorsal da medula espinal, onde fazem sinapse com neurônios de segunda ordem que ascendem até SNC, uma vez que alcança o tálamo o impulso é conduzido pelos neurônios de terceira ordem às regiões corticais, onde é processada a percepção da dor. Em (B) Vias descendentes: os impulsos dolorosos proveniente das regiões corticais e subcorticais (1) são dirigidos a substância gris peridural (2), ao locus ceruleus (sistema inibidor noradenérgico), ao núcleo da rafe (sistema inibidor serotoninérgico) fazendo sinapses inibitórias no corno dorsal da medula espinal (5). Trato espino talâmico ascendente (6) e reflexos motores (7).

Fonte: Change Pain: preocupados por el dolor. Banco de imagens gratuitas. Disponível em: http://www.change-pain.org/grt-change-pain-portal/change_pain_home/chronic_pain/physician/physician_tools/picture_library/es_ES/325100038.jsp Acessado em: março de 2018.

Embora com papel fisiológico protetor, a dor frequentemente perde essa função quando passa a carácter de dor crônica. A dor crônica, causada por lesões e doenças que superam a capacidade do organismo em reverter esse quadro, pode inclusive, persistir após o desaparecimento do evento inicial, estendendo-se por meses e anos (COSTIGAN et al., 2009). É um estado de constante facilitação da condução nervosa, quando estímulos antes inócuos passam a serem interpretados como dor (alodínia) ou quando a resposta ao estímulo doloroso não é proporcional à intensidade da agressão (hiperalgesia) (KRAYCHETE, 2006). Entre os diferentes tipos de dor crônica, destacam-se a dor neuropática e a dor inflamatória persistente como sendo as de mais difícil tratamento.

A dor neuropática, segundo Loeser e Treede (2008), é consequência de uma lesão tecidual ou doença que afeta o sistema somatossensorial. É resistente a diversos tratamentos, e frequentemente associada a depressão, ansiedade, medo e insônia, fatores que acabam por incapacitar o paciente de manter sua rotina diária (COSTIGAN et al., 2009; ABDU-SAAD, 2010).

As lesões dos nervos periféricos podem ocorrer por traumas, doenças metabólicas, infecções e até mesmo por invasão tumoral. Estão geralmente acompanhadas de inflamação transitória, que contribui para a sensação inicial da dor, envolvendo assim mediadores inflamatórios, de forma que drogas anti-inflamatórias aliviam a hiperalgesia em modelos animais de dor neuropática, com lesão de nervos periféricos (BENNETT et al., 2000; WOOLF, 2010).

Por sua vez os processos inflamatórios, frequentemente estão associados a nocicepção. A resposta à agressão tecidual e consequente processo inflamatório, que ocasiona a dor inflamatória, é resultante de mudanças funcionais em neurônios aferentes (nociceptores). Ocorre que, além dos eventos celulares e vasculares (sinais cardinais) há um aumento da sensação dolorosa e a diminuição do limiar da dor, por consequência da alteração na plasticidade neuronal e isso se dá devido a liberação de mediadores químicos celulares residentes, mas também por células migratórias que são recrutadas para o local da lesão (WOOLF, MA, 2007; LOESER, TREEDE 2008). Esses mediadores podem desenvolver efeitos a longo e curto prazo, excitabilidade crônica e alterações fenotípicas dos nociceptores, processamento anormal e acentuado do sinal nócico; podendo ser causados diretamente pelos mediadores ou ainda por moléculas formadas sob seu controle (De OLIVEIRA et al., 2011).

1.5 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório compreende um fenômeno complexo do organismo diante de um processo infeccioso, um antígeno, um dano celular ou tecidual de origem química, térmica ou mecânica, com a finalidade de erradicar o agente agressor, promovendo a reparação tecidual (VARELA et al., 2018; JULIER et al., 2017; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Essa capacidade de responder defensivamente é essencial à sobrevivência do organismo e foi descrita primeiramente por Cornélio Celsius (30 a.C. - 38 d.C.), que propôs os quatro sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, edema e dor (sinais cardinais). Sendo que, posteriormente, Virchow acrescentou a perda da função do órgão ou tecido inflamado, como o quinto sinal cardinal (MEDZHITOV, 2010; HEIDLAND et al., 2006; ROCK, KONO, 2008). Uma variedade de condições adversas induzem a inflamação, não encontrando-se associada apenas a patógenos e lesões, mas também a desequilíbrio homeostático de sistemas fisiológicos. Independentemente da causa, a inflamação é uma resposta adaptativa para restaurar a homeostase (MEDZHITOV, 2008).

Genericamente a via inflamatória consiste na participação de indutores, sensores, mediadores, e efetores da inflamação. Os indutores, são classificados como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês Pathogen-associated molecular patterns, ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês Damage-associated molecular patterns), sendo reconhecidos por diferentes receptores (macrófagos) ou células dendríticas. Ou ainda, indutores endógenos da inflamação, que são sinais apresentados em situações anormais com desequilíbrio homeostático resultando em uma resposta aguda de estresse fisiológico. Ativam sensores especializados, que provocam a produção dos mediadores da inflamação (citocinas), que são derivados proteicos presentes no plasma ou produzidos e liberados por células endoteliais ou por leucócitos polimorfonucleares infiltrados no sítio inflamatório. Promovem ou inibem a inflamação, induzem a dor e ativam células e tecidos efetores (MEDZHITOV, 2008, 2010 e VARELA et al., 2018).

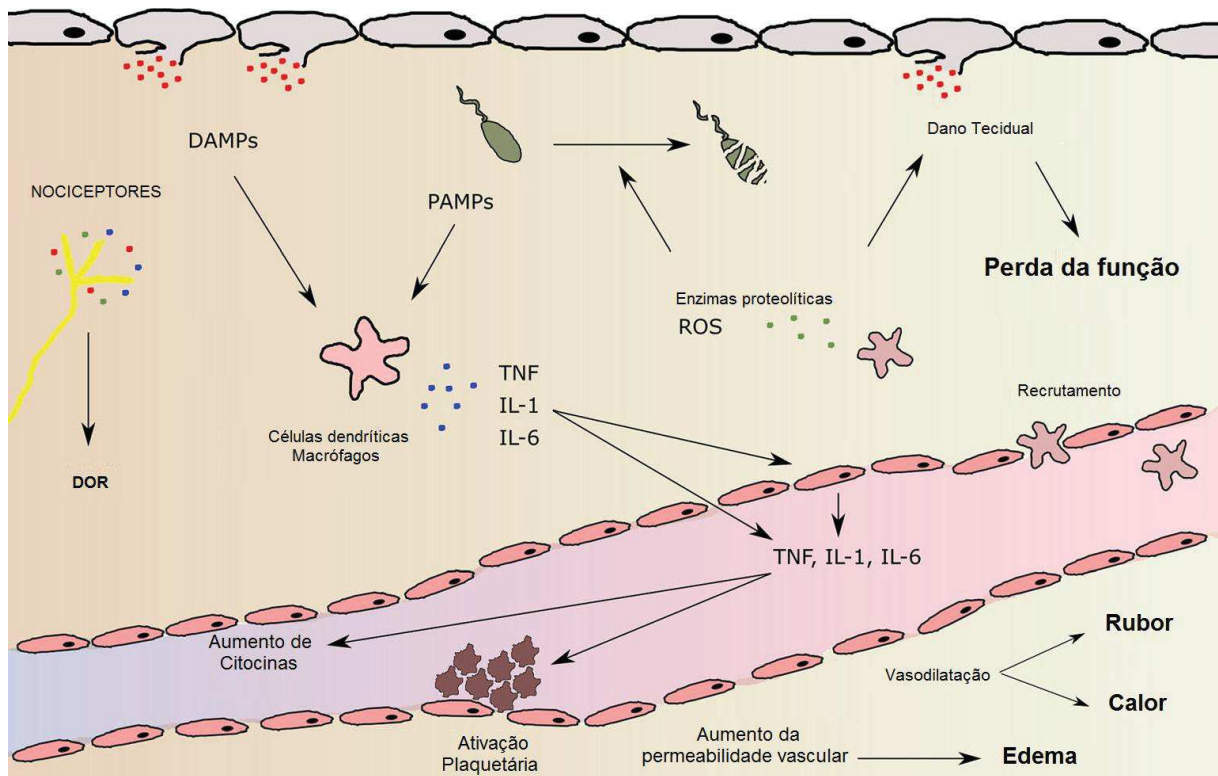
Caracterizada por eventos vasculares e celulares (Figura 8), a inflamação pode manifestar-se como um processo agudo ou crônico, dependendo da persistência da lesão e gravidade dos sinais clínicos.

Os eventos vasculares da resposta inflamatória consistem em vasoconstrição arteriolar de curta duração seguida por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo no sítio inflamado e recrutamento de produtos derivados do sangue, tais como proteínas plasmáticas, fluídos e leucócitos. Este fluxo de células, acompanhado por fluido rico em proteínas, é conhecido como o exsudato, e promove edema (ASHLEY et al., 2012). Isso ocorre em consequência da ação de diversos mediadores, tais como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas que causam contração das células endoteliais e consequente abertura das junções intercelulares (RANG et al., 2007).

Entre os eventos celulares, na fase inicial ou aguda da inflamação prevalece o acúmulo de neutrófilos nos tecidos afetados. Os neutrófilos são as primeiras células imunes a se translocar para os tecidos, sintetizam espécies reativas de oxigênio que leva a formação de um inflamosoma ativo, um grupo de proteínas que irá desencadear mais inflamação através da clivagem de precursores de proteínas pró-inflamatórias. Além disso, liberam moléculas quimioatraentes de monócitos, que por sua vez diferenciam-se em macrófagos M1 e M2. Macrófagos M1 produzem mais ROS e recrutam outras células imunes, além de liberar citocinas inflamatórias (TNF- α). Enquanto M2, promovem o reparo do tecido, liberando fatores de crescimento (GRIFFITHS, GAO, PARARASA, 2017; MEDZHITOV, 2008). Os polimorfonucleados tem como função fagocitar patógenos e antígenos estranhos, degradar o tecido necrótico, liberar enzimas e mediadores químicos aumentando ainda mais a resposta inflamatória ou a lesão tecidual (MEDZHITOV, 2008).

A inflamação crônica é caracterizada por inflamação ativa com infiltrado de células mononucleares (macrófagos e linfócitos), além de angiogênese, proliferação de tecido conjuntivo, destruição tecidual e tentativa de cicatrização. Os macrófagos ativados secretam vários mediadores, os quais podem levar a destruição tecidual e cicatrização por reparo fibroso, e também à respostas autoimunes (ROBBINS, COTRAN, 2005).

Figura 8 – Eventos celulares e vasculares da inflamação



Mudanças teciduais e vasculares durante um evento inflamatório local; os cinco sinais cardinais de inflamação estão em negrito; DAMPs (padrões moleculares associados a danos; PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos); ROS, espécies de oxigênio reativo.

Fonte: Adaptado de VARELA et al. (2018).

Os eventos inflamatórios agudos ou crônicos envolvem a participação de mediadores químicos tanto de origem plasmática como tissular. Sendo que os de origem plasmática, tais como cascata das cininas, sistema de coagulação, fibrinolítico e complemento, encontram-se na forma precursora inativa. Enquanto que, os de origem tissular como as aminas vasoativas, ácido araquidônico e derivados (eicosanóides), óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas, estão armazenados em grânulos ou são sintetizados em resposta a estímulos (RANG et al., 2007).

A cascata das cininas leva a formação da bradicinina, que é um derivado cininogênio plasmático vasoativo, causa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma e ativação de células inflamatórias. É um mediador de curta duração pois sofre rápida degradação enzimática (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MURPHY; WARD, 2006).

Sistema de coagulação: Fator Xa, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e migração de leucócitos e promove a formação de trombina. A trombina, promove adesão de leucócitos ao endotélio e a formação de fibrina, já os fibrinopeptídeos, atuam na quimiotaxia de leucócitos.

Sistema fibrinolítico, produtos resultantes da clivagem da fibrina, promovem aumento da permeabilidade vascular e atuam sobre o sistema complemento levando a vasodilatação.

Sistema complemento na inflamação provoca aumento da permeabilidade dos vasos, ativação de leucócitos, adesão e quimiotaxia. Sendo que o C5a, induz a migração de leucócitos ao local da inflamação e ativa o metabolismo do ácido araquidônico. Enquanto que o C3a promove aumento da fagocitose por neutrófilos e macrófagos.

Aminas vasoativas: 1) Histamina, é uma amina biogênica, sintetizada a partir do aminoácido histidina, por ação da L-histidina descarboxilase. É um potente mediador de numerosas reações fisiológicas, liberada pelos basófilos, plaquetas e mastócitos em resposta a estímulos como trauma físico, frio ou calor e reações imunes do tipo antígeno-anticorpo e por ativação do complemento (anafilotoxinas C3a e C5a). Interage com três receptores específicos na célula alvo, receptores de histamina tipo H1, H2 e H3, promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido. 2) Serotonina, é encontrada sobretudo nos grânulos densos das plaquetas, é um importante regulador da função plaquetária e exerce efeitos vasodilatador semelhante a histamina (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; RANG et al., 2007).

Ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo polinsaturado com 20 carbonos e quatro duplas ligações. Liberado a partir de fosfolipídios de membranas por ação de fosfolipase A2, enzima ativada em resposta a estímulos inflamatórios, químicos, traumáticos e mitogênicos (HILÁRIO et al., 2003; OLIVEIRA, 2007). O AA é convertido em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, pela via das cicloxigenases, ou ainda, a leucotrienos pela ação da 5-lipoxigenase (RANG et al., 2007), sendo esses derivados conhecidos como eicosanoides.

A PGE₂ promove aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, adesão e transmigração de neutrófilos e monócitos, contribuindo na formação do edema. Induz a transcrição de enzimas requeridas para síntese de lipoxinas, interage com citocinas na geração da febre nos processos infecciosos e torna a célula neuronal

hipersensível a estímulos dolorosos por potencializar as ações de outros mediadores nociceptivos como a bradicinina e a histamina (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SERHAN; SAVIL, 2005; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado e liberado por vários tipos de células, sendo sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase. Promove relaxamento da musculatura lisa vascular, ocasionando potente vasodilatação, isso devido ao aumento da concentração intracelular de guanosina cíclico (GMPc). No entanto, também possui ação anti-inflamatória devido inibir a migração, adesão e rolagem de neutrófilos sobre o endotélio (RANG et al., 2007; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005, SECCO et al., 2004).

Entre os neuropeptídeos envolvidos na inflamação, destaca-se o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), pela sua ação vasodilatadora; substância P, por promover o extravasamento de proteínas plasmáticas; e a neurocinina A, por induzir a liberação de histamina pelos mastócitos (RICHARDSON; VASKO, 2002).

As citocinas por sua vez desempenham importante função regulatória no processo inflamatório podendo aumentar (pró-inflamatória) ou atenuar (anti-inflamatória) a resposta inflamatória. São consideradas pró-inflamatórias as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-17 e TNF- α , e as anti-inflamatórias as IL-4, IL-10 e IL-13 (Tabela 4).

As citocinas regulam a resposta imunológica e inflamatória. Na imunidade inata participam as células fagocitárias mononucleadas (macrófagos/monócitos) e os neutrófilos. Os macrófagos secretam diversos mediadores químicos, tais como: óxido nítrico, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF-alfa), quimiocinas (IL-8) entre outros (KOSMANN, PARNET, DANTZER, 2002). Na resposta imune adquirida as células envolvidas são os linfócitos T (maduros) que no local da lesão liberam citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-alfa), quimiocinas (WATKINS et al., 1995).

Tabela 4 – Principais citocinas pró e anti-inflamatórias: origens e principais funções

Citocina	Descrição
IL-1	Produzida por macrófagos e monócitos, fibroblastos e células endoteliais ativadas. IL-1 α , encontra-se associada a membranas celulares agindo através de contato celular. IL-1 β , produz inflamação sistêmica ativando a COX-2, com formação de PGE2 e causando febre, produz substância P, óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial.
IL-2	Produzida principalmente por células T-CD4 e CD8+. Estimula o crescimento e proliferação de linfócitos-T e células -B, além de induzir a produção de IFN γ e FNT β , resultando na ativação de monócitos, neutrófilos e células matadoras naturais.
IL-4	Produzida por linfócitos T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Induz a produção de IgG e IgE, por linfócitos B. Reduz os efeitos das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, FNT α , IL-6 e IL-8).
IL-6	Secretada por macrófagos, monócitos eosinófilos, hepatócitos e células da glia.
IL-10	Sintetizado em células imunológicas, tecidos neuroendócrino e neural. Inibe as citocinas pró-inflamatórias (FNT, IL-1 e IL-6) e induz a produção de citocinas anti-inflamatórias.
IL-13	Produzida principalmente por células T-CD4. Age nos linfócitos e monócitos, inibindo a produção de óxido nítrico e de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF α entre outras)
IL-17	Predominantemente produzida por linfócitos T-CD4. É pró-inflamatória, induzindo a formação de IL-6 e IL-8 e da molécula de adesão intercelular em fibroblastos humanos.
TNF- α	Produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos T. TNF- α é um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Entre suas ações, ativa a coagulação estimula a expressão ou liberação de moléculas de adesão. PGE2, eicosanoides e influencia a apoptose celular. Nos neurônios e células gliais desempenha importante função na hiperalgesia inflamatória e neuropática.

Fonte: Adaptado de De OLIVEIRA et al., 2011.

As citocinas pró-inflamatórias (interleucinas IL-6, IL-8, TNF-alfa e IL-1Beta) atuam na área lesionada, sinalizando a inflamação e estão associadas com indução e manutenção da dor aguda e crônica (CUNHA, et al., 2000). Agem através de diferentes mecanismos em vários locais das vias de transmissão da dor. Por isso, a

dor e o sistema imunológico influenciam-se mutuamente, e encontram-se intimamente relacionados, tornando difícil determinar se o bloqueio da dor contribui para a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, ou se a redução das mesmas resulta em dor menos intensa (De OLIVEIRA et al., 2011, PINHO-RIBEIRO et al., 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de produtos naturais na prática médica alternativa e na agricultura orgânica encontra-se cada vez mais difundida. O interesse por modos de vida baseado no retorno à natureza como melhor maneira de viver deixa de ser um modismo para tornar-se uma necessidade que tem despertado no homem moderno a importância de usar os recursos naturais para melhorar sua qualidade de vida e saúde.

O Brasil é o país com maior biodiversidade do planeta, e estima-se que 30% de todos os compostos avaliados como agentes terapêuticos tem origem em produtos naturais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018; NEWMANN, CRAGG, 2007). A apifauna brasileira compreende 1.678 espécies descritas em cinco famílias (SILVEIRA et al., 2002) e cada vez mais tem aumentado o interesse pelas propriedades bioativas dos produtos apícolas, tais como mel, geleia real, pólen e própolis (ADELMANN, 2005). Nesse contexto, encontra-se a espécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, pertencente à família Meliponini, conhecidas popularmente como ‘abelhas sem ferrão’, que são responsáveis pela polinização de até 90% das árvores nativas brasileiras (KERR, NIELSEN, 1996).

Historicamente, as abelhas nativas tiveram seus produtos utilizados pelos indígenas como fonte de alimento ou medicamento tradicional (ARAÚJO et al., 2015); não diferente ocorreu com o própolis. As propriedades biológicas do própolis, bem como sua composição química encontram-se diretamente relacionada com a flora da região, época da colheita e espécie de abelha produtora (MARCUCCI, 1995). A pesquisa sobre as propriedades bioativas do própolis dessas espécies nativas ainda carece de estudos.

O presente trabalho está focado em dois grandes problemas de saúde pública: a dor e a resistência bacteriana aos antibióticos. O que se justifica pelo fato de que a dor tem sido considerada uma crise de saúde devido sua alta prevalência e por ser a principal causa de incapacidade dos indivíduos. Estudos apontam que a dor crônica alcança a prevalência de 11- 19% da população adulta (SMITH, 2017). Soma-se a isso, outro grave problema de saúde pública que refere-se ao recrudescente surgimento de microrganismos resistentes a antibióticos em hospitais e na comunidade, comprovado pelo incremento maciço na taxa de morbidade e mortalidade causada por doenças infecciosas. A Organização Mundial de Saúde e o

Centro de Controle de Doenças, declararam que a crise de resistência aos antibióticos está piorando, já que estamos vivendo na “era pós-antibiótica” (MICHAEL, DOMINEY-HOWES, LABBATE, 2014). Situação agravada pelo uso e prescrição inadequada de antibióticos (SMITH, COAST, 2013).

Nesse contexto, desenvolvemos o presente projeto com a finalidade de avaliar a composição química e possíveis atividades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antimicrobiana do própolis produzido especificamente por abelhas da espécie *M. quadrifasciata quadrifasciata*, por ser amplamente cultivada no meio-oeste catarinense e apresentar poucos estudos sobre seus produtos e sub-produtos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral caracterizar quimicamente o EHP da *Melipona quadrifasciata* subespécie *quadrifasciata* e verificar sua potencial atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e/ou antinociceptiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do EHP da *M. quadrifasciata quadrifasciata* e avaliar seu potencial antioxidante do EHP.
- Avaliar se o EHP apresenta atividade antibacteriana frente a diferentes cepas potencialmente patogênicas.
- Analisar o efeito do EHP sobre a curva de crescimento e sobre a liberação do conteúdo intracelular bacteriano do *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).
- Verificar o efeito do EHP sobre a atividade das hemolisinas liberadas pelo *S. aureus* (ATCC 25923).
- Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do EHP no modelo de nocicepção aguda.
- Determinar o decurso temporal do possível efeito antinociceptivo apresentado pelo EHP.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do EHP sobre a nocicepção induzida por mediadores químicos inflamatórios.

- Verificar o envolvimento dos receptores TRPV1, TRPA1 e ASIC, bem como de suas vias de sinalização no possível efeito antinociceptivo do EHP.
- Determinar o efeito antiedematogênico agudo do EHP em animais submetidos a teste do edema de orelha.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do tratamento prévio com EHP em animais submetidos ao teste da peritonite.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP), foram determinados os conteúdos de fenóis totais, flavonóides, atividade antioxidante e realizadas as análises cromatográficas: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e cromatografia líquida de ultra-alta performance acoplada à espectrometria de massas ESI-QTOF (UPLC/MS/MS). A partir daí foram realizados ensaios microbiológicos como: determinação da concentração inibitória mínima (CIM), curva de crescimento bacteriano, pesquisa da liberação do conteúdo intracelular e avaliação do efeito do EHP sobre a atividade hemolítica do *S. aureus*. Partiu-se então, para os testes comportamentais com camundongos, para avaliar “*in vivo*” e “*ex-vivo*” as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias (Figura 9).

Com relação aos testes comportamentais, foi realizado o teste da nocicepção induzida por formalina (2,5%), seguido do teste da atividade anti-inflamatória tópica induzida por xileno e da peritonite induzida por carragenina. Após a obtenção destes resultados, avaliou-se o efeito do EHP na ativação dos receptores TRPV1, TRPA1 e ASICs através dos testes de capsaicina, trans-cinamaldeído e salina acidificada, respectivamente, e também os testes da atividade antinociceptiva induzida por bradicinina, PGE₂, histamina, forskolina e PMA.

Em todos os experimentos comportamentais os camundongos foram pré-tratados com EHP por via intragátrica (i.g.) 1 h antes dos testes ou com veículo de diluição do extrato (10 % de Tween 80, e 2% de álcool, v/v, em PBS pH7,4).

Antes dos testes, os animais foram aclimatados na sala de experimento por uma hora. Após este período, os animais foram tratados com o EHP. Decorridos 30 minutos deste tratamento, os animais foram acondicionados individualmente em caixas de acrílico (13 x 13 x 8 cm) no local dos testes, e ao completar o tempo de uma hora de tratamento, receberem a injeção da substância irritante, sendo imediatamente colocados na mesma caixa para avaliação dos efeitos comportamentais.

Figura 9 – Delineamento proposto



Fonte: diagramação próprio autor (2018).

4.2 ORIGEM E COLETA DO PRÓPOLIS

As amostras de própolis tiveram origem no meliponário da propriedade do Sr. Luiz Celso Stefaniak, localizado no município de Rio das Antas-SC (latitude 26°51'13,8" Sul, longitude 51°05'40,4" Oeste).

As coletas foram realizadas através da raspagem mecânica das caixas no início da primavera (setembro/2014). Sendo que a autorização para coleta e transporte de material foi obtida através do registro da pesquisa no SISBIO – Instituto Chico Mendes, Ministério do Meio Ambiente, bem como a autorização de acesso e remessa de patrimônio genético (CNPq) e depósito de espécies conforme exige a legislação (Anexos A, B e C).

