

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

DJACELI SAMPAIO DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI

**CORRELAÇÕES ENTRE OS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE PRÓPOLIS E
AS ATIVIDADES ANTIBIOFILME E ANTITRICOMONAS**

CAMPO GRANDE-MS

2017

DJACELI SAMPAIO DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI