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

A obtenção do extrato hidroalcoólico do própolis (EHP) foi como descrito por PARK et al. (1998). Consiste em pesar 2 gramas de própolis triturada e homogeneizada, no qual são adicionados 25 mL de solução hidroalcoólica (80% etanol P.A., 20% de água ultrapura (v/v)) e realizada a extração em banho de água termostaticada 70 °C por 30 minutos, sob agitação magnética constante. Após a extração, o extrato é centrifugado (5000 rpm/10 minutos) e o sobrenadante armazenado em refrigeração a 5 °C. Transcorridas 24 horas, o extrato é novamente filtrado para remover o conteúdo graxo e então armazenado em freezer (- 20°C) para análises futuras. Para as análises “*in vitro*” foi utilizado o extrato bruto, enquanto que para as análises “*in vivo*”, o extrato foi rotaevaporado a 40 °C, sobre pressão reduzida, seco e então reconstituído com veículo (10 % de Tween 80, e 2% de álcool, v/v, em PBS pH 7,4) nas concentrações desejadas.

4.4 ANIMAIS

Para a avaliação dos parâmetros nos modelos animais propostos foram utilizados 238 camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos adultos, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da UFSC, mediante aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da referida Universidade.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC N°. 7189251116 - ANEXO D). Sendo seguidos os protocolos éticos estabelecidos no Diretrizes Nacionais para o uso de animais e Diretrizes Nacional para o uso de animais e Diretrizes de cuidados e saúde animal (NIH publication N° 80-23).

No biotério setorial os animais foram acondicionados em caixas alojamentos, em sistema de estante de mini-isolador e em número máximo de cinco animais por caixa. Mantidos em temperatura de 22 ± 1°C, 60-80% de umidade, ciclo claro/escuro de 12h-12h, com livre acesso a comida e água durante o dia. Os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos e utilizados uma única vez. No final dos experimentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

4.5 DROGAS E REAGENTES

Na execução deste projeto utilizou-se as seguintes substâncias: ácido ascórbico, ácido gálico, acetonitrila, carbonato de cálcio, carragenina, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), EDTA-sódico, quercetina, reagente de Folin-Ciocalteu, resazurina (0,01%), carragenina, capsaicina, trans-cinamaldeído, histamina, bradicinina, prostaglandina E₂ e 12-miristato,13-acetato de forbol (PMA), reativo de Bradford e albumina bovina (BSA), acetonitrila e ácido fórmico todos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Forskolin adquirido da Tocris Bioscience (Missouri, EUA). Ácido acético e hidróxido de sódio provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). Tween 80, etanol (PA), metanol (PA) e xileno da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Heparina, naloxona e sulfato de morfina (Cristália, Itapira/SP, Brazil), dexamethasona (Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A, Guarulhos/SP, Brazil).. Salina acidificada foi manipulada no laboratório, na concentração de 2% ácido acético (diluído em salina 0,9%), pH 5. Capsaicina (10 % etanol/10 % Tween 80). Solução estoque de PMA foi preparada em álcool absoluto. Para o uso, a mesma foi diluída em salina (0,9%), não excedendo 0,05% de etanol na solução de uso. Cepas bacterianas: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) Laborclin (Pinhais/PR, Brasil) *S. aureus* MRSA (isolado clínico) cedido pela Prf^a. Dr^a. Rosmari Rorner, do Laboratório de microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologias da Universidade Federal de Santa Maria e as cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212) e *K. pneumoniae* (ATCC 23883) cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Solos da Universidade Federal de Santa Catarina. Meios de cultura: Brain Heart Infusiuon (BHI), caldo simples, Tryptic Soy Broth (TSB) e Mueller-Hinton (Newprov, Pinhais/PR). Sangue de carneiro desfibrinado obtido comercialmente (Newprov, Pinhais/PR). Solução tampão (PBS, phosphate-buffered saline) e corante hematológico Panotico Rápido (LaborClin, Siqueira Campos, PR, Brazil). Kits de Elisa para determinação de IL-17, IL-6 e IL10 da R & D Systems (Minneapolis, E.U.A.). Água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q Plus system (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EHP

4.6.1 Análise cromatográfica dos constituintes do EHP

4.6.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Amostras de EHP de própolis foram analisadas quanto aos seus perfis de composição química através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em parceria com o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC, coordenado pelo prof. Dr. Marcelo Maraschin. Resumidamente, as amostras de EHP (10 µL) foram injetadas em cromatógrafo líquido (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000), equipado com uma coluna C18 de fase reversa (BioBasic-18, 150mm x 4,6mm Ø, 5µm) termostaticada a 40°C e detector de arranjo de diodos. As amostras foram eluídas com fluxo 0,8 mL/min, utilizando um gradiente linear de ácido fórmico 0,5% (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), a saber: (0-10 min) 15% B, (10-55 min) aumento gradativo para 70% B e (55-60 min) redução de B a 15%. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras com os tempos de retenção de padrões autênticos de flavonoides e ácidos fenólicos (ácido gálico, $R_t=2,69$; epigallocatequina, $R_t=4,07$; p-hidroxybenzóico, $R_t=5,99$; ácido clorogênico, $R_t=6,10$; vanilina, $R_t=7,82$; ácido cafeico, $R_t=7,91$; ácido p-cumárico, $R_t=12,7$; quercetina, $R_t=23,98$; pinocembrina, $R_t=32,39$; crisina, $R_t=34,02$ e artepelina C, $R_t=52,55$). O resultado foi obtido considerando-se o valor médio de três injeções consecutivas/amostra.

4.6.1.2 Análise de UPLC-MS/MS: espectrometria de massa atômica/ESI-QTOF

As análises de UPLC-MS/MS foram realizadas em parceria com o prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

As amostras de EHP (1 mg/mL) foram sonicadas por 1 minuto, filtradas com filtro de 0,22 micra, e então submetidas ao sistema cromatográfico.

As separações cromatográficas foram realizadas através do sistema Acquity UPLC classe H (Waters) equipado com um detector de massas, amostrador automático e um gerador de solvente quaternário, bem como uma coluna BEH C18:

100 mm, 1,0 mm, tamanho de partícula 1,7 μm (Waters). A temperatura da coluna e das amostras, foi de 40 °C e 20 °C, respectivamente. O gradiente utilizado para a separação, a uma taxa de fluxo de 0,3 mL / min, foi 95% A [água / ácido fórmico, 99,9 / 0,1 (v / v)] e 5% B (acetonitrila); 0,0-4,9 min 50% de A; 5-9 min, 40% de A; 9,1-12 min 10% de A; 12,1-14,9 min 5% de A; 15-20 minutos 95% de A. O volume de amostra injetada foi de 10 μL .

A obtenção dos espectros de massas dos constituintes da amostra foi através da análise utilizando o equipamento Xevo G2-S QToF (Águas), equipamento com uma fonte de volatilização de íons nos modos positivo (ESI+) e negativo (ESI -) utilizando para nebulização das amostras o gás nitrogênio, com de fluxo 60 L/h; e a dessolvatação com fluxo de 1000 L/h; sendo o gás de colisão: argônio; volatilização com amostra referência: Leucina. Limite das massas são m/z 556.2771 (ESI+) e m/z 554.2615 (ESI -).

Parâmetros do LC-MS (ESI+ e ESI-): A dessolvatação e a temperatura da fonte foi fixa a 300 °C e 90 °C, respectivamente. A voltagem capilar foi definida como 3 kV. Os constituintes foram coletados entre 100 e 1200 Da, com um intervalo de tempo de 1.0 segundos durante um tempo de análise de 20 min. As análises de LC-MS / MS foram executadas com energia de colisão de 25 eV. Os dados foram processados através da utilização do software MassLynx V4.1 (Waters)

4.6.2 Determinação do conteúdo de fenóis totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (GHASEMI, GHASEMI, EBRAHIMZADEH, 2009). Onde uma solução de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos, oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W, com leitura em 725 nm.

A mistura reacional constituída de 100 μL de extrato EHP (1mg/mL) e 500 μL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10), na qual, após 5 minutos de repouso, adicionou-se 400 μL de carbonato de sódio aquoso (1M). Essa mistura foi deixada em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz, após o conteúdo de fenóis totais determinado em 725 nm. Um branco do reativo foi preparado nas mesmas condições, porém, sem a presença de extrato. A curva de calibração foi construída com solução

de ácido gálico (0,25-4 µg/mL) em metanol:água (50:50, v/v). O teor de compostos fenólicos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de própolis).

4.6.3 Determinação do conteúdo de flavonóides

O conteúdo de flavonóides foi determinado conforme descrito por Campos et al. (2014), em que uma alíquota de 0,5 mL de extrato EHP (100 µg/mL) foi adicionado a 4,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2 %. O branco é preparado conforme descrito acima, porém substitui-se a solução de cloreto de alumínio por metanol. Depois de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em 415 nm. Solução de quercetina (0,4- 11 µg/mL) foi usada como padrão. O conteúdo de flavonóides foi expresso em equivalentes de quercetina (mg EQ/g de própolis).

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante foi realizada de acordo com o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) descrita por BRAND-WILLIAMS (1995). Baseia-se na captura do radical DPPH por substâncias antioxidantes, que produz um decréscimo da absorbância inicial do reativo em 517 nm.

A mistura reacional constituída por 150 µL de solução etanólica de DPPH (80 µM) e 150 µL de diferentes concentrações do extrato EHP (100 – 1000 µg/ml), após agitação, foi deixada em repouso e protegida da luz por 20 minutos. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 517 nm. O controle continha 150 µL da solução de DPPH e 150 µL de álcool etílico (80%). A solução etanólica de DPPH foi preparada momentos antes do uso. A percentagem da atividade antioxidante foi calculada pela fórmula $[(\text{Abs DPPH} - \text{Abs Amostra}) / \text{Abs DPPH}] \times 100$.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.8.1 Cepas bacterianas

A atividade antibacteriana foi avaliada *in vitro* frente a 5 cepas bacteriana padrão de referência da coleção American Type Culture collection (ATCC). Sendo os microrganismos armazenados a – 20°C em caldo TSB (Tryptic Soy Broth) contendo 15% de glicerol.

As cepas Gram-negativas selecionadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23883). As Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e ainda foi utilizado um isolado clínico proveniente de material clínico do Hospital Universitário de Santa Maria (UFSM), um *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA).

4.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM do EHP, definida como a menor concentração que impede o crescimento visível do microrganismo, foi determinada pelo método padrão de microdiluição em caldo, seguindo-se o documento M.07-A.9 do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2012). O inócuo bacteriano foi preparado em solução salina estéril, utilizando-se o método da suspensão direta das colônias de culturas recentes. A referência para a turbidez da suspensão bacteriana foi o padrão 0,5 MacFarland, ou seja, $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. Resumidamente, as cepas bacterianas de *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* MRSA (isolado clínico), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922) e *K. pneumoniae* (ATCC 23883) foram incubadas em microplaca de 96 poços, contendo caldo Mueller-Hinton, EHP (16 - 0,25 mg/mL) e inócuo bacteriano (1×10^5 UFC/mL, por poço) a 35°C por 24 h. Transcorrido o período de incubação, foi adicionado 30 µL de resazurina (0,01%) e deixado em repouso por 30 min na estufa, sendo então, realizada a leitura visual. A visualização de cor púrpura indica cultura negativa e a visualização de tons magenta, crescimento bacteriano. Como controle positivo (de crescimento) foi ensaiado o inócuo na ausência de extrato e como controle negativo apenas meio de cultura e diluente. Além disso, foi ensaiado paralelamente às amostras o controle do diluente, etanol. Os resultados foram obtidos através do cálculo da média de cinco ensaios independentes. No apêndice A,

encontra-se o esquema descritivo da técnica utilizada.

4.8.3 Avaliação do efeito do EHP sobre a curva de crescimento bacteriano: *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922)

Com o objetivo de demonstrar o efeito do EHP no decorrer do tempo foi realizada uma curva de crescimento bacteriano: tempo (0; 2; 4; 6; 8; 12; e 24h) vs concentração de extrato (0; 0,5 e 1 CIM), tanto para *S. aureus* (ATCC 25923) como para *E. coli* (ATCC 25922). O meio reacional constituído de 100 µL de meio de cultura BHI, extrato diluído em 100 µL de BHI e inócuo bacteriano diluído em 100 µL BHI (concentração final de 5×10^5 UFC/mL), foi incubado a 35 °C. Transcorrido o tempo desejado, adicionou-se ao meio 10 µL de resazurina (0,01%), e após 5 minutos em repouso ao abrigo da luz, foi centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos, 200 µL do sobrenadante foi lido no comprimento de onda 550 nm.

4.8.4 Avaliação do efeito do EHP sobre a liberação do conteúdo intracelular bacteriano: *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922)

Com o objetivo de verificar a possível ação do EHP de própolis sobre a integridade da membrana bacteriana, foi realizado o ensaio para determinar se o EHP (1 CIM) seria capaz de provocar o extravasamento de conteúdo intracelular bacteriano ao meio reacional, conforme descrito por DIAO et al. (2014), com algumas modificações. Esse ensaio foi realizado para ambas as bactérias (*S. aureus* e *E. coli*). Após realizar o cultivo em placa das bactérias por 24 horas a 35 °C, as mesmas foram incubadas, separadamente, em 100 mL de BHI. Transcorridos 24 horas de incubação, o meio turvado foi centrifugado por 15 minutos a 3500 RPM e lavado 3 vezes com tampão PBS (0,1 M; pH 7,2), sendo a concentração final de bactéria foi ajustada em espectrofotômetro em 0,5 de absorbância no comprimento de onda de 620 nm. Posteriormente, os inócuos foram incubados por 4 h a 35 °C, na ausência de EHP (controle) e presença de EHP na concentração de 1 CIM, respectiva a cada uma das bactérias, sendo agitados a cada hora. Na hora zero, os tubos controles foram centrifugados por 5 minutos a 11000 RPM e a absorbância lida em 260 nm. Transcorrido o tempo de incubação, os tubos testes (1 CIM) sofreram o mesmo tratamento. A diferença das absorbâncias da hora zero e 4 horas corresponde ao

conteúdo liberado.

4.8.5 Avaliação do efeito do EHP sobre a atividade hemolítica do *S. aureus* (ATCC 25923)

O teste para avaliar o efeito do EHP sobre a atividade das hemolisinas liberadas pelo *S. aureus* (ATCC 25923) foi realizado segundo o método descrito por Ferro e colaboradores (2016) com pequenas modificações. Amostras de sangue de carneiro desfibrinado (2,5 mL) foram coletadas em tubos heparinizados e imediatamente centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Após a remoção do plasma, as hemácias foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) e ressuspendidas a 2% em caldo BHI. Em um tubo de ensaio seco e esterilizado, adicionou-se uma alíquota de 200 µL do caldo BHI enriquecido com hemácias, 20 µL suspensão bacteriana (5×10^5 UFC/mL, no tubo) e concentrações finais subinibitórias de EHP (CIM/2 e CIM/4) ou PBS. Após 24 horas de incubação a 35°, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante (100 µL) foi transferido para microplaca de 96 poços para leitura da absorbância em 550 nm. Os resultados foram expressos em percentual de hemólise em relação ao tubo controle (incubado com PBS) correspondente a hemólise total (100%).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.9.1 Nocicepção induzida por formalina

Para verificar o efeito antinociceptivo do EHP, foi realizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina (2,5%) (SIMÕES et al, 2015). A dor neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) é avaliada na primeira fase do teste que ocorre 5 minutos após a injeção de formalina; enquanto que, a resposta tônica à dor, juntamente com resposta inflamatória, devido a liberação de mediadores químicos da inflamação, é avaliada na segunda fase do teste, 15 a 30 minutos após a injeção inicial (HUNSKAAR, HOLE, 1987). Os camundongos foram previamente aclimatados na sala de experimentação por 1 hora. Transcorrido esse tempo os animais foram tratados com EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), e após 30 minutos acondicionados individualmente no local

do teste (câmaras de acrílico). Ao completar 1 hora do tratamento, receberam 20 µL de formalina a 2,5 % (25 µL de formaldeído + 975 µL de salina estéril) na região ventral da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram imediatamente recolocados nas câmaras de acrílico. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

O decurso temporal da ação antinociceptiva do EHP também foi avaliado através do teste de nocicepção induzida por formalina. Para isso, os animais foram tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), e após 0,5, 1, 2, 4 e 6 h de tratamento receberam uma injeção i.pl. de formalina, e o comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito acima.

4.9.1.1 Mensuração da espessura (edema) da pata

Adicionalmente, após o término do teste da formalina, avaliou-se a formação da espessura (edema) da pata, utilizando-se para isso um micrômetro externo digital 0-25 mm (Micrômetro Externo Digital 02, 0005 Zaas Precision) posicionando a parte fixa na superfície dorsal e a parte móvel do micrômetro na superfície plantar central, sendo realizada uma medida na pata traseira direita dos animais. O edema foi então representado pela diferença entre a medida da pata direita, injetada com o agente indutor da nocicepção, e da pata esquerda não injetada (controle).

4.9.1.2 Mensuração da temperatura da pata

Em seguida foi avaliado o efeito sobre a temperatura da pata. Para isso, com a utilização de um termômetro digital (Mallory modelo: Thermosensor Pro), aferiu-se a temperatura da superfície dorsal da pata traseira direita, injetado com o agente nociceptivo, e esquerda (controle) de cada animal. O efeito sobre a temperatura da pata foi expresso pela diferença da temperatura da pata direita e esquerda de cada animal.

4.9.2 Nocicepção induzida por bradicinina

A nocicepção induzida por bradicinina (10 nmol/20 µL), foi similar ao descrito previamente por FERREIRA et al. (2005). Após aclimatação dos animais por 1 hora na sala de experimentação, os mesmos foram tratados com EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.). Transcorridos 30 min após o tratamento os animais foram transferidos para as câmaras de acrílico e ao completar 1 hora, receberam injeção i.pl. de 20 µL de bradicinina (10 nmol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção de bradicinina os camundongos foram imediatamente recolocados na caixa de acrílico e observados durante 10 minutos pós injeção, sendo que a quantidade de tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada é considerada como indicativo de nocicepção.

Adicionalmente, após o término do teste da nocicepção induzida por bradicinina, avaliou-se a formação do edema e a temperatura da pata conforme descrito no itens 4.9.1.1 e 4.9.1.2.

4.9.3 Nocicepção induzida por prostaglandina E₂

A avaliação da nocicepção induzida por PGE₂ foi conforme descrito por KASSUYA et al. (2007). Após aclimatação dos animais por 1 hora na sala de experimentação, os mesmos foram tratados com EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.). Transcorridos 30 min após o tratamento os animais foram transferidos para as câmaras de acrílico e ao completar 1 hora, receberam injeção i.pl. de 20 µL de PGE₂ (3 nmol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção de PGE₂ os camundongos foram imediatamente recolocados na câmara de acrílico e durante 15 minutos foram observados, sendo que a quantidade de tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi considerado como indicativo de nocicepção.

Adicionalmente, após o término do teste da nocicepção induzida por PGE₂, avaliou-se a formação do edema e a temperatura da pata conforme descrito no itens 4.9.1.1 e 4.9.1.2.

4.9.4 Nociceção induzida por histamina

A nociceção induzida por histamina (100 nmol/pata) foi similar ao descrito previamente por SHIMEI et al. (2004). Transcorrido o tempo de aclimação dos animais na sala de experimentação, os mesmos foram tratados com EHP (300 mg/kg, ig.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.). Após 30 min do tratamento os animais foram transferidos para as câmaras de acrílico e ao completar 1 hora, receberam injeção i.pl. de 20 µL histamina na superfície ventral da pata posterior direita, sendo imediatamente recolocados na câmara de acrílico, onde permaneceram em observação por 60 minutos. O comportamento de lambedura ou mordida é indicativo de nociceção.

Adicionalmente, após o término do teste da nociceção induzida por histamina, avaliou-se a formação do edema e a temperatura da pata conforme descrito no itens 4.9.1.1 e 4.9.1.2.

4.9.5 Nociceção induzida por PMA (meristato de acetato forbol)

Com o objetivo de avaliar o efeito do EHP na sinalização nociceptiva via PKC, foi investigado seu efeito sobre a nociceção induzida pelo PMA (ativador da PKC). Os experimentos foram realizados como previamente descritos por BAGGIO et al. (2012). Após aclimação dos animais por 1 hora na sala de experimentação, os mesmos foram tratados com EHP (300 mg/kg, ig.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.). Transcorridos 30 min após o tratamento os animais foram transferidos para as câmaras de acrílico e ao completar 1 hora, receberam injeção i.pl. de 20 µL de PMA (500 pmol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção de PMA os camundongos foram imediatamente recolocados na caixa de acrílico e observados durante o período dos 15 aos 45 minutos pós injeção, sendo que a quantidade de tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi considerado como indicativo de nociceção.

Adicionalmente, após o término do teste da nociceção induzida por PMA, avaliou-se a formação do edema e a temperatura da pata conforme descrito no itens 4.9.1.1 e 4.9.1.2.

4.9.6 Nociceção induzida por forskolina

Com objetivo de avaliar o efeito do EHP na sinalização nociceptiva via PKA, foi utilizado o modelo de nociceção induzida por forskolina, um ativador da adenilato ciclase. Os animais, previamente aclimatados por 1 hora na sala de experimentação, foram tratados com veículo (10 mL/kg, ig.) ou EHP (300 mg/kg, i.g.), após 30 min de tratamento foram transferidos para câmaras de acrílicos onde aguardaram até completar 1 hora de tratamento, quando então receberam na superfície ventral da pata posterior direita uma injeção de 20 μ L de forskolina (50 nmol/pata)(SIMÕES, et al., 2016). Após a injeção de forskolina os animais foram recolocados nas câmaras de acrílico e o tempo que permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por 10 minutos, sendo utilizado como indicativo de nociceção.

4.9.7 Nociceção induzida por capsaicina

O modelo de nociceção induzida por capsaicina (1,6 μ g/pata) proporciona a ativação direta dos nociceptores, através da estimulação de receptores do tipo TRPV1, provocando a liberação de neuropeptídios nos terminais periféricos e centrais, o que contribui para a dor neurogênica (SAKURADA, T. *et al.*, 1992). Os animais foram previamente aclimatados por 1 hora na sala de experimentação, em seguida, foram tratados com extrato de própolis (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), após 30 minutos foram acondicionados individualmente em câmaras de acrílico. Transcorridos uma 1 hora do tratamento, receberam 20 μ L de capsaicina na superfície ventral da pata posterior direita, sendo imediatamente recolocados na câmara de acrílico. O tempo em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado durante 5 minutos, sendo esse tempo considerado como indicativo de nociceção (SANTOS, CALIXTO, 1997).

4.9.8 Nocicepção induzida por trans-cinamaldeído

O modelo de nocicepção induzida por trans-cinamaldeído (10 nmol/pata), um agonista dos receptores TRPA1, induz comportamento em que os animais lambem a pata injetada com o agente nociceptivo. O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente (SANTOS, CALIXTO, 1997; ANDRADE et al., 2008). Os animais previamente aclimatados na sala de experimentação, foram tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.), 30 minutos após o tratamento foram transferidos para as câmaras de acrílico e ao completar uma hora do tratamento receberam 20 µL de trans-cinamaldeído (10 nmol/pata) na superfície ventral da pata posterior direita, sendo imediatamente recolocados na câmara de acrílico. O tempo em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada com cinamaldeído foi cronometrado durante 5 minutos, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

4.9.9 Nocicepção induzida por salina ácida

O modelo de nocicepção induzida por salina ácida (pH=5,0) tem como objetivo avaliar o envolvimento de canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs). O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por MEOTTI, COELHO, SANTOS, (2010). Os animais foram previamente aclimatados por 1 hora na sala de experimentação, em seguida, foram tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.), após 30 minutos do tratamento foram transferidos para câmaras de acrílico e ao completar 1 hora do tratamento receberam 20 µL de uma solução de salina ácida (pH=5,0; salina acidificada com ácido acético) na superfície ventral da pata posterior direita, sendo imediatamente recolocados na câmara de acrílico. O tempo em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante 15 minutos, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.10.1 Teste do edema de orelha induzido por xileno

O modelo de edema induzido na orelha de camundongos por xileno, é utilizado na pesquisa da atividade de agentes anti-inflamatórios de uso tópico, respondendo à administração sistêmica de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais. A inflamação provocada pelo xileno induz a liberação de substâncias bioativas liberadas dos terminais periféricos de neurônios sensoriais que agem sobre células alvos periféricas, tais como mastócitos e outras células do sistema imune, produzindo inflamação neurogênica caracterizada por calor, rubor, edema e hipersensibilidade (RICHARDSON, VASKO, 2002).

Experimentalmente, após 1 hora de tratamento i.g. com EHP (100-1000 mg/kg), os animais receberam topicamente 25 µL de xileno em ambas as faces (dorsal e ventral) da orelha direita. Na orelha esquerda o animal recebeu apenas veículo (salina). Transcorrido 1 hora após a aplicação do xileno, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e uma porção de 5 mm de diâmetro das orelhas direita e esquerda de cada camundongo foi retirada para quantificação do edema. As porções retiradas foram pesadas e a diferença de peso entre as orelhas representa o efeito provocado pelos tratamentos sobre o processo inflamatório induzido pelo xileno (KOU et al, 2005).

4.10.2 Modelo da peritonite induzida por carragenina

Os testes de avaliação da atividade anti-inflamatória estão baseados na habilidade da substância testada inibir os efeitos causados pela injeção de um agente flogístico, entre eles a carragenina, formalina, albumina de ovo e lêvedo de cerveja (LE BARS, GOZARIU, CADDEENN et al, 2001).

O modelo da peritonite induzida por carragenina (polissacarídeo de algas da família das Rhodophyceae) está baseado no aumento da migração celular e da concentração de citocinas pró-inflamatórias nos exsudatos. Sendo, portanto, um modelo utilizado para avaliar possíveis agentes anti-inflamatórios (PAGANO et al, 2002).

4.10.2.1 Indução da Peritonite

A indução experimental da peritonite ocorreu pela injeção de 500 µL carragenina (1%) na cavidade peritoneal direita, através do espaço intercostal, sendo que no grupo controle foi injetado apenas salina. Uma hora antes da indução da peritonite os animais foram pré-tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.), salina (10 mL/kg, i.g.) ou dexametasona (5 mg/kg, i.g.).

Após quatro horas da indução os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, receberam intraperitonealmente uma injeção de 2 mL de PBS:Heparina (20 UI/mL), a região foi levemente massageada (por 5 segundos), e fixados em mesa cirúrgica em declive (30- 45°), onde foi realizada uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o volume de líquido peritoneal foi coletado com auxílio de pipetas automáticas e aliqotado para posterior determinação do número total, contagem diferencial de células e determinação de citocinas.

4.10.2.2 Contagem total e diferencial das células

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio óptico (aumento de 400 vezes), sendo que para isso foi feita uma diluição prévia de 10 µL de exudato em 190 µL de líquido de Turk. Para a contagem diferencial de células, 200 µL de exudato foi citocentrifugado em lâminas (Cytospin-Ttharmac, Alemanha) e posteriormente coradas com May-Grünwald Giemsa, para realização da avaliação microscópica.

4.10.2.3 Quantificação de citocinas

Para a quantificação de citocinas os exsudatos foram centrifugados a 3000 x g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes obtidos armazenados a -80 °C até a análises. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando uma curva padrão de calibração com albumina de soro bovino (BSA) (0,05 a 0,5 mg/mL). Os níveis de citocinas IL-17, IL-6 e IL-10, foram

quantificados através da técnica de Elisa, utilizando-se para isso kits da R & D Systems (Minneapolis, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações das citocinas foram mensurados pela interpolação de uma curva padrão por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) no leitor de placa (Multileitora Infinite M200 TECAN) os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância de uma ou duas vias, conforme a aplicação, seguido do teste de Tukey e/ou Bonferroni para múltiplas comparações ou, ainda, teste t-Student e análise de regressão não-linear, ANOVA de uma e duas vias, quando aplicável. Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

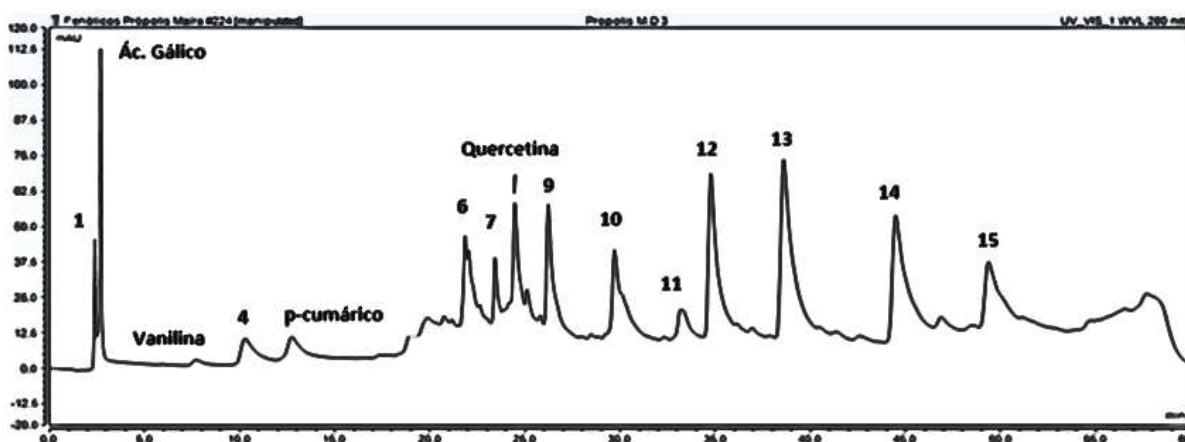
5.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EHP

5.1.1 Análise cromatográfica dos constituintes do EHP

5.1.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

A análise cromatográfica de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (DAD) do EEP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* (Figura 10) revelou a presença de ácido gálico, vanilina, ácido p-cumárico e quercetina (Figura 11), sendo os tempos de retenção: 2,68; 7,67; 12,73 e 24,45 min, respectivamente.

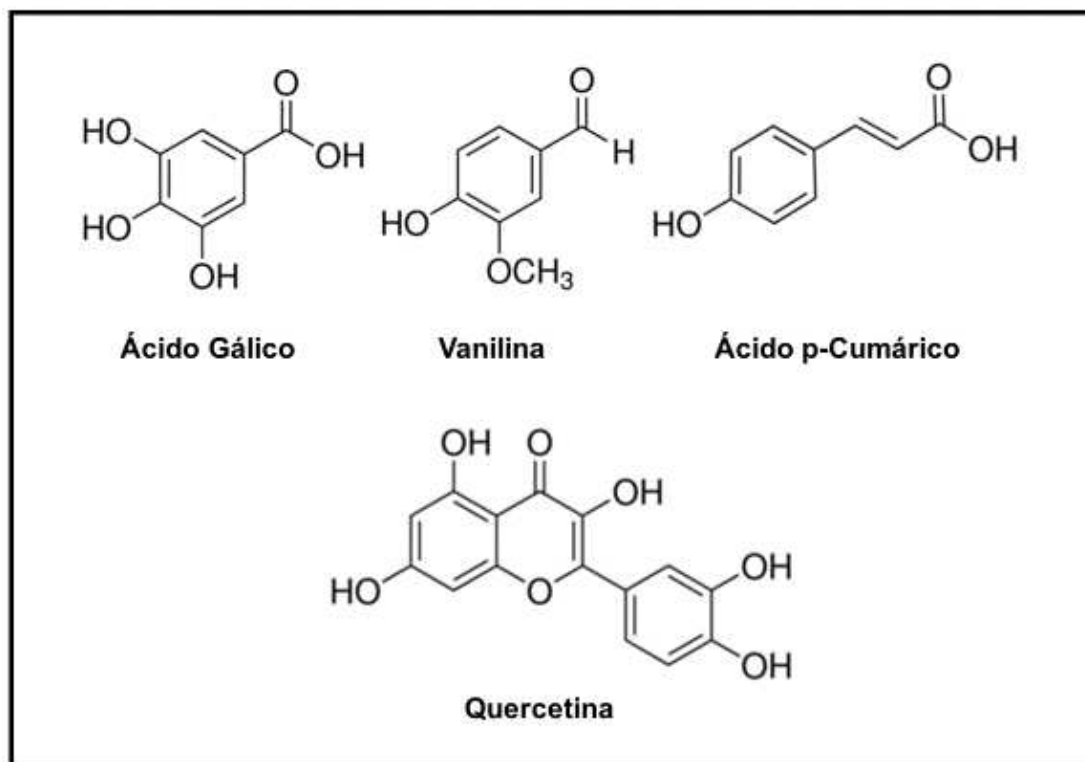
Figura 10 – CLAE-DAD do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*.



HPLC-DAD (280 nm) cromatogramas do extrato hidroalcoólico do própolis usando coluna C-18 de fase reversa (BioBasic-18, 150 mm x 4.6mm Ø, 5 µm) à temperatura de 40 °C. Eluição de 10 µL de amostra com eluente A (0,5% (v/v) ácido fórmico) e eluente B (metanol) como segue: 0 – 10 min, 15 % B; 10 – 55 min, aumento gradual até 70% B; e 55-60 min, redução a 15% B. Fluxo de 0,8 ml/min. Picos: 2-Ácido Gálico (Rt=2,68min); 3- Vanilina (Rt=7,67min); 5-Ácido-p-Cumárico (Rt=12,73min); 8-Quercetina (Rt=24,45min).

Fonte: Próprio autor (2018)

Figura 11 – Estruturas químicas dos constituintes do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* identificados através de CLAE-DAD



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/gallicacid1701214991711?lang=pt®ion=BR>
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/vanillin1521512133511?lang=pt®ion=BR>;
<http://www.fcencias.com/2014/02/20/acido-p-cumarico-molecula-da-semana>;
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/q4951?lang=pt®ion=BR>;
 Acessados em 16/02/2018.

5.1.1.2 Cromatografia por UPLC-MS/MS-ESI-QTOF

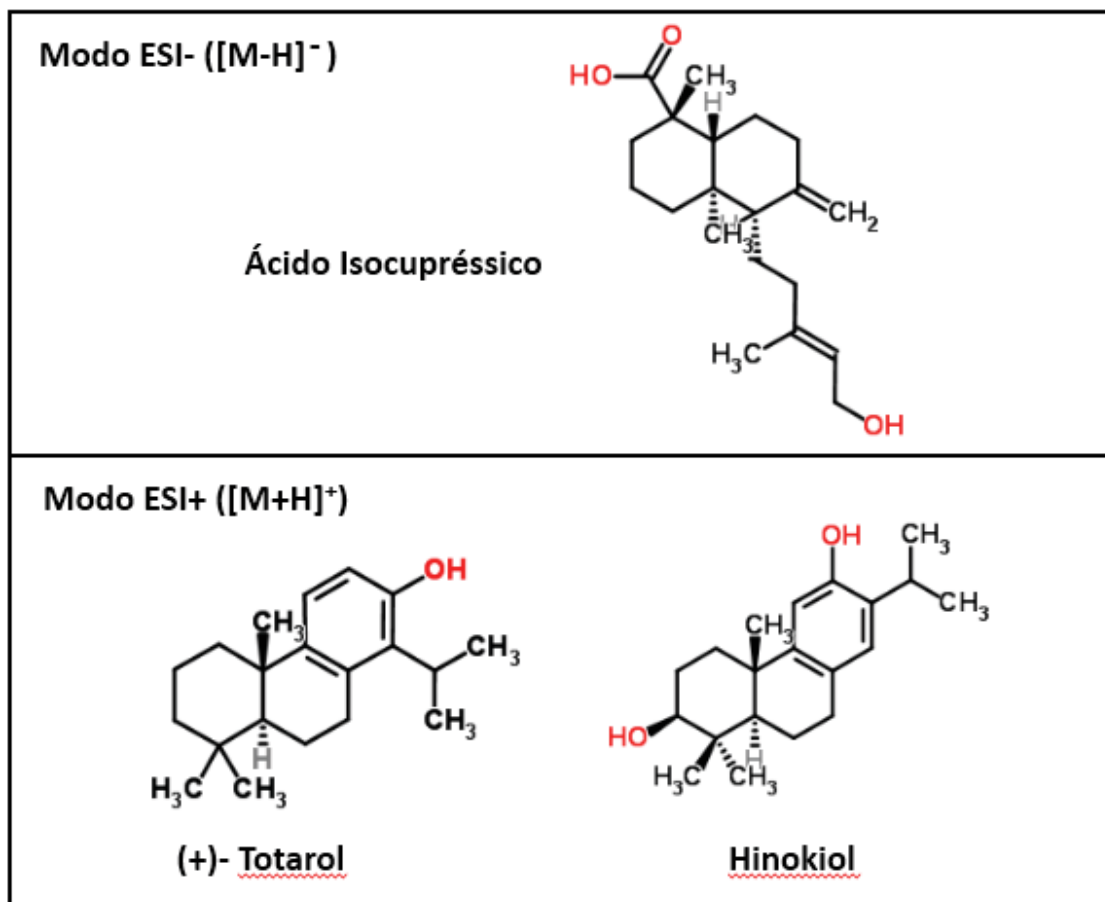
As análises de UPLC-ESI-QTOF-MS/MS demonstraram uma boa separação dos constituintes do EHP de própolis da *M. quadrifasciata quadrifasciata*. A análise no modo de ionização negativo e positivo (Tabela 5A e B) revelou a presença de 26 substâncias diterpênicas como constituintes majoritários, sendo que destes 17 foram passíveis de caracterização. A identificação baseada na literatura, mostrou que além de diterpenos, ocorrem na própolis derivados sesquiterpenos, triterpenos, estilbenos e polifenóis.

O componente majoritário detectado no modo de ionização negativo, m/z 319.2274 [$C_{20}H_{32}O_3-H$] (t_R 6,95 min) foi identificado como ácido isocuprêssico (BANSKOTA et al., 1998)(Figura 12), sendo que somente dois fragmentos foram obtidos deste precursor (m/z 231.1707 e 300.2069). O fragmento m/z 300.2069 corresponde a perda da espécie neutra H_2 e do radical OH , enquanto que o outro foi

encontrado após considerar a descarboxilação (perda de CO₂), a eliminação de CH₄ e C₂H₄, resultando na abertura de um dos anéis esquerdo da porção decaída.

A estrutura do hinokiol, 3β-hidroxitotarol ou totara-8,11,13-trien-7α,13-diol (ENZELL, WAHLBERG, 1970; PETTIT et al., 2004; WANG et al., 2008) foi proposta como composto majoritário detectado no modo positivo em 6,95 min (m/z 303.2305: [C₂₀H₃₀O₂+H]⁺)(Figura 12). De fato, os três compostos poderiam perder sucessivamente duas moléculas de H₂O para gerar m/z 285.2242 [M+H-H₂O]⁺ e m/z 267,2139 [M+H-2H₂O]⁺, respectivamente. O seu fenol poderia também isomerizar-se em uma cetona e uma constrição de anel poderia ocorrer por eliminação de monóxido de carbono para dar m/z 255,2142 [M+H-H₂O-CO]⁺. Além disso, uma porção de isopropileno poderia também ser eliminada do precursor m/z 255,2142 produzindo m/z 215,1833 [M+H-H₂O-CO-C₃H₆]⁺.

Figura 12 – Constituintes majoritários do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* identificados através de UPLC-MS/MS-ESI-QTOF



Fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.83757.html>
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10263967.html>
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4942630.html>,

Tabela 5A – Identificação dos compostos do EHP própolis do *M. quadrifasciata quadrifasciata* através da técnica UPLC-MS/MS ESI-QTOF/análises de espectrometria de massa, no modo de ionização negativo.

ESI- ([M-H] ⁻)						
t _R (min)	Peso Molecular (m/z)	Massa Calculada (m/z)	Fórm. Molecu- lar	Fragmentos (m/z)	Estrutura proposta	Referência
4.38	351.2158	351.2171	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	315.1925, 275.1635	Diterpeno não identificado	-
4.71	291.1586	291.1596	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	273.1490, 245.1571, 229.1601, 213.1283	Pinusenocarpin	Yang et al., 2010.
4.82	353.2303	353.2328	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	307.1854, 137.0555	Diterpeno não identificado	-
5.01	351.2159	351.2171	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	-	Diterpeno não identificado	-
5.15	335.2220	335.2222	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	317.2103, 299.1998	Diterpeno não identificado	-
5.34	335.2220	335.2222	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	317.2103, 299.1998	Ácido Junicédrico ou salvicina	Popova et al., 2009.; Nurmukha-medova et al., 1986. Zhang et al., 2013.
5.48	331.1913	331.1909	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	313.1810, 269.1823, 255.1380, 227.1429	Inumakiol D	-
5.67	333.2073	333.2066	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	315.1997, 291.1516, 271.1957, 287.1947	Diterpeno não identificado	-
5.92	335.2220	335.2222	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	-	Diterpeno não identificado	-
6.25	335.2220	335.2222	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	-	Diterpeno não identificado	-
6.77	333.2073	333.2066	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	-	Diterpeno não identificado	-
6.95	319.2274	319.2273	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	300.2069, 231.1707	Ácido Isocuprêssico	Banskota et al.(1998)
7.36	317.2103	317.2117	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	299.1998, 271.1856, 221.1538	Ácido Agatálico	Banskota et al.(1998)
7.50	317.2103	317.2117	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	299.1998, 287.1987, 273.2234, 271.2092, 257.1837, 255.2166, 253.2015	Ácido 15-oxolabda-8(17),13Z-diene-19-oico ou ácido 15-oxolabda-8(17),13E-diene-19-oico ou ácido agatálico	Popova et al. (2009); Banskota et al.(1998)
7.65	315.1961	315.1960	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	297.1837, 271.2058, 255.1740, 241.1614, 253.1523, 229.1725	Diterpeno não identificado	-
8.21	317.2103	317.2117	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	-	-	-
8.68	265.1479	265.1440	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	-	Sesquiterpeno não identificado	-
9.45	347.2197	347.2222	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	-	Ester metílico do 15-ácido agático	Banskota et al., 1998.
11.28	301.2157	301.2171	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	-	Ácido trans-comunico ou ácido pimárico	Popova et al., 2009.

Fonte: Próprio autor (2018).

Tabela 5B – Identificação dos compostos do EHP do própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* através da técnica UPLC-MS/MS ESI-QTOF/análises de espectrometria de massa, no modo de ionização positivo.

ESI+ ([M+H] ⁺)						
t _R (min)	Peso Molecular (m/z)	Massa Calculada (m/z)	Fórm. Molecu- lar	Fragmentos (m/z)	Estrutura proposta	Referência
5.34	277.1797	277.1804	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	231.1765, 213.1663, 203.1448, 185.1337, 173.1366, 161.1361, 157.1044, 139.1122, 121.1042, 123.0836, 109.0668	Composto não identificado	-
5.52	214.0898	214.0868	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	-	Composto não identificado	-
5.67	317.2115	317.2117	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	299.2058, 271.2100, 253.1992, 243.2157, 215.1474, 211.1528, 193.1362, 189.1311, 175.1145, 149.0993, 123.1199	Diterpeno não identificado	-
5.74	369.1685	369.1702	C ₂₂ H ₂₄ O ₅	351.1666, 336.1406, 324.1434, 320.1465, 311.1331, 305.1243, 298.1244, 283.1008, 268.1139, 255.1065, 231.1081, 201.0952	Polifenol não identificado	-
6.36	299.2023	299.2011	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	284.1822, 255.2174, 238.1778, 211.1528, 197.1362	Diterpeno não identificado	-
6.95	303.2305	303.2324	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	285.2144, 267.2139, 257.2272, 215.1833, 201.1677	Hinokiol, or 3β- hidroxitotarol ou totara-8,11,13- trien-7α,13-diol	Enzell e Wahlberg (1970) Wang et al., 2008.
7.36	301.2183	301.2168	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	283.2144, 255.2140, 199.1512, 185.1365, 173.1339	Ácido Angustanóico A	Sy e Brow (1998)
7.50	301.2183	301.2168	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	283.2144, 255.2140, 199.1512, 185.1365, 173.1339	Relativo ao ácido Angustanóico A	-
7.91	315.1970	315.1960	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	271.2100, 227.1460, 213.1305, 199.1137, 187.1145, 175.1145, 171.0843, 149.0993	Éster metílico de Artepelin C	-
8.09	327.1584	327.1596	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	-	(E)-4-(3-metil-2- buten-1-il)-3,3',5- trihidroxi-4'- metoxistilbeno ou (E)-2-(3- metil-2-buten-1- il)-3',4',5- trihidroxi-3- metoxistilbeno	Duke et al., 2012.

Tabela 3B - Continuação

ESI+ ([M+H] ⁺)						
t _R (min)	Peso Molecular (m/z)	Massa Calculada (m/z)	Fórm. Molecu- lar	Fragmentos (m/z)	Estrutura proposta	Referência
8.35	327.1584	327.1596	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	-	Relacionado (E)- 4-(3-metil-2- buten-1-il)-3,3',5- trihidroxi-4'- metoxistilbeno	Duke et al., 2012.
8.53	287.2378	287.2375	C ₂₀ H ₃₀ O	-	trans-totarol ou trans-communal	Popova et al., 2009.
9.48	301.1403	301.1416	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	-	Composto não identificado	-
9.56	303.2305	303.2324	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	-	Composto não identificado	-
10.47	173.1339	173.1330	C ₁₃ H ₁₆	-	Composto não identificado	-
11.83	303.2305	303.2324	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	257.2305, 255.2142, 201.1677, 187.1508, 173.1366, 149.1343, 135.1183, 123.1199	Relacionado ao ácido <i>trans</i> - comunico ou ácido pimarico	Popova et al., 2009.
13.19	579.5339	579.5328	C ₃₇ H ₇₀ O ₄	-	Composto não identificado	-
13.74	579.5339	579.5328	C ₃₇ H ₇₀ O ₄	-	Composto não identificado	-
13.96	441.3735	441.3733	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	-	24(E)-3β- hidroxícicloart- 24-ene-26-al	Li et al., 2009.

Fonte: Próprio autor (2018).

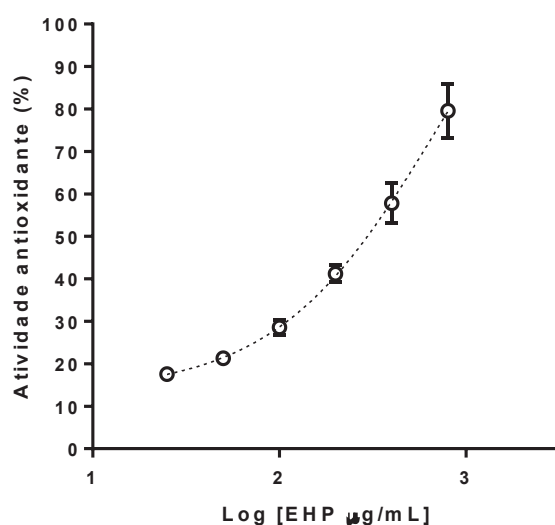
5.1.2 Determinação do conteúdo de compostos Fenólicos Totais e Flavonoides

O conteúdo de fenóis totais e flavonóides do EHP foi determinado por métodos quimiométricos e expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) e equivalentes de quercetina (EQ), respectivamente. A concentração mensurada de fenóis totais foi de $3,87 \pm 0,32$ mg de equivalentes de ácido gálico/g de própolis e de flavonoides, $0,14 \pm 0,03$ mg de equivalentes de quercetina/g de própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata*.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante através do sequestro de radicais livres pelo DPPH (Figura 13), foi calculada por método de regressão não-linear. O EHP apresentou atividade antioxidante concentração-dependente, sendo a IC_{50} = 241,8 (203,1 a 287,7) $\mu\text{g/mL}$.

Figura 13 – Determinação da atividade antioxidante (IC_{50})



Efeito do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* no sequestro de radicais livres de DPPH. Valor médio de IC_{50} obtido por regressão não-linear IC_{50} =241,8 $\mu\text{g/ml}$ (203,1-287,7). Dados de três experimentos independentes realizados em triplicata.
Fonte: Próprio autor (2018).

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada através do método de microdiluição em caldo (Figura 14), segundo descrito no CLSI M07-A9 (2012). Os valores da CIM do EHP obtidos para bactérias Gram-positivas e Gram negativas encontram-se na Tabela 6. O EHP foi em média duas vezes mais ativo frente às bactérias gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA) do que as gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*).

Figura 14 – Imagem representativa do ensaio de determinação do CIM do EHP para cepa de *S. aureus*

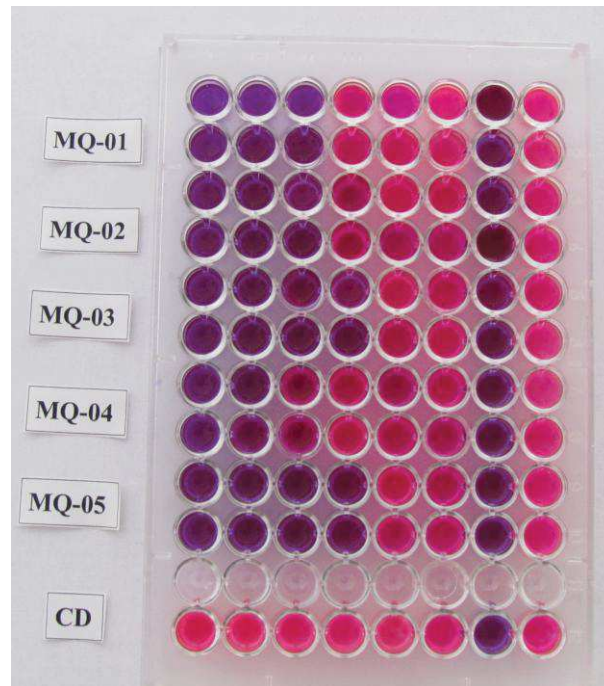


Foto representativa da análise de determinação do CIM. Na horizontal: duplicata de cinco amostras diferentes de *M. quadrifasciata quadrifasciata* (MQ-01 a MQ-05) e controle do diluente de amostra (CD); Na vertical: 1ª coluna (EHP 8 mg/mL); 2ª coluna (EHP 4 mg/mL)...6ª coluna (EHP 0,25 mg/mL); 7ª coluna, controle negativo (esterilidade do meio); e 8ª coluna, controle positivo (viabilidade do inóculo). Após 24 horas de incubação à 37°C, adicionou-se 30 µL do indicador de crescimento resazurina (0,01%). Aguarda-se 30 minutos para realização da leitura visual: cor roxa, indica inibição do crescimento bacteriano e rosa indica crescimento bacteriano. Para cada bactéria testada foi realizado cinco experimentos independentes.

Fonte: Próprio autor (2018).

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (em mg/mL) do EHP frente as bactérias estudadas

Bactérias/Espécie	<i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> CIM (mg/mL)	
<u>Gram-positivas</u>		
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	3,84
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	1,26
<i>S. aureus</i> MRSA	Isolado Clínico	1,56
<u>Gram-negativas</u>		
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	7,72
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	5,44

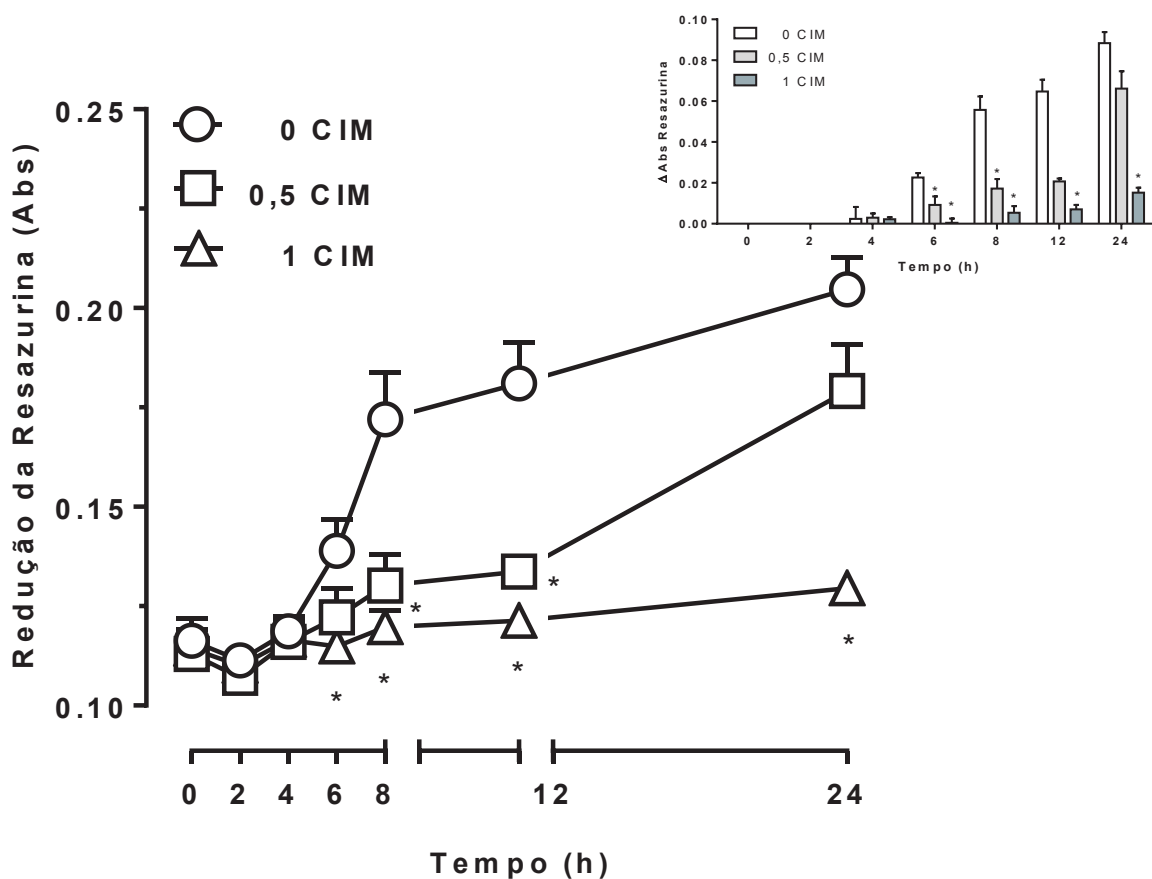
Resultados expressos através da media \pm E.P.M. de cinco experimentos independentes. ATCC (American Type Culture Collection) e isolado clínico (Departamento de Análises Clínicas da Univ. Federal de Santa Maria).

Fonte: Próprio autor (2018).

5.3.2 Efeito do EHP sobre a curva de crescimento bacteriano: *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922)

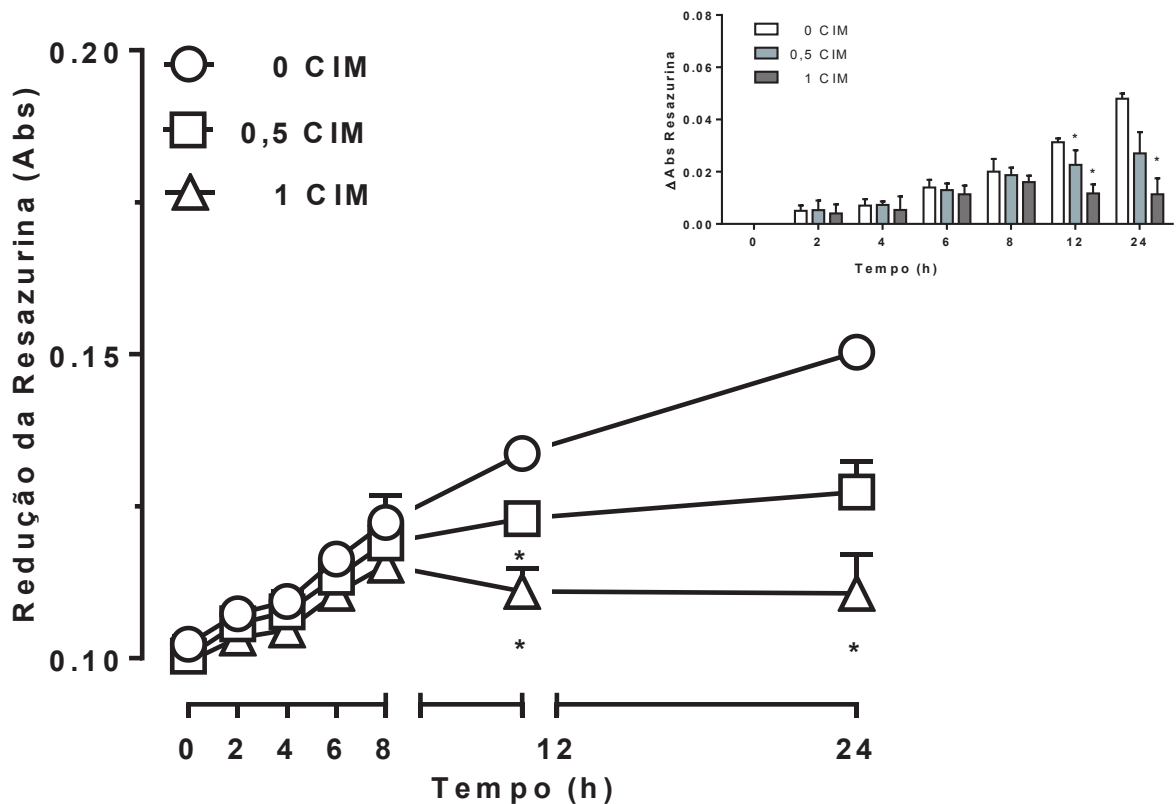
O efeito do EHP (1CIM) sobre o crescimento bacteriano do *S. aureus* (ATCC 25923) e da *E. coli* (ATCC 25922) ao longo do tempo, foi determinado através do estudo da curva de crescimento bacteriano. As figuras 15A e B, mostram que o efeito inibitório do EHP sobre o crescimento do *S. aureus* e da *E. coli* é tempo dependente, sendo que para *S. aureus* a inibição do crescimento é evidente a partir de 6h de incubação. Enquanto que para *E. coli*, o mesmo efeito só é observado após 12 h de incubação com o extrato.

Figura 15A – Efeito do EHP (1 CIM, 1,26 mg/mL) no crescimento do *S. aureus* (ATCC 25923) em função do tempo.



Medida da absorbância do indicador de crescimento (Resazurina, 550 nm), ao longo do tempo. Os valores representam a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0.05$ comparado com respectivo controle (0 CIM). No detalhe, é mostrado a diferença das absorbâncias obtida para cada concentração em relação ao tempo zero. Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 15B – Efeito do EHP (1CIM, 7,72 mg/mL) no crescimento da *E. coli* (ATCC 25922) em função do tempo.



Medida da absorvância do indicador de crescimento (Resazurina, 550 nm), ao longo do tempo. Os valores representam a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0.05$ comparado com respectivo controle (0 CIM). No detalhe, é mostrado a diferença das absorvâncias obtida para cada concentração em relação ao tempo zero. Fonte: Próprio autor (2018).

5.3.3 Efeito do EHP sobre liberação do conteúdo intracelular bacteriano: *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922)

Para avaliar o efeito do EHP sobre a estrutura da membrana bacteriana foi realizado a quantificação da liberação de constituintes intracelulares para o meio reacional. Os resultados apresentados na Tabela 7, mostram que o EHP (1CIM) incubado com *S. aureus* e *E. coli*, aumentou 6,6 e 5,5 vezes, respectivamente, a liberação de constituintes celulares para o meio reacional. Demonstrando que o EHP pode causar danos irreversíveis a membrana bacteriana, sendo esse um dos mecanismos envolvidos na morte celular.

Tabela 7 – Efeito do EHP da *M. quadrifasciata quadrifasciata* no teste de liberação dos constituintes celulares de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), após 4 h de incubação.

Cepas Bacterianas	Liberação de constituintes celulares (OD _{260 nm})		Liberação Relativa (EHP/Controle)
	Controle Negativo	EHP (1 x CIM)	
<i>S. aureus</i>	0,041 ± 0,004	0,260 ± 0.033 ***	6,61 ± 1,211
<i>E. coli</i>	0,149 ± 0,017	0,811 ± 0.054 ****	5,65 ± 0,585

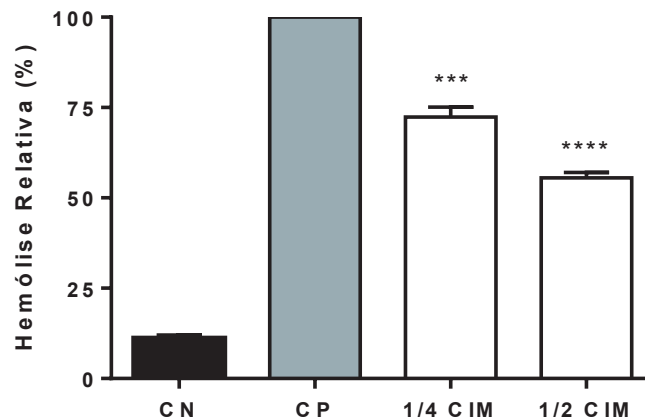
Os valores representam a média ± E.P.M. de três experimentos independentes, realizados em triplicata. ***p=0,0006 e ****p<0,0001 em comparação aos respectivos grupos controle. Fonte: Próprio autor (2018).

5.3.4 Efeito do EHP sobre a atividade hemolítica por *S. aureus* (ATCC 25923)

A produção de hemolisinas e biofilme são alguns dos fatores de virulência que contribuem para patogenicidade do *S. aureus*. Na Figura 16 pode-se observar o efeito da hemólise causada por *S. aureus* incubado na presença ou ausência de EHP. Os valores obtidos para o *S. aureus* incubado na ausência de extrato foram considerados como controle da atividade hemolítica (100%). A atividade hemolítica do *S. aureus* foi significativamente menor quando incubado na presença de concentrações subinibitórias de EHP, ¼ e ½ da CIM, apresentando um percentual de hemólise de 72,4% e 55,5%, respectivamente, em comparação ao controle (100%).

Um decréscimo na atividade hemolítica na ordem de 27,6% e 44,5%, respectivamente às doses de ¼ e ½ da CIM.

Figura 16 – Efeito do EHP sobre a atividade hemolítica do *S. aureus* (ATCC 25923)



A coluna preta representa os valores obtidos para o meio de cultura suplementado com sangue de carneiro incubado na ausência de bactéria (CN). A coluna cinza os valores obtidos para o meio de cultura suplementado com sangue de carneiro incubado com *S. aureus* (CP, 100% de hemólise). Demais colunas representam o efeito da incubação de concentrações subinibitórias de EHP (1/4 e 1/2 de CIM) sobre o meio de cultura suplementado com sangue de carneiro incubado na presença de *S. aureus* (25923). Os valores representam a média \pm E.P.M. de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado com o Controle Positivo. Fonte: Próprio autor (2018).

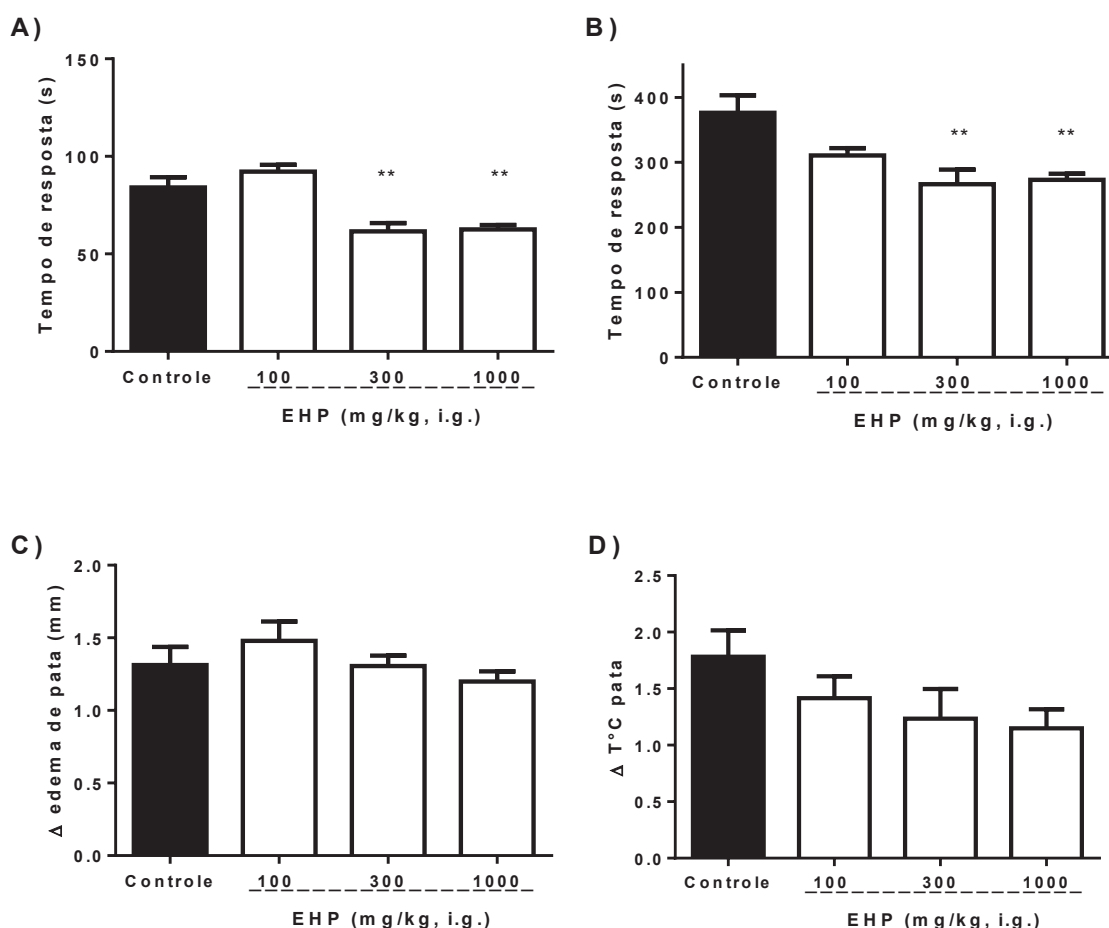
5.4 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

5.4.1 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por formalina

Os dados deste estudo mostram que o EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) reduziu a resposta nociceptiva na fase neurogênica do teste da formalina apenas nas doses 300 e 1000 mg/kg (Figura 17A), correspondendo a uma inibição máxima de $27 \pm 5\%$, e 26 ± 3 , respectivamente, em comparação ao controle. Na fase da dor inflamatória (Figura 17B), o EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) reduziu a nocicepção nas doses de 300 e 1000 mg/kg, mostrando uma inibição máxima de $29 \pm 6\%$ e $27 \pm 3\%$, respectivamente, quando comparado ao controle. Em relação a formação do edema e a temperatura das patas dos animais (Figura 17C e D), o EHP não exerceu nenhum efeito significativo sobre os parâmetros mensurados.

Para determinar o decurso temporal do efeito antinociceptivo do EHP na dor inflamatória, cinco grupos de camundongos foram tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg) e submetidos ao teste da formalina nos tempos 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas, sendo que a atividade antinociceptiva do EHP foi observada nos tempo de 0,5, 1, 2 e 4ª hora após o tratamento, com inibições de 39 ± 3 , 34 ± 8 , 36 ± 2 e $22\pm 1\%$, respectivamente (Figura 18), sendo que o efeito foi completamente extinto na 6ª hora após o tratamento.

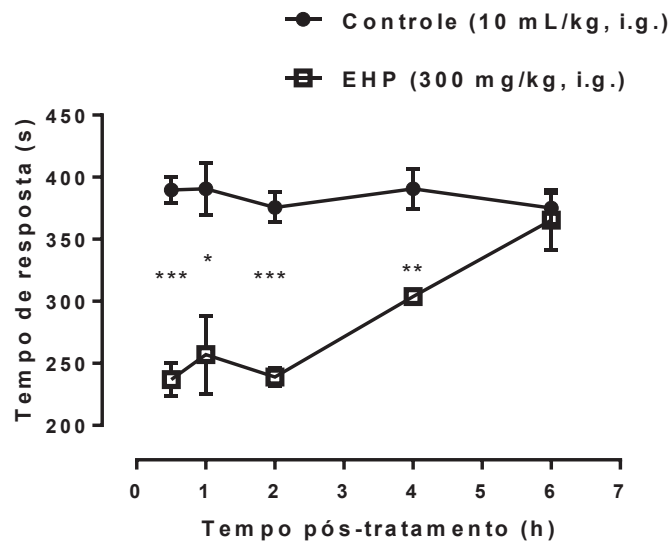
Figura 17 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por formalina



Avaliação do EHP sobre a fase neurogênica (A) e fase inflamatória (B) do teste da formalina. Os valores do grupo controle (colunas pretas) representam os animais tratados com veículo (10ml/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de formalina na pata posterior direita. Enquanto que as colunas brancas representam os animais que receberam EHP (100-1000mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de formalina. Em (C) e (D), a avaliação do tratamento sobre a temperatura e o edema da pata, respectivamente. Os valores representam a média de 6 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via, seguida do teste de Benferroni), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 18 – Decurso temporal do efeito antinociceptivo do EHP na fase inflamatória do teste da formalina



Avaliação do decurso temporal do efeito antinociceptivo do EHP (300 mg/kg, i.g.) sobre a fase inflamatória do teste da formalina. Os valores do grupo controle (círculos) representam os animais tratados com veículo (10mL/kg, i.g.), enquanto que os quadrados representam os animais tratados com extrato, ambos tratamentos realizados 1 hora antes da injeção de formalina na pata posterior direita. Os valores representam as médias de 3- 4 animais por grupo. As linhas verticais indicam o E.P.M de cada grupo. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste *t*-Student não pareado, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

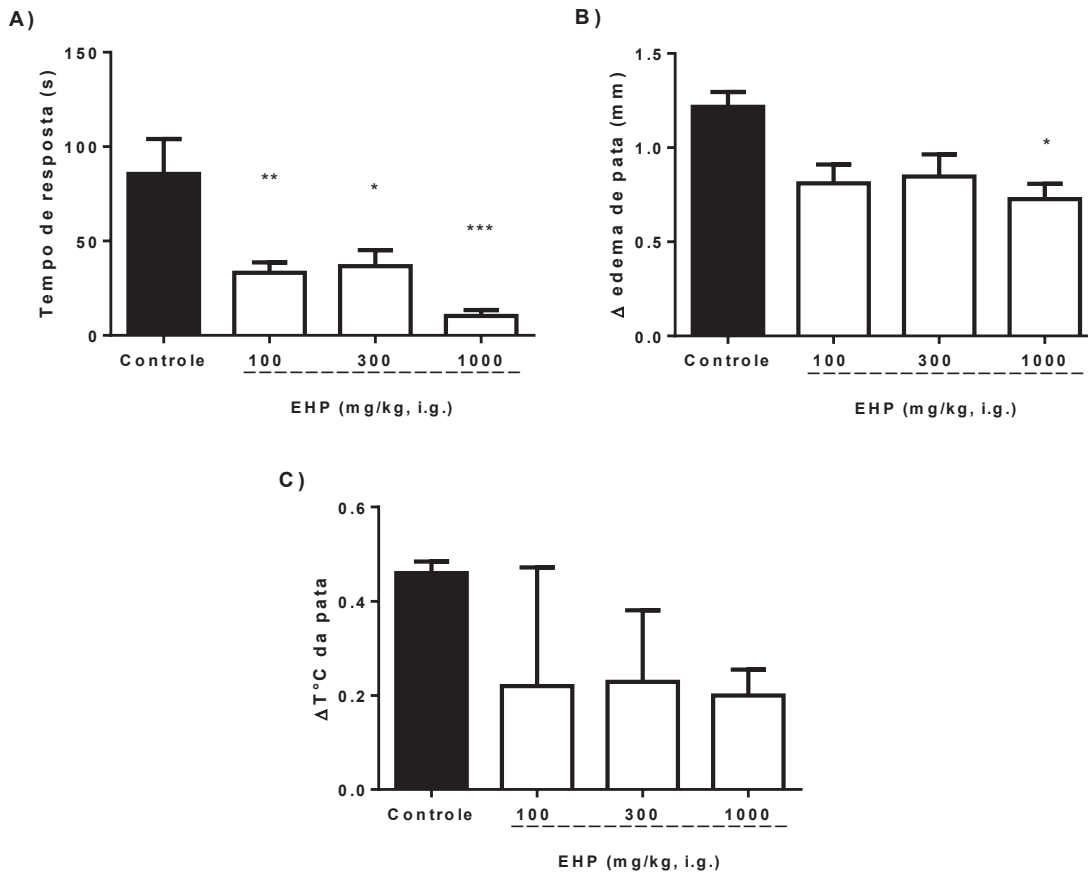
5.4.2 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por bradicinina

A nocicepção induzida por bradicinina (10 nmol/20 μ L) foi prevenida por todas as doses de EHP (100-1000 mg/kg, i.g.), sendo que o EHP apresentou inibição de 61 \pm 6; 57 \pm 10 e 88 \pm 4%, para as doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 19A).

Apenas a dose de 1000 mg/kg foi capaz de diminuir o edema nesse teste, alcançando a diminuição máxima de 40 \pm 7% do edema, em comparação ao controle (Figura 19B). Não houve alteração na temperatura das patas para nenhuma das doses

testadas (Figura 19C).

Figura 19 – Efeito do EHP sobre a nociceção induzida por bradicinina



Os valores do grupo controle representam os animais tratados com veículo (10ml/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de bradicinina, 10 nmol/20μL na pata posterior direita. Enquanto que os demais receberam EHP (100-1000 mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de bradicinina. Em A, tempo de resposta ao estímulo nociceptivo, B delta do edema da pata e C, delta da temperatura das pata. Os valores representam a média de 5-8 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$).

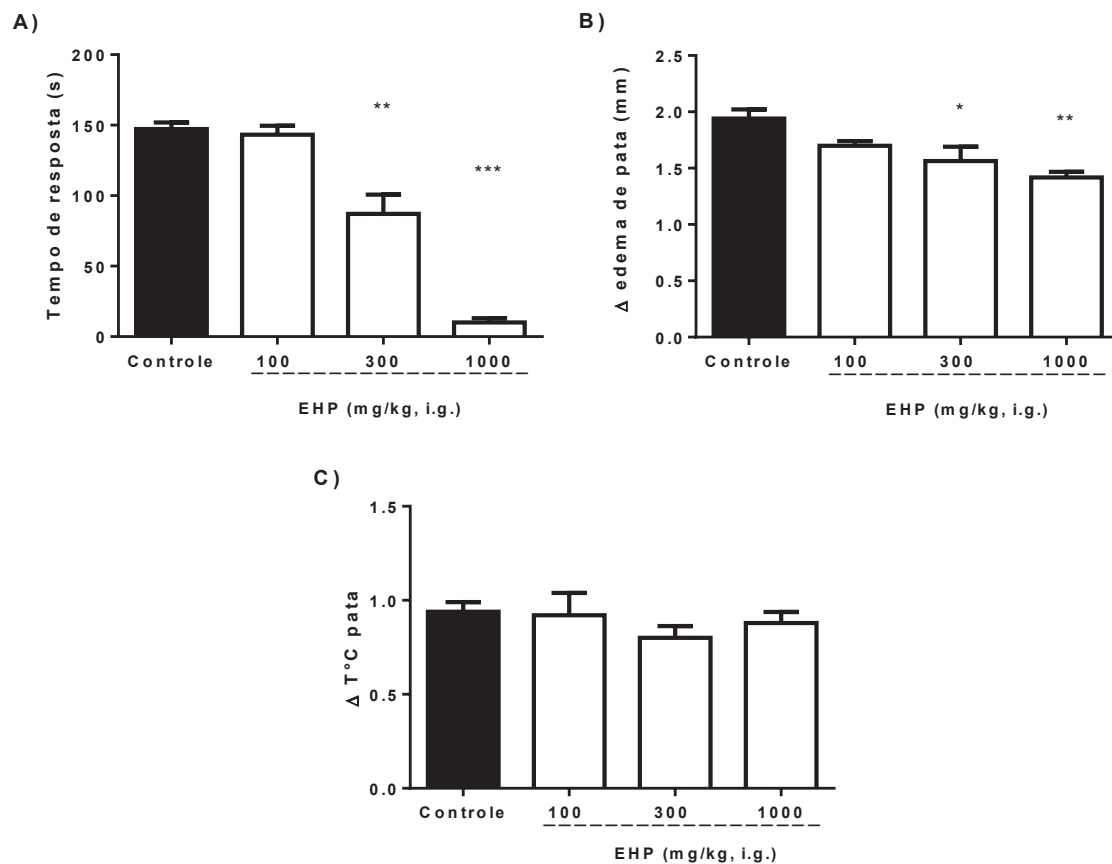
Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.3 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por prostaglandina E₂

Os resultados mostram que o EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) diminuiu a nocicepção induzida por 3 nmol/20 μ L de PGE₂ nas doses de 300 e 1000 mg/kg, denotando uma inibição significativa de 41 \pm 9 e 93 \pm 2%, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 20A). Com relação ao edema da pata, o EHP mostrou inibição de 25 \pm 7 e 27 \pm 3%, nas doses de 300 e 1000 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 20B).

Não houve diferença na temperatura da pata dos animais em nenhuma das doses testadas (Figura 20C).

Figura 20 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por PGE₂



Os valores do grupo controle representam os animais tratados com veículo (10ml/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de PGE₂ na pata posterior direita. Enquanto que os demais receberam EHP (100-1000 mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de PGE₂. Em A, o tempo de resposta ao estímulo nociceptivo, B delta do edema da pata e C, delta da temperatura da pata. Os valores representam a média de 5

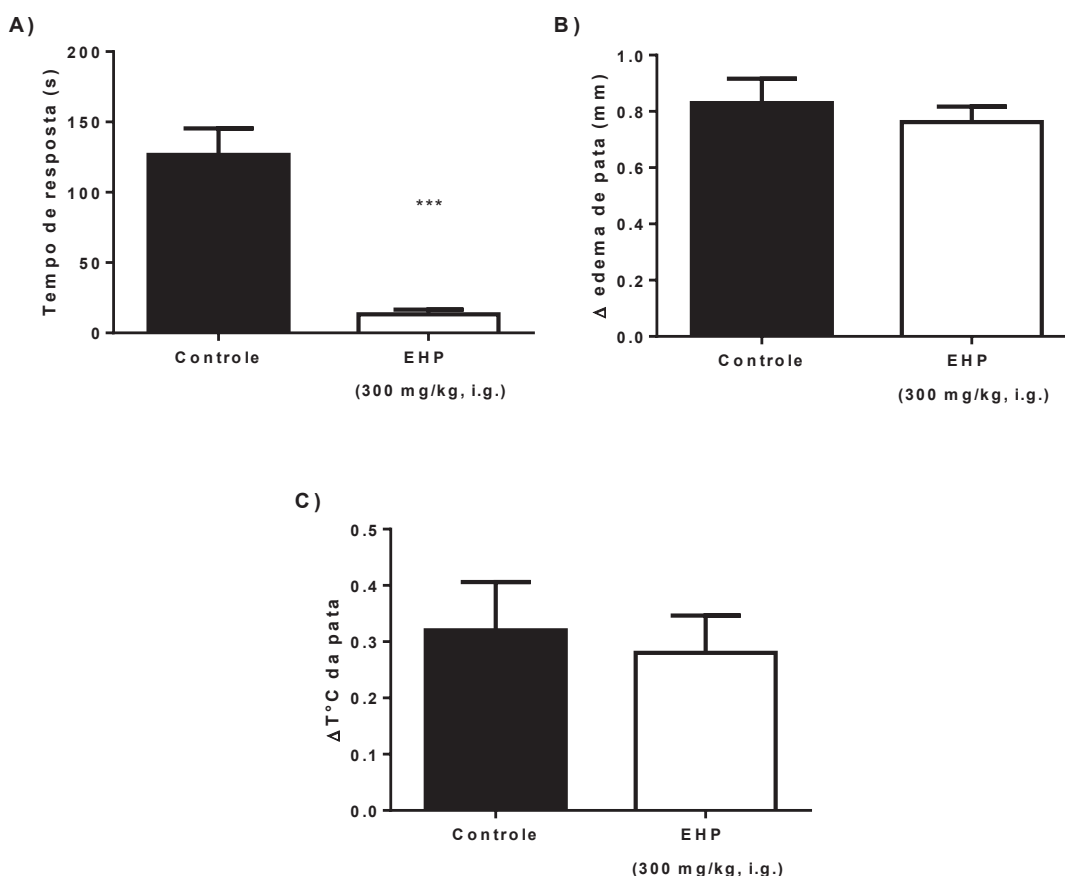
animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.4 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por histamina

O EHP 300 mg/kg (i.g.) diminuiu significativamente a nocicepção induzida por histamina (100 nmol/20 μ L), apresentando uma inibição máxima de $90 \pm 3\%$, quando comparado ao controle (Figura 21A), porém, sem alterar a formação do edema e a temperatura da pata (Figuras 21B e C).

Figura 21 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por histamina



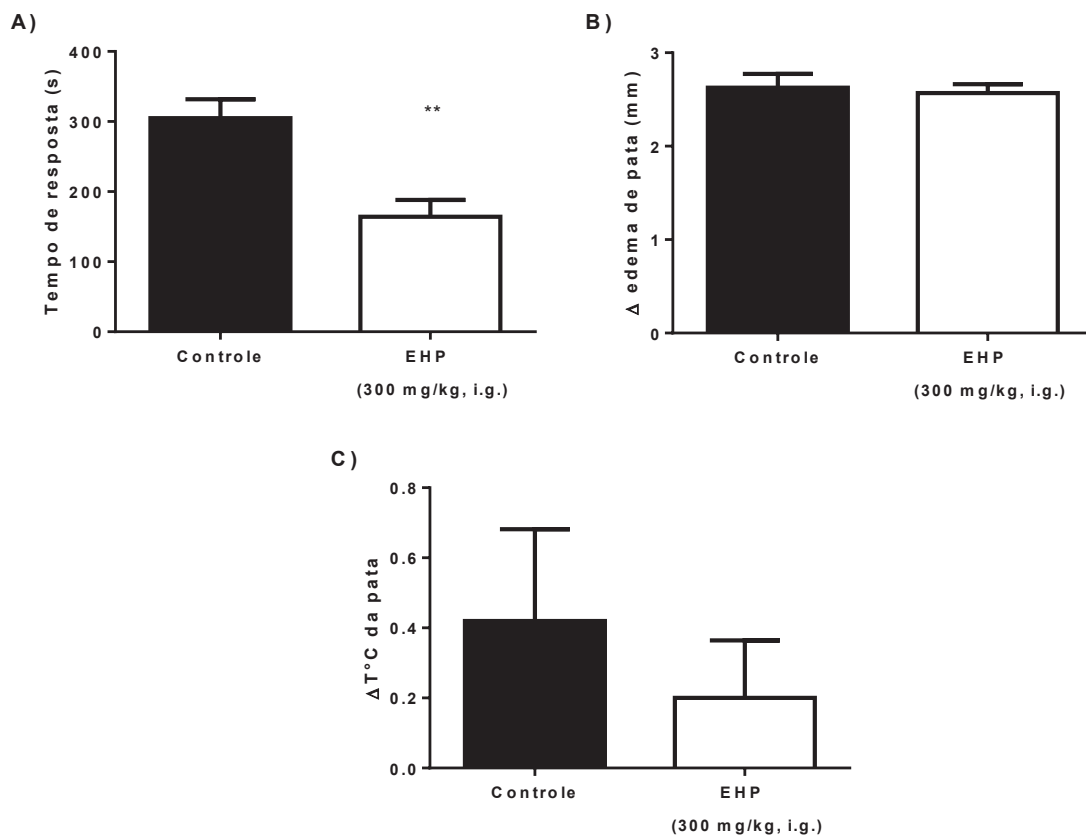
Os valores do grupo controle representam os animais tratados com veículo (10ml/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de histamina, 100 nmol/20 μ L na pata posterior direita. Enquanto que os demais receberam EHP (300 mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção da histamina. Em A, tempo de resposta ao estímulo nociceptivo; B edema da pata e C, delta da temperatura das patas. Os valores representam a média de 5 animais por grupo. As linhas verticais indicam o E.P.M. de cada grupo. Teste *t*-Student não pareado. Diferença significativa quando comparado ao grupo controle (** $p = 0,001$).

Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.5 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por PMA

O EHP (300 mg/kg, i.g.) diminuiu a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 500 pmol/20 μ L de PMA, um ativador da PKC, em 46 \pm 8%, em comparação ao controle (Figura 22). A dose testada (300 mg/kg) não alterou a formação de edema (Figura 22B) e tampouco a temperatura (Figura 22C).

Figura 22 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por PMA



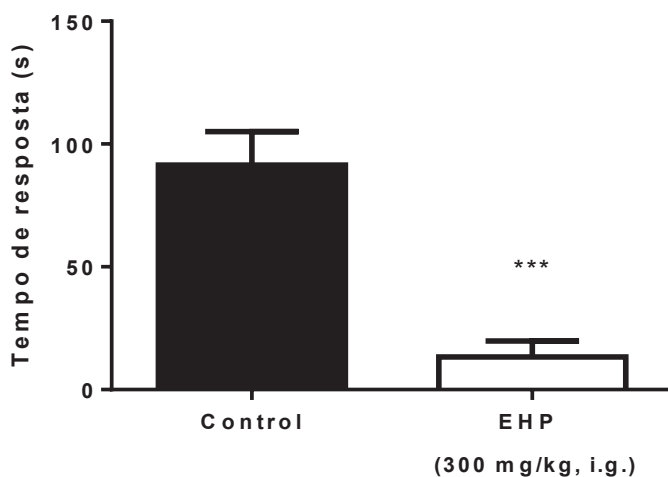
Os valores do grupo controle representam os animais tratados com veículo (10 mL/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção de PMA, 500 pmol/20 μ L na pata posterior direita. Enquanto que os demais receberam EHP (100-1000 mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção do PMA. Em A, tempo de resposta ao estímulo nociceptivo; B edema da pata e C, delta da temperatura das patas. Os valores representam a média de 5 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste *t*-Student não pareado. **p*=0,001).

Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.6 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por forskolina

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com 300 mg/kg, i.g. de extrato hidroalcoólico de própolis inibiu a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de forskolina, apresentando inibição máxima de $85\pm 7\%$, quando comparado ao controle (Figura 23).

Figura 23 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por forskolina

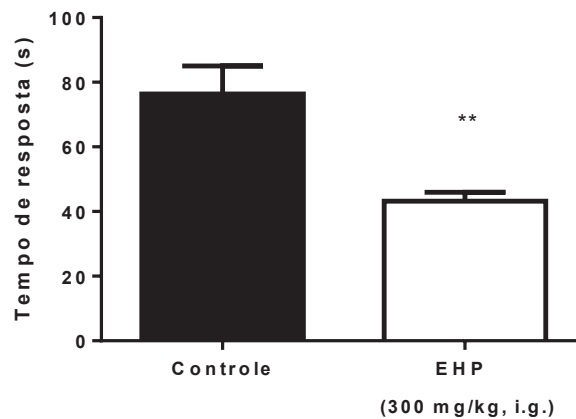


Efeito do EHP (300 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido por forskolina injetada na pata traseira dos camundongos. As colunas representam as médias dos valores obtidos de 5-6 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste *t*-Student não pareado. * $p < 0,001$).
Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.7 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por capsaicina

Os resultados mostram que o pré-tratamento com 300 mg/kg, i.g. de extrato de própolis reduziu a nocicepção induzida por injeção intraplantar de capsaicina, apresentando uma inibição máxima de 43 ± 4 %, quando comparado ao controle (Figura 24).

Figura 24 – Efeito do EHP sobre a nocicepção induzida por capsaicina



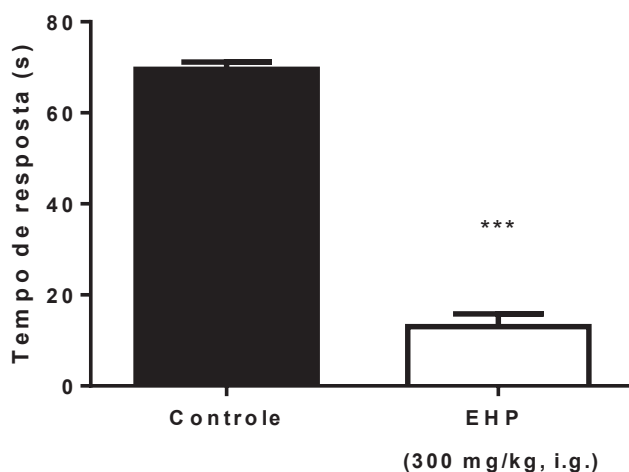
Efeito do EHP (300 mg/kg, i.g.) na nocicepção induzida por capsaicina injetada na pata traseira dos camundongos. Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 6 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste *t*-Student não pareado. $*p < 0,01$).

Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.8 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por trans-cinamaldeído

A nocicepção induzida por injeção intraplantar de trans-cinamaldeído (10 nmol/20µL) foi reduzida pela pré-administração de EHP (300 mg/kg, i.g.), quando comparado ao controle, que recebeu apenas veículo (Figura 25). Sendo que a dose testada apresentou uma inibição máxima de 81±4%.

Figura 25 – Nocicepção induzida por trans-cinamaldeído

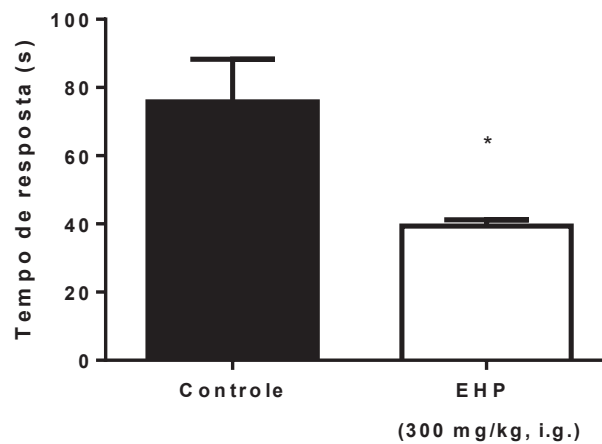


Efeito do EHP (300 mg/kg, i.g.) na nocicepção induzida por trans-cinamaldeído injetado na pata traseira dos camundongos. Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 5-6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste *t*-Student não pareado. *** $p < 0,001$).
Fonte: Próprio autor (2018).

5.4.9 Efeito do EHP sobre o comportamento nociceptivo induzido por salina ácida

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com 300 mg/kg, i.g. de extrato de própolis inibiu a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida, apresentando inibição máxima de 48 ± 2 %, quando comparado ao controle (Figura 26).

Figura 26 – Efeito do EHP sobre a nocicepção por salina ácida



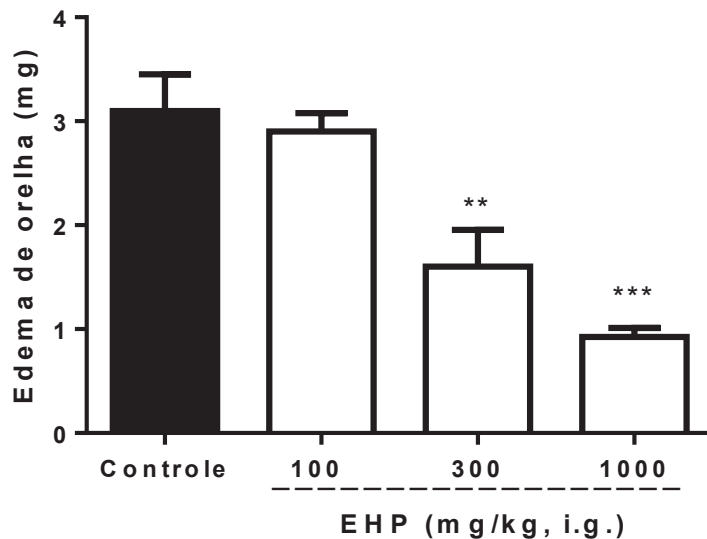
Efeito do EHP (300 mg/kg, i.g.) no comportamento nociceptivo induzido por salina ácida (pH=5,0) injetado na pata traseira dos camundongos. Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 5 animais por grupo e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste *t*-Student não pareado. * $p < 0,05$).
Fonte: Próprio autor (2018).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.5.1 Efeito do EHP a formação de edema induzido pela aplicação tópica de xileno

Os resultados mostram que o pré-tratamento com EHP (100-1000 mg/kg, i.g.) mostrou significativa diminuição da atividade inflamatória induzida topicamente por xileno nas doses de 300 e 1000 mg/kg, com inibição de 48 ± 11 e $70\pm 2\%$, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 27).

Figura 27 – Teste do edema de orelha induzido por xileno



Efeito do EHP sobre a atividade inflamatória induzida topicamente por xileno na orelha de camundongos. A coluna preta corresponde ao grupo controle, animais tratados com veículo uma hora antes de receberem topicamente a aplicação de xileno. As colunas brancas correspondem aos animais tratados i.g. com EHP (100-1000 mg/kg) e posteriormente (1 hora após), receberam a aplicação de xileno. Cada coluna representa a média dos valores obtidos de 4-5 animais. As linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor (2018).

5.5.2 Efeito do EHP sobre parâmetros inflamatórios na peritonite induzida por carragenina

Os resultados obtidos comprovaram o efeito flogístico da carragenina, sendo que os animais injetados com carragenina e tratados com veículo (V) apresentaram aumento nos parâmetros inflamatórios em relação ao grupo controle (injetados com salina e tratados com veículo, C) (Figura 28 A - D). A dexametasona foi utilizada como anti-inflamatório padrão e apresentou resultados de acordo com o esperado segundo sua classe farmacológica.

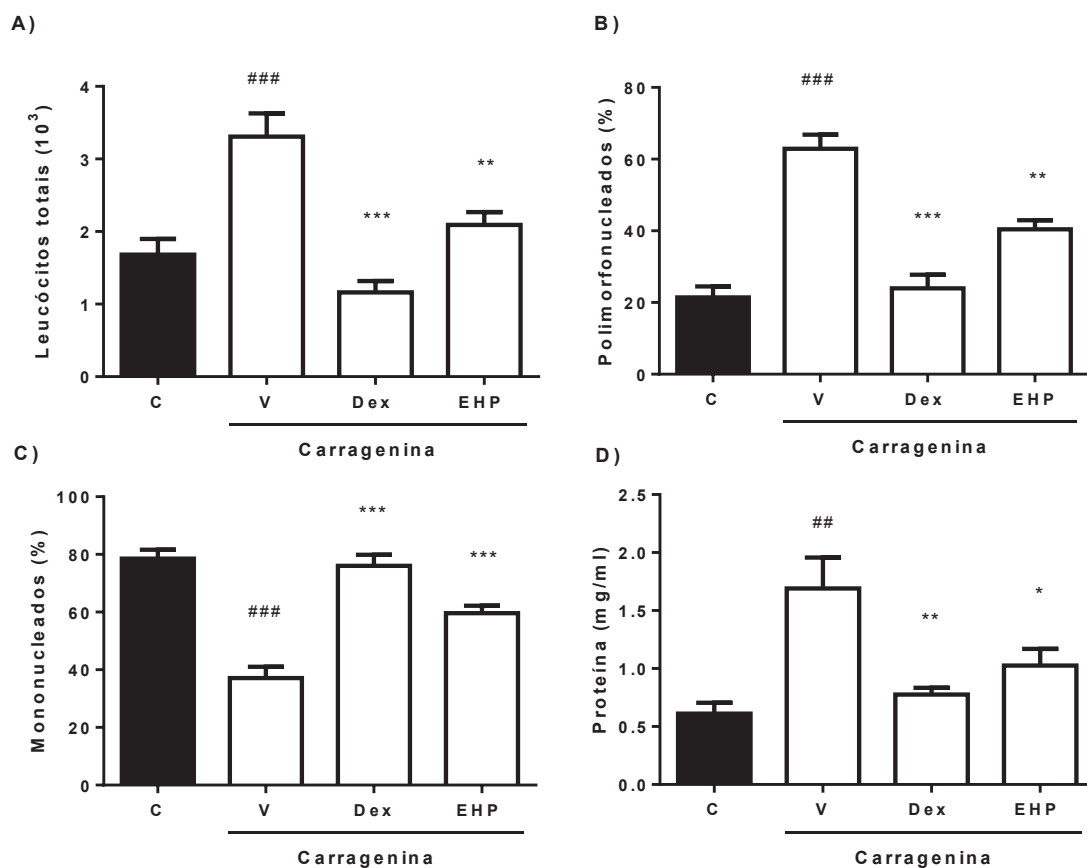
Os resultados mostram que o tratamento com EHP reduziu o número total de leucócitos no lavado peritoneal. Sendo que a contagem de leucócitos totais para os animais injetados com carragenina (1%) e tratados com veículo (V) foi de 3.310 leucócitos, enquanto que, os tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.) apresentaram 2.092 leucócitos no lavado peritoneal, uma diminuição de $36,8 \pm 7\%$ em comparação ao grupo veículo (Figura 28A).

Também causou uma mudança do perfil celular do lavado peritoneal, diminuindo o percentual de polimorfonucleados de 62,9% nos animais injetados com carragenina e tratados com veículo (V), para 42,8% nos animais que receberam carragenina e tratados com EHP (300 mg/kg, i.g.) (Figura 28B). Estes resultados foram acompanhados pelo aumento das células mononucleadas, que passou de 37,1% nos animais do grupo veículo (V) para 57,2% no grupo EHP (Figura 28C).

O tratamento com EHP (300 mg/kg, i.g.) também causou uma diminuição na exudação de proteínas, que passou de 1,69 mg/mL no grupo veículo para 1,02 mg/mL no grupo EHP, uma diminuição de 39,6% (Figura 28D).

Em seguida foi quantificado os níveis de IL-10, IL-17 e IL-6 no lavado peritoneal. O grupo tratado com EHP (300 mg/kg, i.g.) apresentou um aumento superior a 34,02 vezes na quantidade de IL-10 (545,7 pg/mg de proteína) em comparação ao grupo veículo (16,0 pg/mg proteína), efeito superior ao obtido no grupo tratado com dexametasona (365,4 pg/mg) que foi de aproximadamente 22,78 vezes em relação ao grupo veículo (Figura 29 A).

Figura 28 – Efeito do EHP sobre os parâmetros celulares e quantidade de proteína na peritonite induzida por carragenina



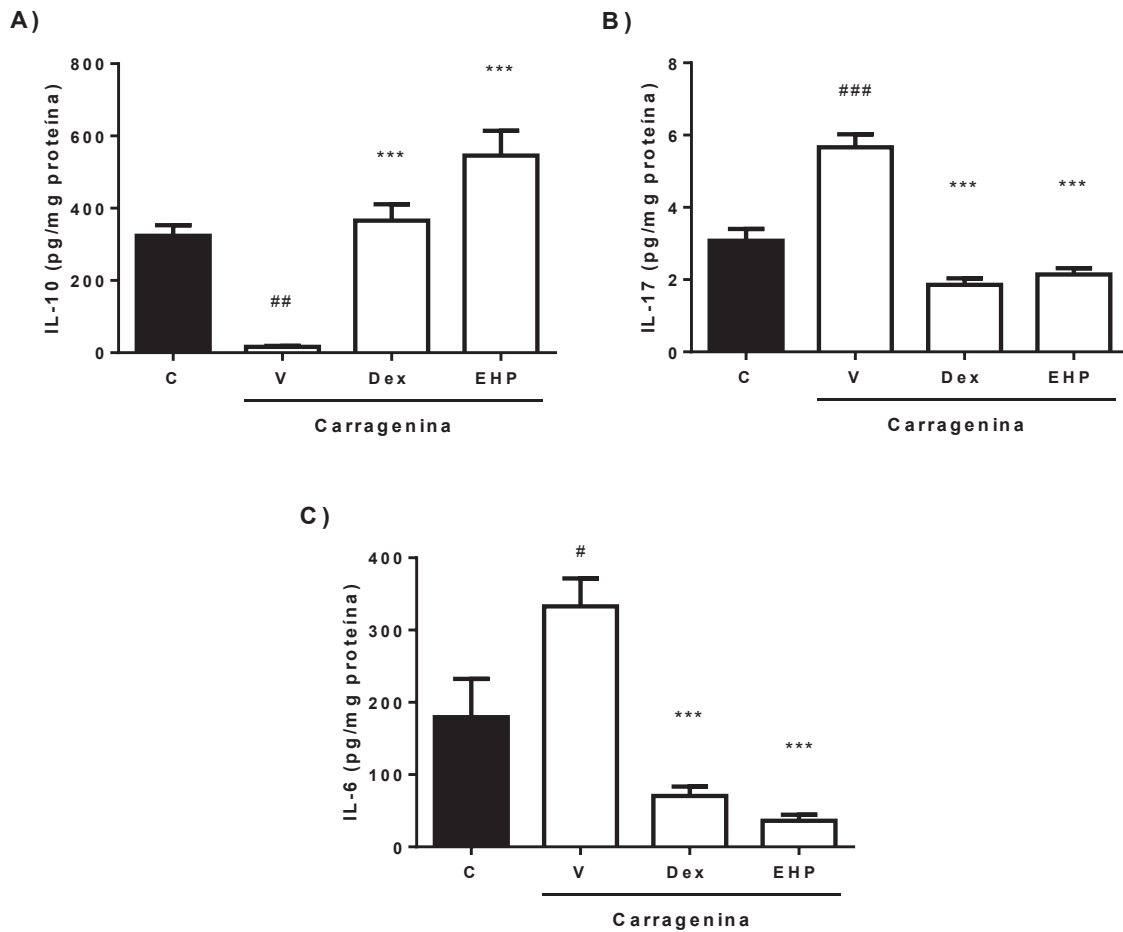
Efeito da administração i.g. de EHP (300 mg/kg) sobre a peritonite induzida por carragenina (1%) comparado aos grupos controle, veículo e dexametazona, observando o número de leucócitos totais (A), o percentual relativo de células polimorfonucleadas (B), o percentual relativo de células mononucleadas (C) e o conteúdo de proteína no lavado peritoneal após 4 horas da indução do processo inflamatório. Cada grupo representa a média 5-6 animais e as barras verticais os E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo veículo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). A cerquilha denota o nível de significância quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni), ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$.

Fonte: Próprio autor (2018).

Por sua vez, o tratamento com EHP (300 mg/kg, i.g.) diminuiu as concentrações de IL-17 (2,14 pg/mg de proteína), em comparação ao grupo veículo (5,66 pg/mg de proteína), uma diminuição de $62 \pm 3\%$ (Figura 29B), perfil de resultado acompanhado pela IL-6, que passou de 332,7 pg/mg de proteína no grupo veículo para 36,2 pg/mg de proteína no grupo tratado com EHP (300 mg/kg, i.g.), uma diminuição correspondente a $89 \pm 1\%$ (Figura 29C). Valores semelhantes ao obtidos no grupo

tratado com dexametasona, onde a concentração de IL-17 (1,85 pg/mg de proteína) e IL-6 (70,6 pg/mg de proteína), correspondeu a uma diminuição de $67\pm 4\%$ e $79\pm 4\%$, respectivamente, em comparação ao grupo veículo.

Figura 29 – Efeito do EHP sobre a produção de interleucinas (IL-10, IL-17 e IL-6) na peritonite induzida por carragenina



Efeito da administração i.g. de EHP (300 mg/kg) sobre a peritonite induzida por carragenina (1%) comparado aos grupos controle, veículo e dexametazona, observando os níveis de IL-10 (A), IL-17 (B) e IL-6 (C) após 4 horas da indução do processo inflamatório. Cada grupo representa a média 5-6 animais e as barras verticais os E.P.M. Os asteriscos simbolizam uma diferença significativa em relação ao grupo veículo ($*p<0,05$, $**p<0,01$ e $***p<0,001$). A cerquilha denota o nível de significância quando comparado ao grupo controle. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni), # $p<0,05$, ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$.

Fonte: Próprio autor (2018).

6. DISCUSSÃO

A literatura apresenta muitos estudos sobre o uso empírico do própolis na medicina popular para o tratamento de diferentes doenças, que por sua vez estimulou muitos pesquisadores a investigar suas propriedades bioativas e os mecanismos implicados em seus efeitos. No entanto, a multiplicidade de estudos publicados refere-se basicamente ao própolis de *Apis mellifera* (SANTOS et al., 2017). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo determinar a composição química e identificar os efeitos antioxidante, antimicrobiano, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico do própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata*. A análise química do EHP revelou como constituintes majoritários estruturas pertencentes a classe dos diterpenóides, sesquiterpenoides, triterpenoides, estilbenos e polifenóis. Os resultados do presente estudo mostram que o EHP do própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* apresenta atividade antioxidante e efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, o EHP apresentou importante efeito preventivo da nocicepção e inflamação, quando administrado pela via intragástrica, sendo capaz de reduzir os estímulos álgicos e inflamatórios, atuando sobre diferentes vias sinalizadoras.

O efeito mais proeminente do EHP, em média duas vezes mais potente contra bactérias Gram-positivas que Gram-negativas, mostrado na determinação da CIM (Tabela 6), concorda com estudos prévios que demonstram que o própolis de abelhas sem ferrão (CAMPOS et al., 2014; MIORIN et al., 2003; LIBERIO et al., 2011), assim como o própolis de *A. mellifera* (SILVA et al., 2012) apresentam maior atividade contra cepas Gram-positivas. A capacidade do EHP inibir o crescimento contra cepas de *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) torna-se particularmente interessante diante do cenário recrudescente de resistência de *S. aureus* (SMITH & COAST, 2013).

Para analisar o efeito do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* contra *S. aureus* e *E. coli* ao longo de tempo, um ensaio de curva de crescimento foi realizado na presença de três concentrações do EHP (0, 0,5 e 1 CIM), o qual evidenciou que *S. aureus* foi mais suscetível ao EHP que a *E. coli*. Sendo que a inibição do crescimento de *S. aureus* ocorreu a partir da 6ª hora de incubação, enquanto que o mesmo efeito só foi observado para *E. coli* após a 12ª hora de incubação (Figuras 15A e B).

Embora alguns autores atribuam a atividade bacteriostática e bactericida do própolis à inibição de síntese de proteína e inibição da divisão celular (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2005; OKUZ et al., 2005), a natureza e a complexidade do própolis torna difícil identificar um mecanismo de ação específico. Neste contexto, foi realizado o ensaio de liberação de constituintes celulares, para investigar se a ação antimicrobiana do EHP se daria através deste mecanismo, isto é, ruptura da membrana bacteriana evidenciada pela liberação de partículas de ácidos nucleicos (260 nm) para o meio reacional. Este ensaio revelou uma liberação significativa de componentes intracelulares, tanto para o *S. aureus*, quanto para a *E. coli*, quando incubados com EHP (1 CIM), mostrando que o EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* causa lise bacteriana, sendo esse um dos mecanismos envolvidos na morte celular (Tabela 7).

A produção de hemolisinas contribuem para gravidade das infecções estafilocócicas, uma vez que, as hemolisinas causam danos as células de defesas (KWAK, et al 2010). Os ensaios realizados demonstraram que concentrações subinibitórias de EHP diminuíram a hemólise, indicando uma possível ação sobre a produção de hemolisinas (Figura 16).

Para elucidar a composição química do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* foram realizadas análises de CLAE-DAD (Figura 11), onde foi possível identificar a presença de ácido gálico, quercetina e ácido p-cumárico. E posteriormente realizou-se a análise de UPLC-MS/MS que demonstrou a presença de 26 esqueletos diterpenóides como componentes majoritários, que com base na literatura foi possível identificar 17 estruturas (Tabelas 5A e B). Entre estes, os seguintes compostos são particularmente pertinentes: $C_{20}H_{30}O_2+H$, que pode ser um derivativo do Hinokiol ou Totarol; $C_{20}H_{32}O_3-H$, do ácido Isocupressico e, ainda, $C_{20}H_{26}O_3$, um ester metílico de Artepelin C.

A presença de totarol e seus derivados é consistente com os resultados antibacterianos anteriormente descritos. O totarol, é um diterpeno altamente hidrofóbico com alto coeficiente de partição fosfolipídeo/água, interage com a estrutura e integridade da membrana bacteriana causando a lise celular (MICOL et al., 2001). Além disso, diminuiu a expressão de PBP-2a, proteína ligadora de penicilina (do inglês, Penicillin Binding Protein 2a), proteína que encontra-se envolvida na resistência à penicilina nas cepas MRSA (NICOLSON, EVANS, O'TOOLE et al., 1999). Recentemente, estudos demonstraram que o totarol inibe a hemólise e secreção de

enterotoxinas secretadas por *S. aureus* (SHI et al., 2015), conferindo um potencial para a aplicação clínica e prevenção de contaminação de alimentos. O hinokiol foi descrito como tendo atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória (STARKS et al, 2014; WANG et al., 2002). Portanto, o hinokiol também pode estar envolvido na ação antimicrobiana do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*. Além disso, o ácido isocuprêssico, também um componente do própolis, tem atividade antimicrobiana (BANKOVA et al., 1996) e pode desempenhar um papel no efeito antibiótico da EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*.

A análise de UPLC-MS/MS do EHP também revelou a presença de artepilin C. O artepelin C tem sido descrito como o possível componente ativo responsável pela atividade antimicrobiana e antioxidante da própolis verde (VEIGA et al., 2017) e, de forma semelhante ao totarol, interage com a membrana celular criando defeitos pontuais em sua estrutura (PAZIN et al., 2016). Portanto, pode-se considerar que o artepilin C também pode estar envolvido no efeito antimicrobiano do EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*.

Estudos demonstram que o própolis de diferentes espécies de abelhas contém concentrações bastante variadas de antioxidantes (de SOUZA et al., 2013; da SILVA et al. 2013; FRANCHIN et al., 2012). Nesse sentido, avaliamos a atividade antioxidante e o teor total de fenóis e flavonóides no EHP. O EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata* apresentou atividade antioxidante determinada no ensaio DPPH ($IC_{50} = 241,8 \mu\text{g/ml}$), e um teor de fenóis totais de $3,87 \pm 0,32 \text{ mg EAG/g}$ própolis e de flavonoides, $0,14 \pm 0,03 \text{ mg EQ/g}$ de própolis. Esses dados corroboram com dados publicado por Adelman (2005), que demonstrou que o perfil de espectrometria por varredura de extrato de meliponíneos demonstram uma baixa absorvidade na faixa correspondente aos flavanóides, quantidade reduzida de substâncias fenólicas e atividade antioxidante muito reduzida quando com amostras de *Apis mellifera*.

Após essa primeira etapa de estudos “*in vitro*”, partiu-se para os estudos “*in vivo*” e “*ex vivo*” das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Embora a literatura relata alguns trabalhos sobre os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do própolis, a espécie estudada, *M. quadrifasciata quadrifasciata*, é um dos diferenciais do nosso estudo. Outro ponto importante a destacar é a rota de administração do extrato. A maioria dos trabalhos utilizam a via intraperitoneal, como por exemplo, FRANCHIN et al. (2012) que demonstraram a ação antinociceptiva do extrato de própolis de abelha sem ferrão, no teste da formalina e constrições abdominais induzidas pelo ácido

acético. No entanto, investigamos o efeito antinociceptivo do própolis administrado intragastricamente com o propósito de imitar seu uso tradicional, ou seja, administração através da via oral.

A injeção subcutânea de formalina é um método clássico para avaliação da dor através de resposta bifásica. A fase inicial (0 - 5 minutos), fase neurogênica ou não inflamatória, na qual a nocicepção resulta da ativação direta de nociceptores aferentes primários, e a fase inflamatória (15 - 30 minutos), resultante da combinação da reação de tecido inflamatório periférico e da sensibilização central (TJOLSEN et al., 1992). Muitos são os mediadores inflamatórios libertados após a injeção de formalina, como por exemplo, glutamato, PGE_2 , bradicinina, substância P, e histamina, além de citocinas, que estimulam ou sensibilizam os neurônios nociceptivos, resultando no comportamento de lambe / morder a pata injetada (ALMEIDA et al., 2013; IKEDA et al., 2001; TRONGSAKUL et al., 2003).

Nossos dados mostram que o EHP administrado intragastricamente preveniu de maneira significativa a nocicepção em ambas as fases, neurogênica (primeira fase) e inflamatória (segunda fase) do teste da formalina. Na fase neurogênica a dose de 300 mg/kg e 1000 mg/kg apresentam um efeito inibitório máximo de $27 \pm 5\%$ e 26 ± 3 , respectivamente. Enquanto que na fase inflamatória, a dose de 300 mg/kg apresenta uma inibição máxima de $29 \pm 6\%$ e a dose de 1000 mg/kg, $27 \pm 3\%$ (Figura 17); sugerindo que o EHP exerce efeito por interação com fibras C / A δ e / ou por inibição da síntese ou liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, observa-se que o tratamento com EHP apresenta efeito a partir dos primeiros 30 minutos após a administração, efeito esse que foi duradouro até 4^a hora pós tratamento.

Para confirmar a hipótese da ação do EHP na nocicepção via mediadores inflamatórios, investigamos a possível participação da prostaglandina E_2 , bradicinina e histamina, que desempenham um importante papel na geração e manutenção de dor (SAMAD, SAPIRSTEIN, WOLFF, 2002; PARADA et al., 2001; PETHÖ, REEH, 2012). Em nosso estudo, demonstra-se, que a administração de EHP intragastricamente inibiu a dor espontânea induzida por injeção i.pl. de, bradicinina, PGE_2 e histamina.

Os resultados mostraram, ainda, que a nocicepção induzida por bradicinina foi potentemente reduzida por EHP nas doses 100, 300 e 1000 mg/kg, levando a uma

redução de 61 ± 6 , 57 ± 10 e $88\pm 4\%$, respectivamente. Apenas a dose de 1000 mg/kg foi capaz de reduzir o edema, redução máxima de $40\pm 7\%$ (Figura 19).

Com relação a nocicepção induzida por PGE_2 , esta foi inibida por EHP nas doses de 300 e 1000 mg/kg, com uma inibição máxima de 41 ± 9 e $93\pm 2\%$, respectivamente (Figura 20). Também, essas doses inibiram a formação do edema da pata injetada em 25 ± 7 e $27\pm 3\%$, respectivamente.

A histamina, assim como a bradicinina e serotonina, é um fator liberado por células inflamatórias capaz de gerar efeito nociceptivo. Sendo também, um dos principais mediadores responsáveis pelo extravasamento de líquido para o espaço intersticial e consequente formação do edema (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004). Nesse sentido, avaliamos se o EHP reduzira a nocicepção induzida por histamina, bem como a formação de edema. O EHP (300 mg/kg) reduziu drasticamente a nocicepção induzida pela histamina em $90\pm 3\%$. Porém essa dose não reduziu o edema (Figura 21).

Complementarmente, a partir desses resultados, procuramos investigar se a ação de EHP poderia estar relacionada à inibição da sinalização de PKA / PKC, uma vez que esta via é ativada através da interação de PGE_2 , BK e histamina com seus respectivos receptores.

A proteína quinases A (PKA) e C (PKC) são cinases envolvidas em estados de dor, uma vez que sensibilizam alguns receptores ou amplificam suas respostas (BHAVE et al., 2003). Para demonstrar a implicação destas quinases, avaliou-se a dor espontânea induzida por injeção i.pl. de forskolina (FSK, um ativador da adenilato ciclase, que por sua vez, ativa a PKA) e PMA (um ativador de PKC). Assim, nossos resultados evidenciaram que a administração i.g. de EHP (300 mg/Kg) diminuiu a dor espontânea induzida por injeção i.pl. de FSK e PMA, em $85\pm 7\%$ e $46\pm 8\%$, respectivamente (Figuras 22 e 23). Desta forma, podemos sugerir que a capacidade do EHP de interferir no comportamento nociceptivo induzido por PGE_2 , bradicinina, histamina, FSK e PMA está intimamente relacionada à interação com as vias de sinalização PKA / PKC.

Conforme demonstrado por Numazaki e Tominaga (2004), os canais TRPs e ASIC desempenham um papel importante na detecção de estímulos nocivos, pois sua ativação gera o potencial de ação necessário para transmitir informação nociceptiva. O canal TRPV1 pode ser estimulado por diferentes estímulos, tais como calor nocivo, prótons, mediadores de lipídeos endógenos (leucotrienos) e compostos

pungentes, como a capsaicina. O canal TRPA1 é indiretamente sensibilizado por bradicinina (WHITE et al., 2010) e diretamente por compostos irritantes, como o trans-cinamaldeído (ANDRADE, MEOTTI, CALIXTO, 2012). Por sua vez, os canais ASIC são ativados por prótons e são potencializados por mediadores inflamatórios, como a bradicinina (DEVAL et al., 2010; VOLLEY et al., 2001). A hipersensibilidade da dor é evidenciada em várias patologias e muitas vezes é uma consequência do aumento da expressão e / ou atividade desses canais (JULIUS, 2013). Isto é especialmente claro em relação à dor neurogênica e à inflamação onde o TRPV1 é co-expresso na grande maioria dos nervos sensoriais que expressam TRPA1 e ambos integram uma variedade de estímulos nocivos (FERNANDES, FERNANDES, KEEBLE, 2012). Ressaltamos que o TRPV1/TRPA1 e ASIC são estimulados por vários mediadores inflamatórios através das cascatas que envolvem as quinases PKA e PKC.

Nesse sentido, investigamos o efeito de EHP sobre os canais TRPV1, TRPA1 e ASICs, através da injeção de capsaicina, trans-cinamaldeído e solução salina acidificada, respectivos ativadores desses canais. Os resultados mostram que o EHP reduziu a resposta nociceptiva induzida por injeção i.pl. de capsaicina ($43\pm 4\%$), trans-cinamaldeído ($81\pm 4\%$) e solução salina acidificada ($48\pm 2\%$) (Figuras 24, 25 e 26, respectivamente), sugerindo o envolvimento dos canais TRPV1, TRPA1 e ASIC na analgesia produzida pelo EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*.

Além da ativação direta por seus agonistas naturais, o TRPV1 pode sofrer modulação alostérica por mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina e histamina, entre outros, ativando as vias de sinalização intracelular constituídas por proteínas cinases. Por sua vez, essas proteínas fosforilam o canal TRPV1 diminuindo seu limite de ativação, tornando-o mais suscetível à ativação por seus ligantes naturais (WANG, EHNERT, BRENNER, 2006; PREMAKUR, AHERN, 2000), resultando em hiperalgisia. Além disso, TRPV1 e ASIC desempenham papéis complementares na sensibilidade dos nociceptores à liberação de prótons em locais inflamatórios. Alguns estudos têm demonstrado que o TRPA1 também exerce um papel na hiperalgisia fria e mecânica e que o comportamento nociceptivo no teste de formalina também é devido à ação direta no TRPA1. Desta forma, podemos sugerir que os canais TRPV1/TRPA1/ASIC são possíveis alvos do EHP.

A partir deste conjunto de evidências que demonstraram o efeito do EHP em testes agudos de nocicepção química e destacando alguns possíveis alvos e mecanismos de ação, passou-se a avaliação dos possíveis efeitos anti-inflamatório do EHP da *M. quadrifasciata quadrifasciata*. Para tal realizou-se dois testes de atividade anti-inflamatória: o teste do edema induzido por xileno e da peritonite induzida por carragenina, um modelo agudo clássico de inflamação.

O teste inflamatório tópico do edema induzido por xileno, baseia-se no fato deste ser um agente flogístico promotor da inflamação neurogénica que atua sobre células alvo na periferia tais como mastócitos, em células do sistema imune e nos músculo liso vascular produzindo inflamação, caracterizada por vermelhidão, calor, edema e hiperalgesia. Esta inflamação é desencadeada pela ação de mediadores, tais como acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas, provocando liberação direta dos neuropeptídeos, pela excitação dos neurônios, com ativação dos seus receptores, incluindo os receptores vanilóides tipo 1, bradicinina tipo 2 e receptores de proteinase ativada; sensibilizados, respectivamente, por influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C ou desinibição do fosfatidil inositol bifosfato (RICHARDSON, VASKO, 2002).

Nosso trabalho demonstrou que o EHP nas doses de 300 e 1000 mg/kg/i.g. e inibe a formação do edema de orelha induzido topicamente por xileno, apresentando uma inibição de 48 ± 11 e $70 \pm 2\%$, respectivamente (Figura 27).

A carragenina, por sua vez, promove o aumento da permeabilidade vascular, aumento da exudação de proteínas e de diferentes mediadores químicos e citocinas pró-inflamatórias, além do influxo de células inflamatórias (principalmente neutrófilos) no local da lesão (CUNHA et al., 2008, SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004). Induz, primeiramente a liberação de histamina, bradicinina e serotonina, e em uma fase mais tardia, prostaglandinas (OGONOWSKI et al., 1997), sendo que a liberação de bradicinina leva a ativação de PKC e sensibilização de TRPV1 (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1997).

A aplicação deste modelo, corrobora os achados supra citados, em que o EHP levou à diminuição da nocicepção e do edema, causado pela bradicinina. Porém agora, demonstrando um efeito anti-inflamatório mais específico, sobre os eventos inflamatórios uma vez que o EHP (300 mg/kg) foi capaz de diminuir em 36,8% a quantidade absoluta de leucócitos do lavado peritoneal (em relação ao grupo carragenina, Figura 28A), alterando o perfil de polimorfonucleados do grupo

carragenina, de 62,9% para 42,8% no grupo tratado com própolis (Figura 28B), e também diminuiu a exudação de proteínas em 39,6% (Figura 28C).

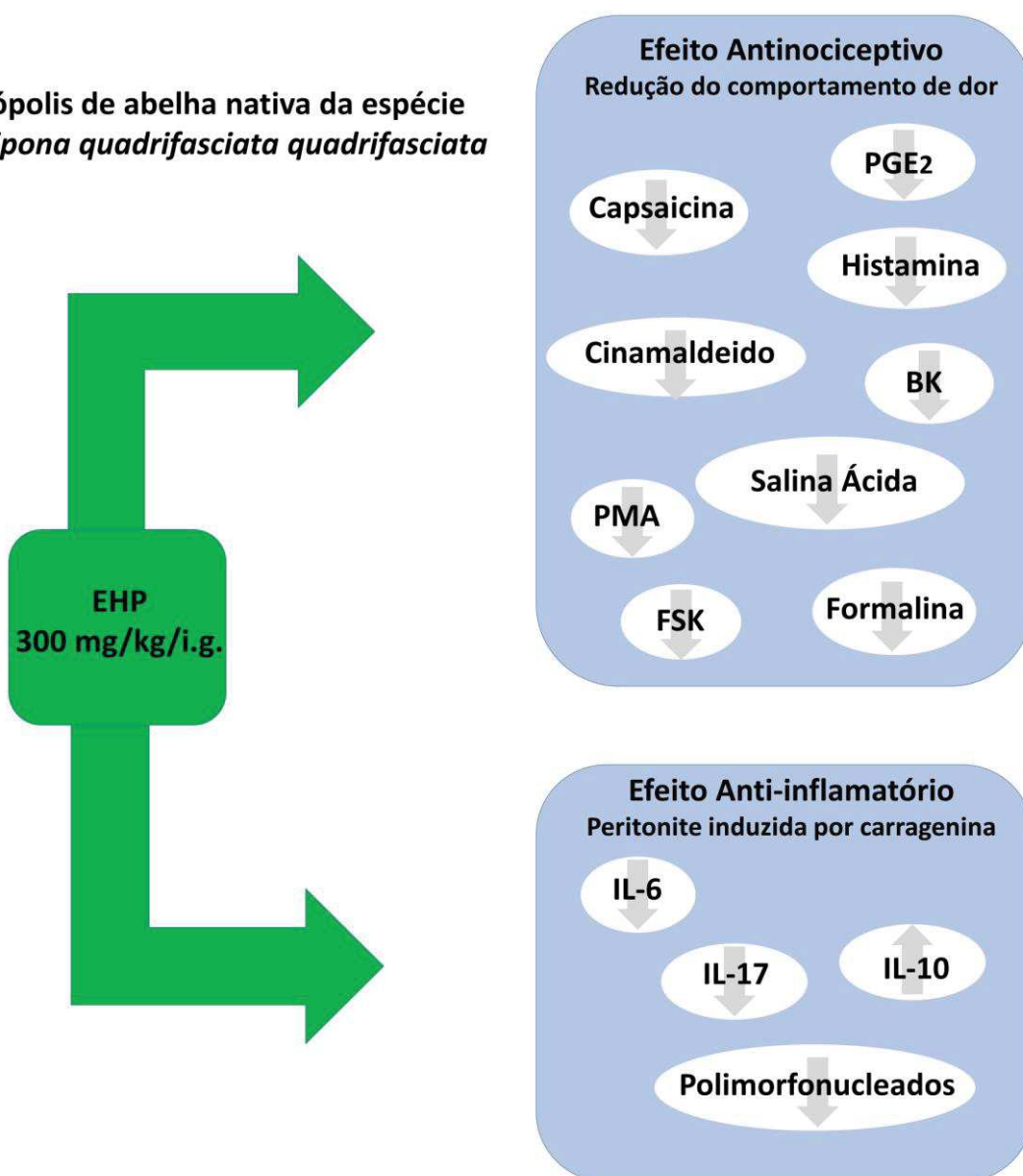
Outro achado importante foi o efeito do tratamento com EHP sobre a produção de citocinas no lavado peritoneal. Sabe-se que a carragenina promove aumento das citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IL-6 e diminui as concentrações de citocinas anti-inflamatórias IL-10 (de MELO et al., 2016; de OLIVEIRA et al., 2011; TAYAL, 2008). A IL-17 estimula a produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-8 e PGE₂ a partir de macrófagos, células endoteliais e epiteliais e fibroblastos. Destaca-se que a IL-17 aumenta a expressão de IL-6, que por sua vez atua em muitos distúrbios caracterizados por inflamação (CHEN, ZHOU, 2015; PAPPU, ANGKASEKWINAI, DONG, 2008). Por outro lado, a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, desempenhando um papel crucial na prevenção de doenças auto-imunes e inflamatórias (de OLIVEIRA et al., 2011). Nesse sentido, a identificação de substâncias que interferem nas concentrações de IL-10, IL-17 e IL-6 são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Desta forma, o EHP mostrou promissores efeitos anti-inflamatórios, uma vez que as concentrações de IL-10 aumentaram acentuadamente no grupo tratado com EHP assim como os tratados com dexametasona (Figura 29A). Enquanto que as concentrações de IL-17 e IL-6 de camundongos tratados com EHP (300 mg/kg/i.g) encontraram-se diminuídos (62 \pm 3 e 89 \pm 1%, respectivamente), efeito semelhante ao encontrado nos grupos tratados com dexametasona (controle positivo) (Figuras 29B e C). Demonstrando que o EHP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*, interfere no processo inflamatório alterando os eventos celulares e a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Esses resultados estão de acordo com o descrito para extrato de própolis de outras espécies de meliponas, como por exemplo foi demonstrado para *Melipona scutellaris*, que inibiu a produção de IL-1 β e TNF- α (FRANCHIN et al., 2012) e diminuiu a migração celular no processo inflamatório (FRANCHIN et al. 2013). Sendo que este último evento, também foi descrito para o própolis de *Scaptotrigona sp* (MARTIN et al., 2013).

Em resumo, os resultados sugerem que o EHP da *M. quadrifasciata quadrifasciata*, além de apresentar atividade antimicrobiana e antioxidante, também apresenta importante efeito antinociceptivo e anti-inflamatório (Figura 30). Tal efeito parece estar associado a diferentes receptores (TRPV1, TRPA1 e ASIC) e suas vias regulatórias (PKA/PKC). O efeito anti-inflamatório também parece ser uma consequência da diminuição da migração de células, quantidade de

polimorfonucleados e exudação de proteínas, bem como a inibição de IL-17 e IL-6 e aumento das concentrações de IL-10. Esses resultados denotam a complexidade da composição química e do mecanismo envolvido nos diferentes efeitos biológicos apresentados pelo extrato em estudo, mostrando que o EHP da *M. quadrifasciata* pode se tornar um importante coadjuvante terapêutico mostrando, dessa forma, a importância de preservar e estudar as diferentes espécies de abelhas nativas, seus produtos e subprodutos.

Figura 30 – Infográfico dos resultados das análises do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do EHP.

Própolis de abelha nativa da espécie
Melipona quadrifasciata quadrifasciata



7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo com extrato hidroalcoólico de própolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* nos permite concluir que:

- A composição química do EHP é caracterizada pela presença do flavonóide quercetina e compostos fenólicos: ácido gálico, ácido p-cumárico e vanilina, além da prevalência de compostos diterpênicos como constituintes majoritários. O EHP apresentou significativa atividade antioxidante.
- O EHP apresenta atividade antibacteriana contra cepas potencialmente patogênicas, tais como: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* resistente á metilina (MRSA), *E. coli* (ATCC 25922) e *K. pneumoniae* (ATCC 23883), entretanto, a atividade antimicrobiana é mais proeminente contra bactérias Gram positivas.
- A atividade antibacteriana do EHP sobre a curva de crescimento do *S. aureus* (ATCC 25923) ocorre precocemente quando comparado a *E. coli* (ATCC 25922). O EHP causou lise celular bacteriana em ambas bactérias sugerindo que este possa ser o mecanismo pelo qual exerce sua ação bactericida.
- O EHP diminuiu, “*in vitro*”, a hemólise causada por cepas de *S. aureus* (ATCC 25923).
- O EHP reduziu o tempo de resposta nociceptiva induzida por formalina em ambas as fases (neurogênica e inflamatória) do teste.
- O efeito antinociceptivo do EHP sobre a fase inflamatória do teste da formalina é precocemente observado e persiste até a 4^o hora de avaliação.
- O EHP inibe a nocicepção induzida por mediadores inflamatórios, tais como: bradicinina, prostaglandina E₂ e histamina.

- O EHP reduziu o tempo de resposta nociceptiva induzida por injeção i.pl. de capsaicina, trans-cinamaldeído, salina ácida, forskolina e PMA, sugerindo sua ação sobre receptores do tipo TRPV1, TRPA1 e ASICs, bem como suas vias sinalizatórias (PKA e PKC).
- O EHP apresentou atividade antiedematogênica evidenciado no teste do edema de orelha induzido por xileno.
- Que o EHP apresentou importante efeito anti-inflamatório no teste da peritonite induzida por carragenina, diminuindo significativamente a migração celular, a quantidade relativa de células polimorfonucleares e a exsudação de proteínas. Além disso, diminui as concentrações de IL-6, IL17 e aumenta a concentração de IL-10 no sítio inflamatório.

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo fornecem evidências científicas que suportam o uso popular do EHP da *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* como agente antibacteriano, antinociceptivo e anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ABDU-SAAD HUIJER H. Chronic Pain: A review. **Journal Medicine Liban**, n. 58, v. 1, p. 21-27, 2010.
- ABRAAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature** 146: 837, 1940.
- ADELMANN, J. (2005). **Própolis: variabilidade composicional, correlação com flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade federal do Paraná. UFPR. 186 p.
- ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**. 36(6):697–705, 2005.
- ALMEIDA, R., et al. Borneol bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. **The Scientific World Journal**, 18, 1-5. 2013.
- ANDRADE, E. L. et al. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v.152, n.2, Mar 18, p.511-20. 2008.
- ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, 133(2), 189-204, 2012.
- ARAÚJO, M.J.A.M. et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**. 4, 12–20, 2015.
- ASHLEY, N. T. et al. Inflammation: Mechanisms, Cost, and Natural Variation. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 43:385-406, 2012.
- BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of β -d-glucan from *pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase c inhibition. **International journal of biological macromolecules**, 1 abr, v. 50, n. 3, p. 872–877, 2012.
- BANKOVA V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, 8: 28, 2014.
- BANKOVA V. et al. S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**, 51: 277–280, 1996.
- BANSKOTA, A. H., et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, 61, 896-900, 1998.
- BANSKOTA, A. H. et al. **Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis**. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1277-9, 2000.

BARTH, O.M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, 41:71-85, 2006.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, out. 2009.

BATALHA-FILHO, H. et al., **Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA**. **Apidologie**, 41: p. 534-547, 2010.

BARTOLOMEU, A. R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 81, 48-55, 2016.

BENNETT, A. D.; EVERHART, A.W.; HULSEBOSCH, C. E. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. **Brain Research**. n.17, 859(1):72-82. 2000.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, abr. 1988.

BHARGAVA, P. et al. Anticancer Activity of the Supercritical Extract of Brazilian Green Propolis and Its Active Component, Artepillin C: Bioinformatics and Experimental Analyses of Its Mechanisms of Action. **International Journal of Oncology**, 52 (3), 925-932. 2018.

BHAVE, G., et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 100, 12480–12485, 2003.

BONAMIGO T. et al. Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata* anthiodioides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1038153, 2017.

BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Lettres in Applied Microbiology**. n. 31, p. 174-177. 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72:248-54, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. n. 28, p.25-30. 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Instrução Normativa nº3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade de própolis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 de jan. 2001.

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências.** DOU, outubro de 2010.

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação.** DOU Nº 87, segunda-feira, 9 de maio de 2011. Seção 1, páginas 39 a 4.

BRASIL, ANVISA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde – PNPCIRAS.** Brasília, 15 de maio de 2017.

BURMA, N. E. et al. Animal Models of Chronic Pain: Advances and Challenges for Clinical Translation. **Journal of Neuroscience Research.** DOI: 10.1002/jnr.23768. 2016.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, 65, 374-380, 2014.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 296186, 2015.

CARSTENS, E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. **Journal of Neurophysiology**, Bethesda, v.77, n.5, p.2499-2514, 1997.

CERCEO, E. et al. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. **Microbial Drug Resistance**. 22 (5), 2016.

COHEN, F. L., TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: a review. **The American Journal of Infection Control**. 25(1):51-64. 1997.

CHANGE PAIN: preocupados por el dolor. Banco de imagens gratuitas. Disponível em: http://www.change-pain.org/grt-change-pain-portal/change_pain_home_/chronic_pain/physician/physician_tools/picture_library/es_ES/325100038.jsp Acessado em: março de 2018.

CHEN, C. N. et al. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, n. 66, v. 4, p.503-6, Apr, 2003.

CHEN, X-W.; ZHOU, S-F. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF-κB axis, and tumorigenesis. **Drug Design, Development and Therapy**. 9, 2941-2946, 2015.

CHUANG, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, 411(6840):957-62, 2001. <http://pesquisa.bvsalud.org/regional/resources/mdl-11418861>.

CLARDY, J.; WALSH, C.; Lessons from natural molecules. **Nature**. 432, 829, 2004.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.

CRIADO, P. R. et al. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85 (2), 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000200010>

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**. n. 32, p.1-32, 2009.

CUNHA, J.M. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**. v. 130, n. 7, p. 1418-1424, 2000.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, 83, 824–832, 2008.
Da CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13, 23. 2013.

Da SILVA, I. A. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food chemistry**. 141(4):3552-8, 2013.

De BUS, L. et al. Microbial etiology and antimicrobial resistance in healthcare-associated versus community-acquired and hospital-acquired bloodstream infection in a tertiary care hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V. 77 (4), 341 – 345, 2013.

De MELO, N. F. et al. 15d-PGJ₂-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Physicochemical Characterization and Evaluation of Pharmacological Effects on Inflammation. **PLoS One**, 30, 11(8), e0161796, 2016.

De OLIVEIRA, C. M. B. et al. Cytokines and pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 61(2), 255-259, 2011.

De SOUZA, S. A. et al. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 5, 2013.

DEVAL, E. et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. **Pharmacology & Therapeutics**, 128(3), 549-558. 2010.

DIAO, W.-R. et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*). **Food Control** 35, 109-116, 2014.

DRAGO, L. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis drug extract. **Journal of Chemotherapy**. n. 12, p. 290-395, 2000.

DUKE, C.C.; TRAN, V.H.; DUKE, R.K. The University of Sydney, 2012. Prenylated Hydroxystilbenes. **WO/2012/149608**. 2012.

DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(12), 2549-57, 2014.

ENDO, S. et al. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artemisinin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. **Biochemical and biophysical research communications**. 497(1):437-43, 2018,

ENZELL, C.R., WAHLBERG, I., Mass spectrometric studies of diterpenes. 7. Aromatic diterpenes. **Acta Chemica Scandinavica**. 24, 2498-2510, 1970.

EPAGRI, **Apis On-Line**. Disponível em: <http://ciram.epagri.sc.gov.br/apicultura/abelhas-sem-ferrao.html>, acesso: mar. de 2018.

EXNER, M. et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? **GMS Hygiene and Infection Control**. 12, 2017.

FEIN, A. **NOCICEPTORES: As células que sentem dor**. Ribeirão Preto - SP: Dor On Line; 2011. 106 p. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/nociceptores>

FERNANDES, E. S.; FERNANDES, M. A.; KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **British Journal of Pharmacology**, 166(2), 510-521, 2012.

FERNANDES-JUNIOR, A., et al. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100, 563-566, 2005.

FERREIRA J. et al.. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain** 117: 171-181, 2005.

FERRO, T. A. F. et al. Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. **Frontiers in Microbiology**. 7 (2016): 2052. 2016.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology**. n.143, p. 709-715, 2012.

FRANCHIN, M. et al. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 907041. 2013.

GHASEMI, K., GHASEMI, Y., EBRAHIMZADEH, M.A., Antioxidant activity, phenol And flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, 22, 277-281, 2009.

GOLD, M. S.; GEBARTH, G. G. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature**. 16, 1248-1247, 2010.

GOLDEBERG, D. S; , McGEE S. J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**.11:770, 2011.

GOMEZ-CARAVACA, A.M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41,1220–1234, 2006.

GRIFFITHS, H.; GAO, D. PARARASA, C. Redox regulation in matabolic programming and inflammation. **Redox Biology**, 12: 50-57. 2017.

HAZAN, A. et al. The Pain Receptor TRPV1 Displays Agonist-Dependent Activation Stoichiometry. **Scientific Reports**. 5, 2015.

HEIDLAND, A. et al. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**, v.19, p. 102-109, maio/jun. 2006.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, jul. 1987.

IACUC da Universidade de Boston (<http://www.bu.edu/orccommittees/iacuc/policies-and-guidelines/humane-endpoints-policy/>)

IASP: **Taxonomy 2017**. <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>. Acessado em 15 março de 2018.

IKEDA. Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001

JULIER, Z. et al. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomaterialia**, v. 53, n. Supplement C, p. 13–28, 15 abr. 2017.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, n. 413, p. 203-10, 2001.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual review of cell and developmental biology**, 29, 355-384, 2013.

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**. 20:136, 2016. DOI 10.1186/s13054-016-1320-7

KASSUYA, C. A et al. B. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behavior and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British Journal of Pharmacology**. 150: 727-737. 2007.

KEER, W. E.; NIELSEN, R. A. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workres. **Geneitcs**. 54: 859-866, 1966.

KOHNO, T. et al. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. **Pain**. 117(1-2):77-87, 2005.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. **Trends in Neuroscience**, v. 25, p. 154–159, 2002.

KOU, J. et al. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1234-8, 2005.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L., Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 46, 199-206. 2006

KWAK, Y. K. et al. Biological relevance of natural alpha-toxin fragments from *Staphylococcus aureus*. **The Journal of membrane biology** v. 233, n. 1-3, p. 93-103, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran - Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.49-124.

LE BARS, D; GOZARIU, M.; CADDEEN, S. W. Animals models of nociception. **Pharmacology**, v. 53, p.597-652, 2001.

LI, F., et al. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. **Journal of Natural Products**, 72, 1283-1287, 2009.

LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobioal activity against oral pathogenes and immunomodulatori effects and toxixity of geopropolis produced by stingless bee *Meliponi fasciculata* Smith. **BMC Complementary e Alternative Medicine**. 11: 108. 2011.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, jul. 2008.

LUO, J. et al. Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 72, n. 17, p. 3201–3223, set. 2015.

MARCON, R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e antin-inflamatório dos triterpenos semi-sintéticos: octanoato de alfa e beta-amirina**. 2009. 123 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2009.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**. 19(5): 529-536.1996.

MARTIN, L. F. T. et al. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **BMC Complementary e Alternative Medicine**. n. 13, p. 337. 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, 140 (60), 771-776, 2010.

MEOTTI, F.C.; COELHO, I. dos, S.; SANTOS, A. R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **The Journal of Pain** 11, 570-578, 2010.

MICHAEL, C. A.; DOMINET-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in Public Health**, 2:145, 2014.

MICOL, V. et al. Effects of (+)-totarol, a diterpenoid antibacterial agent, on phospholipid model membranes. **Biochimica et biophysica acta**, 1511, 281-290, 2001.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, 66, 355-474, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Brasileira**, Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>, Acesso em: 01 mar. 2018.

MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 95, p. 913-920. 2003.

MOORE, N. et al. Tolerability of ibuprofen, aspirin and paracetamol for the treatment of cold and flu symptoms and sore throat pain. **International Journal of Clinical Practice**. n. 56, v. 10, p. 732-734, 2002.

MORE, A. S. et al. Des-Arg9-bradykinin causes kinin B1 receptor mediated endothelium-independent contractions in endotoxin-treated porcine coronary arteries. **Pharmacological Research**. 90:18-24, 2014.

MORIYAMA, T. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Molecular Pain Mol Pain**, 1:3, 2005.

MURPHY, H.S.; WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin, Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.43-85.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P.W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiology Letters**, 179, 233-239, 1999.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**, São Paulo, Ed. Nogueirapis, 1997.

NUMAZAKI, M.; TOMINAGA, M. Nociception and TRP Channels. **Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders**. 3(6), 479-485, 2004.

NURMUKHAMEDOVA, M. R. et al. Diterpenoids of *Pulicaria salviifolia*. II. Structure of salvicin. **Chemistry of Natural Compounds**. 1986, 22, 277-279

OGONOWSKI, A. A. et al. anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p 846-853, 1997.

OKUZ, H. et al. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. **Ophthalmic Research**, 37, 328-334, 2005.

OLIVEIRA, F. B. M., LIMA, L. M., MOURA, M. E. B. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma reflexão no tratamento das infecções hospitalares. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, Teresina. v.4, n.4, p.72-77, Out-Nov-Dez. 2011.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem** [Internet]. 2008;10(1):189-197. Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>

PAGANO, R. L. et al. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 203-210, 2002.

PAPPU, B. P.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: New lessons learned from interleukin 17 family cytokines. **Pharmacology & Therapeutics**, 117(3), 374-384, 2008.

PARADA, C. A. et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin induced nociception. **Neuroscience**, 102, 937-944, 2001.

PAREDES-GUZMAN, J. et al. Estudo das própolis que contém Artepecilin C. **Revista Mensagem Doce**. 74, (2003). Disponível <<http://www.apacame.org.br>>. Acessado

em: 03 de março de 2014.

PARK, Y. K.; et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. n. 18, v. 3, p. 313-318, 1998.

PAZIN, W. M. et al. Interaction of Artepillin C with model membranes. **European Biophysics Journal**, 46: 383–393, 2016.

PEREIRA, E. M. **Avaliação do papel de receptores NMDA pra glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônicas em ratos**. Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PETHÕ, G., REEH, P. W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiological Reviews**, 92, 1699–1775, 2012.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents. 529. Isolation and structure of nootkastatins 1 and 2 from the Alaskan yellow cedar *Chamaecyparis nootkatensis*. **Journal of Natural Products**, 67: 1476–1482, 2004.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A. Jr.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, 38(1), 5-19, 2017.

POPOVA, M.P. et al. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry** 70, 1262-1271, 2009.

PREMKUMAR, L. S.; AHERN, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**. 408(6815):985-90, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale -Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829p.

REGINATO, J.B.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 34:601-616, 2010.

RIBEIRO-JÚNIOR, J. A. et al. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 459846, 5, 2015.

RICHARDSON, J.D.; VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, p.839-45, 2002.

ROBINS; COTRAN. **Patologia: Bases patológica das doenças**, 7° ed. Elsevier: 2005.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

ROSSINI, A., S. **Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos corpora allata de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae)**. 1989. 120 p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 1989.

SAKURADA, T. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 12, p. 1279–1285, 1992.

SALEH, T. S.; J. B. CALIXTO; Y. S. MEDEIROS. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 331, n.1, Jul 16, p.43-52. 1997.

SAMAD, T. A.; SAPIRSTEIN, A.; WOOLF, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanism therapeutics targets. **Trends in Molecular Medicine**, 8, 390–396, 2002.

SANTOS, H. F. D. et al. Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(5), 2017.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n. 4, p. 381–389, 1997.

SECCO, D.D. et AL. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v.9, p.153-164, 2004.

SERHAN, N.C.; SAVIL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v.6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, 113(1):1-14, 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHI, C. et al. Inhibitory effect of totarol on exotoxin proteins hemolysin and enterotoxins secreted by *Staphylococcus aureus*. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, 31, 1565-1573, 2015.

SHIMEI, Y. et al. Effect of Brazilian propolis on scratching behavior induced by compound 48/80 and histamine in mice. **International Immunopharmacology**, 4, 431–436, 2004

SILICI, S; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 99, v. 1, p. 243-249. 2005.

SILVA, J.C., et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 1790-1795, 2012.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras, sistemática e Identificação**. 1° ed. Belo Horizonte: 2002.

SIMÕES, R. R. et al. Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 175, 370–377, 2015.

SIMÕES, R. R. et al. Oral treatment with methanolic extract of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek alleviates acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with PGE₂, TRPV1/ASIC and PKA signaling. **Journal of Ethnopharmacology**, 185, 319-326, 2016.

SMITH, E. St. J. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal of Neurology**. 265 (2): 231-238. 2017.

SMITH, R.; COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. **BMJ : British Medical Journal**, 346, 1493, 2013.

SMITH, T. E.; CHONG, M. S. Neuropathic Pain. **Hospital Medicine**., 2000; 61(11):760-6.

STARKS, C.M. et al. Antibacterial activity of *Taxodium ascendens* diterpenes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Communication**, 9, 1129-1130, 2016.

SU, J-Q. et al. Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. **Environmental Science & Technology**. 49(12), 7356-7363, 2015.

SY, L.K.; BROWN, G.D. Abietane diterpenes from *Illicium angustisepalum*. **Journal of Natural Products**, 61, 907-912, 1998

TANSIRICHAIYA, S. et al. Reduced Susceptibility to Antiseptics Is Conferred by Heterologous Housekeeping Genes. **Microbial Drug Resistance**. 24 (2), 2018
DOI: 10.1089/mdr.2017.0105

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - An update. **European Journal of Pharmacology**, 579, 1–12, 2008.

TEIXEIRA, E. W. et al. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 177: 1- 9. 2008.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. **Animal Models of Analgesia**. In: DICKENSON, A. H.; BESSON, J. M. R., et al (Ed.). *The Pharmacology of Pain*. Verlag, Berlin: Springer, v.130, 1997. p.1-20. ISBN 9783540627852.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51, 5-17, 1992.

TRONGSAKUL, S. et al. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of the Ethnopharmacology**, 85, 221–225, 2003.

VANDERMEULEN, E. Pain perception, mechanisms of action of local anesthetics and possible causes. **Revue Belge Medicine Dentaire**, v. 55, p. 29-40, 2000.

VARELA, L. M. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, 2018.

VEIGA, R.S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, 9, 2017.

VICK, J.S.; ASKWIITH, C. C. ASICs and Neuropeptides. **Journal Neuropharmacology**. 94:36-41, 2015.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **The Journal of Neuroscience**, 21, 8026–8033, 2001.

WANG, H. et al. Bradykinin and peripheral sensitization. **Biological Chemistry Journal** 387(1):11-4, 2006.

WANG, S. Y. et al. Activity of Abietane-Type Diterpenes from Heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. **Holzforschung**, 56: 487–492, 2002.

WANG, T-Z. et al. Diterpenoids from the pericarp of *Platyclusus orientalis*. **Phytochemistry** 69, 518–526, 2008.

WATKINS, L. R. et al. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. **Brain Research**. v. 692, p. 244–50, 1995.

WHITE, J. P. et al. Role of transient receptor potential and acid-sensing ion channels in peripheral inflammatory pain. **Anesthesiology**, 112(3), 729-741, 2010.

WITTER, S.; BLOCHTIN, B. **Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul**. 1° Ed. Porto Alegre, 2009.

WOOLF, C.J.; Ma, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**. 55(3):353-64. 2007.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **Journal Clinical Investigation**. 120, 3742-3744, 2010.

YANG, X. et al. Diterpenoid acids from *Pinus koraiensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, 46, 227-229, 2010.

ZHANG, L.-C. et al. Three new abietane diterpenoids from *Podocarpus fleuryi*. **Phytochemistry Letters**, 6, 364-367, 2003.

APÊNDICE A – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Determinação da atividade antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico do Própolis
 Consiste em adicionar em cada poço/tubo partes iguais de:

$T_{\text{extrato}} = \text{Meio} + \text{Extrato}$ (2x a concentração desejada)

$T_{\text{bact}} = \text{Meio} + \text{inóculo}$ (2x a concentração desejada)

Preparação do T_{zero} :

Concentração final desejada: 8.000 $\mu\text{g/mL}$

1º) A partir do extrato inicial:

EHP: 80.000 $\mu\text{g/mL}$

Concentração desejada no tubo: 4.000 $\mu\text{g/mL}$

Concentração do T_{extrato} (4X a concentração desejada): 16.000 $\mu\text{g/mL}$

Porém esse extrato deve ser pré-diluído em meio ($T_{\text{extrato}} = \text{meio} + \text{EHP}$ 32.000 $\mu\text{g/mL}$)

2º) Cálculos:

80.000 $\mu\text{g/mL} \times V_1 = 32.000 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL}$

$V_1 = 32.000 / 80.000$

$V_1 = 0,4 \text{ mL}$ (+ 0,6 álcool 80 %)

$T_{\text{interm.}} = 0,4 \text{ mL} + 0,6 \text{ álcool } 80 \%$

conc. 32.000 $\mu\text{g/mL}$

Tubo Intermediário:

Final:

0,5 mL do $T_{\text{interm.}}$ (32.000 $\mu\text{g/mL}$)

$\frac{0,5 \text{ mL de Meio}}$

1,0 mL (16.000 $\mu\text{g/mL}$)

*Diluições em partes iguais

<p>Preparação do T_{bact}: Concentração final desejada: 5×10^5 UFC/mL (500.000) 1º) Incubar: 3 a 4 colônias em 1-2 ml de salina e deixar turvar até que alcance a turvação padrão do TUBO 0,5 de MAC FARLAND ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL)</p> <p><u>Leitura no Espectrofotômetro:</u> Ler em absorbância Comprimento de onda 625 nm Ajustar o branco com água Ajustar a solução bacteriana em 0,08 – 0,10 de Abs.</p>	
<p>2º) Cálculos: EHP: 80.000 µg/mL Concentração desejada (tubo/poço): 5×10^5 UFC/mL Concentração no T_{bact} (2X a concentração desejada): 1×10^6 UFC/mL A partir do inóculo padrão: 1×10^8 UFC/mL</p>	<p>Fórmula: $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$</p>
<p>Ex: 1×10^8 UFC/mL x $V_1 = 1 \times 10^6$ UFC/mL x 10 mL $V_1 = \frac{1 \times 10^6 \times 10}{1 \times 10^8}$</p>	<p>T_{bact}: $\frac{9,9 \text{ mL de Meio}}{10 \text{ mL}} \times \frac{0,1 \text{ mL } (1 \times 10^8)}{1 \times 10^6}$</p>

Controle do diluente

1º) Objetivo é manter a concentração do poço do $T_{\text{álcool}}$ igual ao do poço correspondente ao teste, para verificar o efeito "per se"

2º) Cálculos:

$T_{\text{álcool}}$

0,5 de álcool 80%

0,5 de Meio

1,0 mL => 100 μL desse será adicionado no poço C1, e então fazer a diluição seriada nos demais tubos (menos no controle Positivo e Negativo)

$T_{\text{álcool}}$: (concentração = 40%)

Fora

	1	2	3	4	Cont. Negativo	Cont. Positivo
C	100 μL Meio cultura puro + 100 μL $T_{\text{álcool}}$	100 μL Meio cultura puro	100 μL Meio cultura puro	100 μL Meio cultura puro	200 μL Meio cultura puro	100 μL Meio cultura puro
Concentração:	20%	10%	5%	2,5%		
Após, colocar o T_{bact} em todos os poços	100 μL T_{bact}	100 μL T_{bact}	100 μL T_{bact}	100 μL T_{bact}	-----	100 μL T_{bact}
Concentração final no poço:	10%	5%	2,5%	1,25%		

**APÊNDICE B - TABELA ILUSTRATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS
ENSAIOS “*in vitro*”**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA
*M. quadrifasciata quadrifasciata***

(DOUTORADO: TORRES, A. R., 2018)

Estudos “<i>in vitro</i>”	
Determinação da Composição Química do EHP	
Conteúdo de Fenóis Totais: 3,87 ± 0,32 mg EAG/g de Própolis	Conteúdo de Flavonóides: 0,14 ± 0,03 mg EQ/g de Própolis
CLAE-DAD: Ác. Gálico (Rt=2,68), Vanilina (Rt=7,67), Ác. p-cumárico (Rt=12,73) e Quercetina (Rt=24,45)	UHPLC-ESI-QTOF-MS: Compostos majoritários: Ác. Isucuprêssico; Hinokiol, 3β- hydroxytotarol, ou totara-8,11,13-triene- 7α,13-diol
Atividade Antioxidante do EHP	
IC ₅₀ =241,8 µg/mL (203,1 a 287,7)	
Análises Microbiológicas do EHP	
Determinação da CIM (mg/mL):	
<u>Gram Positivas:</u> <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) = 1,26 <i>S. aureus</i> (MRSA) = 1,56 <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) = 3,84	<u>Gram Negativas:</u> <i>E. coli</i> (ATCC 25922) = 7,72 <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23883) = 5,44
Curva de Crescimento:	
EHP (1CIM) inibiu crescimento do <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) a partir da 6 ^a hora de incubação. Enquanto que, para <i>E. coli</i> (ATCC 25922), o mesmo efeito só é observado após 12 ^a h de incubação.	
Mecanismo de ação:	
EHP (1CIM) incubado com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , aumentou em 6,5 e 5,5 vezes, respectivamente, a liberação de constituintes celulares para o meio reacional.	
Efeito sobre a atividade hemolítica do <i>S. aureus</i>	
EHP em concentrações subinibitórias, ¼ e ½ CIM, apresentou um decréscimo na atividade hemolítica do <i>S. aureus</i> na ordem 27,6 e 44,6%, respectivamente.	

**APÊNDICE C – TABELA ILUSTRATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS
ENSAIO “in vivo” E “ex vivo”**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA
*M. quadrifasciata quadrifasciata***

(DOUTORADO: TORRES, A. R., 2018)

Estudos “in vivo” e “ex vivo”					
Experimento 1: Teste de nocicepção induzida por Formalina (2,5%)					
Fase I: Neurogênica					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	Δ Edema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	NA	NA	
Grupo 1	EHP 100 mg/kg	-	NA	NA	
Grupo 2	EHP 300 mg/Kg	-	NA	NA	
Grupo 3	EHP 1000 mg/Kg	↓	NA	NA	26 ± 3
Fase II: Inflamatória					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	-	-	
Grupo 1	EHP 100 mg/kg	-	-	-	
Grupo 2	EHP 300 mg/Kg	↓	-	-	29 ± 6
Grupo 3	EHP 1000 mg/Kg	↓	-	-	27 ± 3
Experimento 2: Teste da Capsaicina - TRPV1					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	NA	NA	
Grupo 1	EHP 300 mg/Kg	↓	NA	NA	43 ± 4
Experimento 3: Teste do Cinamaldeído – TRPA1					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	NA	NA	
Grupo 1	EHP 300 mg/Kg	↓	NA	NA	81 ± 4
Experimento 4: Teste da Salina Ácida (pH=5,0) – ASICs					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	NA	NA	
Grupo 1	EHP 300 mg/Kg	↓	NA	NA	48 ± 2

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA
*M. quadrifasciata quadrifasciata***

(DOUTORADO: TORRES, A. R., 2018)

Experimento 5: Teste de nocicepção induzida por Bradicinina					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	-	-	
Grupo 1	EHP 100 mg/kg	↓	-	-	61 ± 6
Grupo 2	EHP 300 mg/Kg	↓	-	-	57 ± 10
Grupo 3	EHP 1000 mg/Kg	↓	↓	-	88 ± 4 / 40 ± 7
Experimento 6: Teste de nocicepção induzida por PGE2					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	-	-	
Grupo 1	EHP 100 mg/kg	-	-	-	
Grupo 2	EHP 300 mg/Kg	↓	↓	-	41 ± 9 / 19 ± 7
Grupo 3	EHP 1000 mg/Kg	↓	↓	-	93 ± 2 / 27 ± 3
Experimento 7: Teste de nocicepção induzida por PMA					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	-	-	
Grupo 1	EHP 300 mg/Kg	↓	-	-	46 ± 8
Experimento 8: Teste de nocicepção induzida por Histamina					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	-	-	
Grupo 1	EHP 300 mg/Kg	↓	-	-	90 ± 3
Experimento 9: Teste de nocicepção induzida por Forscolina					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	-	NA	NA	
Grupo 1	EHP 300 mg/Kg	↓	NA	NA	85 ± 7
Experimento 10: Teste tópico da inflamação induzida por Xileno					
Grupos	Pré-tratado (1h antes, i.g.)	Tempo	ΔEdema	ΔTemp. mp.	Inibição Máx. (%)
Controle	Veículo	NA	-	NA	
Grupo 1	EHP 100 mg/kg	NA	-	NA	
Grupo 2	EHP 300 mg/Kg	NA	↓	NA	49 ± 9
Grupo 3	EHP 1000 mg/Kg	NA	↓	NA	70 ± 2

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA
*M. quadrifasciata quadrifasciata***

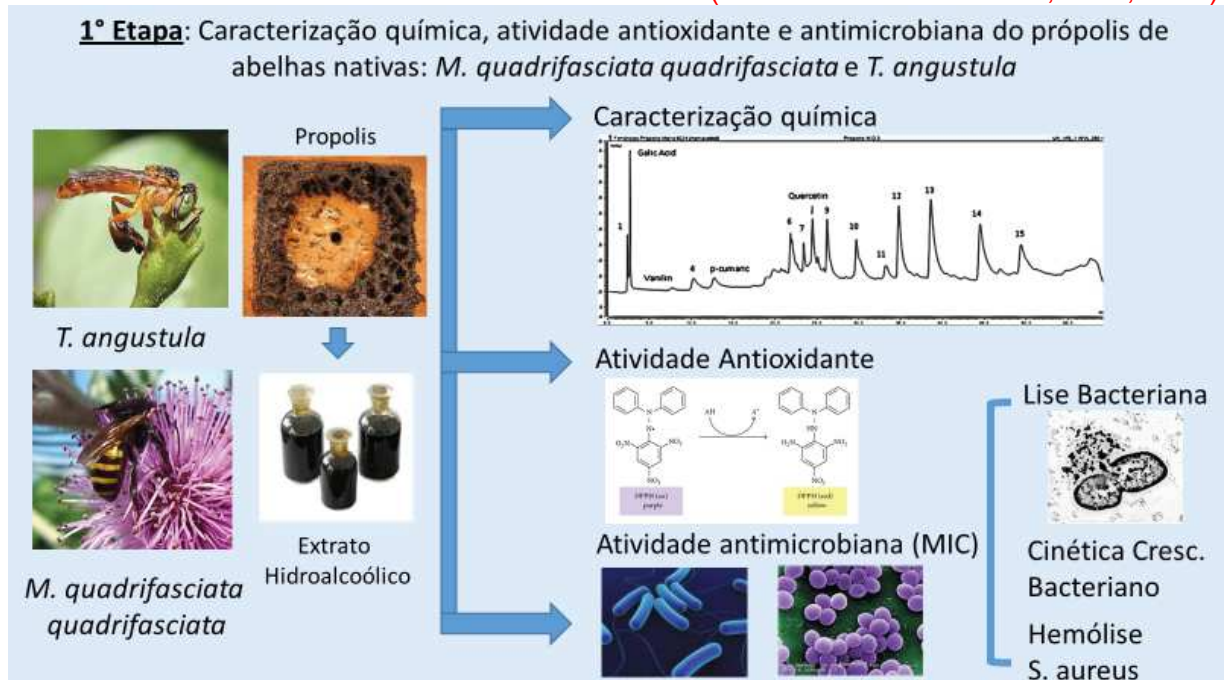
(DOUTORADO: TORRES, A. R., 2018)

Experimento 11: Teste da peritonite induzida por Carragenina (1%)				
Contagem de Leucócitos Totais				
Grupos	Descrição	Leuc./mL	Quant. Absol./ Car-Veículo.	Inib. Máx.(%) Relação Car.-Veículo
Controle	Salina-Veículo	1.680	↓	
Grupo 1	Car.-Veículo	3.310	-	
Grupo 2	Car.-Dexametazona	1.160	↓	65 ± 5
Grupo 3	Car.-EHP 300 mg/Kg	2.092	↓	37 ± 5
Polimorfunucleados (%)				
Grupos	Descrição	% Absoluto	Quantidade Absol./Car.-Veículo	Inib. Máx.(%) Relação Car.-Veículo.
Controle	Salina-Veículo	19,6	↓	
Grupo 1	Car.-Veículo	62,9	-	
Grupo 2	Car.-Dexametazona	23,7	↓	62 ± 6
Grupo 3	Car.-EHP 300 mg/Kg	42,8	↓	36 ± 4
Interleucina IL-17				
Grupos	Descrição	Valor (pg/mL/proteína)	Quantidade Absol./Carrag.	Inib. Máx.(%) Relação Car.-Veículo
Controle	Salina-Veículo	3,07	↓	
Grupo 1	Car.-Veículo	5,66	-	
Grupo 2	Car.-Dexametazona	1,85	↓	67 ± 3
Grupo 3	Car.-EHP 300 mg/Kg	2,14	↓	62 ± 3
Interleucina IL-6				
Grupos	Descrição	Valor (pg/mL proteína)	Quantidade Absol./Carrag.	Inib. Máx.(%) Relação Car.-Veículo
Controle	Salina-Veículo	179,7	↓	
Grupo 1	Car.-Veículo	332,7	-	
Grupo 2	Car.-Dexametazona	70,6	↓	79 ± 4
Grupo 3	Car.-EHP 300 mg/Kg	36,2	↓	89 ± 3
Interleucina IL-10				
Grupos	Descrição	Valor (pg/mL proteína)	Quantidade Absol./Carrag.	Acrésc. (X) Car.-Veículo
Controle	Salina-Veículo	323,4	↑	
Grupo 1	Car.-Veículo	16,04	-	
Grupo 2	Car.-Dexametazona	365,4	↑	22,78
Grupo 3	Car.-EHP 300 mg/Kg	545,7	↑	34,02

APÊNDICE D - RESUMO ILUSTRATIVO DOS ARTIGOS

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA *M. quadrifasciata quadrifasciata*

(DOUTORADO: TORRES, A. R., 2018)



Testes da atividade Antinociceptiva:

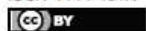
- Teste da Formalina
- Teste da Prostaglandinas E2
- Teste da Bradicinina
- Teste da Histamina
- Teste da Salina Acidificada
- Teste da PMA
- Teste de Forscolina

Testes da atividade Anti-inflamatória:

- Teste do edema de orelha induzido por xileno
- Teste da peritonite induzida por carragenina:
 - Contagem total e diferencial de células
 - Dosagem de proteínas
 - Dosagem de Interleucinas: IL-17, IL-6 e IL-10

APÊNDICE E - PRINT DA FOLHA DE APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2018) 51(6): e7118, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20187118>
ISSN 1414-431X Research Article



1/10

Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees

A.R. Torres^{1,2}, L.P. Sandjo³, M.T. Friedemann², M.M. Tomazzoli⁴, M. Maraschin⁴, C.F. Mello¹ and A.R.S. Santos^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

²Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

⁴Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

Abstract

In this study, we investigated the chemical composition, and antioxidant and antibacterial properties of ethanolic extracts of propolis (EEP) from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. Chemical composition of EEP was determined by colorimetry and chromatographic (HPLC-DAD and UPLC-Q/TOF-MS/MS) analysis. Antimicrobial activity of EEP was evaluated against gram-positive (*S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *E. faecalis*) and gram-negative (*E. coli* and *K. pneumoniae*) bacteria by the minimal inhibitory concentration (MIC) test using the microdilution method. Furthermore, the growth curve and integrity of cell membrane of *S. aureus* and *E. coli* were investigated using standard microbiological methods. HPLC-DAD analysis showed that the EEP of *M. quadrifasciata quadrifasciata* has a more complex chemical composition than the EEP of *T. angustula*. Moreover, UPLC-MS analyses of *M. quadrifasciata quadrifasciata* indicated flavonoids and terpenes as major constituents. The bactericidal activity of both EEPs was higher against gram-positive bacteria than for gram-negative bacteria. The EEP from *M. quadrifasciata quadrifasciata* presented MIC values lower than the EEP from *T. angustula* for all tested bacteria. The EEP from *M. quadrifasciata quadrifasciata* caused lysis of the bacterial wall and release of intracellular components from both *E. coli* and *S. aureus*. Our findings indicate that the chemical composition of propolis from stingless bees is complex and depends on the species. The extract from *M. quadrifasciata quadrifasciata* was more effective against gram-positive than gram-negative strains, especially against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* compared to *T. angustula* extract, by a mechanism that involves disturbance of the bacterial cell membrane integrity.

Key words: Stingless bees; Propolis; Antimicrobial activity; *S. aureus*; *M. quadrifasciata quadrifasciata*; *T. angustula*

Introduction

Propolis is a complex mixture of pollen and resinous and balsamic substances collected by bees from buds, flowers, and plant exudates, and bee salivary secretions (1). Since propolis is a bee product of plant origin, its chemical composition and biological activity depends on the specificity of the local flora, season of harvest, and bee species (2–4).

Different biological and therapeutic properties have been reported for propolis, including antioxidant (3,5), anti-inflammatory (5,6), immunomodulatory (7,8), antitumoral (8,9),

and antimicrobial activities (2,7,10,11) among others. It has been shown that propolis has bactericidal and bacteriostatic activity against various gram-positive bacteria, such as *S. aureus*, *S. mutans* and *B. subtilis*, and gram-negative bacteria, including *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (6,7,9,10). Moreover, a synergistic inhibitory effect of propolis and antibiotics on the growth of *S. aureus* has been reported (11). Such an antimicrobial activity of propolis is particularly relevant if one considers the increasing emergence

Correspondence: A.R.S. Santos: <adair.santos@ufsc.br>

Received September 12, 2017 | Accepted February 16, 2018

ANEXO A - SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 43648-2	Data da Emissão: 11/09/2014 00:58
Dados do titular	
Nome: Aledson Rosa Torres	CPF: 642.687.640-20

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.805/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) reobimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPÉCIE	Melipona bicolor, Tetragona angustula, Melipona quadrifasciata

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E REMESSA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 07 de Novembro de 2014</p> <p>Marcelo Marcos Moraes Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010814/2014-0 Validade: 07/11/2014 a 07/11/2018 Instituição: INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE CNPJ: 106.354.240/0001-86 Pesquisador: Aledson Rosa Torres CPF: 642.687.640-20 RG: 9055547849 - SSP / RS</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 5688902870390076 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---

ANEXO C - DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE MATERIAL DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP

DECLARAÇÃO

Florianópolis, 31 de Outubro de 2014

Declaro para os devidos fins que o Prof. ALEDSON TORRES do Instituto Federal Catarinense (IFSC) depositou na coleção fiel depositária do Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Deliberação MMA nº 044 de 18/12/2003) dois (02) exemplares de abelhas conforme a descrição abaixo:

Número	Nome comum	Gênero	Espécie	Data de Coleta	Coletor
1452	Mandaçala	Melipona	<i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>	29/10/14	Aledson Torres
1453	Jatal	Tetragonisca	<i>T. angustula</i>	30/10/14	Aledson Torres

E, por ser verdade, firmo a presente declaração.


 Prof. Dr. Edmundo C. Grisard
 Laboratório de Protozoologia
 MIP/CCB/UFSC

ANEXO D - CERTIFICADO DE SUBMISSÃO DE PROJETO A COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA PRÓPOLIS DA *M. quadrifasciata quadrifasciata*", protocolada sob o CEUA nº 7189251116, sob a responsabilidade de **Adair Roberto Soares dos Santos e equipe; Aledson Rosa Torres** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/05/2017.

We certify that the proposal "M. quadrifasciata quadrifasciata stingless bees: composition chemistry and antimicrobial activity of propolis", utilizing 448 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7189251116, under the responsibility of **Adair Roberto Soares dos Santos and team; Aledson Rosa Torres** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2014** a **12/2017**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **2 a 3 meses**

N: **448**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Resumo: A procura por produtos naturais com aplicação biológica tornou-se de grande interesse da comunidade científica, e não diferentemente, ocorreu com os produtos produzidos pelas abelhas: mel, própolis, cera, pólen. Inúmeros estudos tem sido desenvolvidos sobre a estrutura química e bioatividade da própolis de abelhas africanizadas (*A. mellifera*), tais como: anti-inflamatória e antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, hepatoprotetora, regeneração tecidual, citotóxica, entre outras. Contudo, há uma variedade de espécies de abelhas nativas na fauna brasileira, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (meliponíneos), as quais poucos estudos tem sido realizados, portanto, pouco se conhece a respeito da composição química e atividade de seus produtos e subprodutos. Ao desenvolver esse projeto tem-se como objetivo a caracterização química do extrato hidroalcoólico da própolis da *M. quadrifasciata quadrifasciata*, e a determinação do possível potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e antinociceptivos. Para isso, será determinado o conteúdo de compostos fenólicos totais, de flavonóides, composição química através de cromatografia gasosa de massa atômica, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana [in vitro]. Ainda serão realizados estudos [in vivo] da avaliação da atividade anti-inflamatória, através dos modelos da peritonite induzida por carragenina, e antinociceptiva, utilizando modelos de nocicepção aguda, pós-operatória e dor pós-isquemia crônica e no modelo animal de artrite séptica.

Local do experimento: Universidade Federal de Santa Catarina - Centro Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia Laboratório da Dor e Inflamação

Florianópolis, 09 de maio de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

ANEXO E – LICENÇAS PARA USO DE FIGURAS

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 06, 2018

This Agreement between Prof. Aledson Torres ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4303180354963
License date	Mar 06, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Molecular mechanisms of nociception
Licensed Content Author	David Julius, Allan I. Basbaum
Licensed Content Date	Sep 13, 2001
Licensed Content Volume	413
Licensed Content Issue	6852
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i>
Instructor name	Adair Roberto Soares dos Santos
Institution name	Universidade Federal de Santa Maria
Expected presentation date	Jun 2018
Portions	Figure 1, Image on page 204
Specific Languages	Português
Requestor Location	Prof. Aledson Torres Rod. SC 135 Km 125 Bairro Campo Experimental Videira, Santa Catarina 89560000 Brazil
Attn: Prof. Aledson Torres	
Billing Type	Invoice
Billing Address	Prof. Aledson Torres Rod. SC 135 Km 125 Bairro Campo Experimental Videira, Brazil 89560000 Attn: Prof. Aledson Torres
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions Springer Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a nonexclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where print only permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.0

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 06, 2018

This Agreement between Prof. Aledson Torres ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4303141498404
License date	Mar 06, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Inflammation
Licensed Content Title	Acute Inflammation and Metabolism
Licensed Content Author	Miguel Lourenço Varela, Mihail Mogildea, Ignacio Moreno et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2018
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO PRÓPOLIS DA <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i>
Instructor name	Adair Roberto Soares dos Santos
Institution name	Universidade Federal de Santa Maria
Expected presentation date	Jun 2018
Portions	Figure 1. Image on page 3
Specific Languages	Português
Requestor Location	Prof. Aledson Torres
	Rod. SC 135 Km 125
	Bairro Campo Experimental

Videira, Santa Catarina 89560000
Brazil

Attn: Prof. Aledson Torres
Billing Type Invoice
Billing Address Prof. Aledson Torres
Rod. SC 135 Km 125
Bairro Campo Experimental

Videira, Brazil 89560000
Attn: Prof. Aledson Torres
Total 0.00 USD
Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions Springer Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a nonexclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where print only permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

Other Conditions:

Version 1.0

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
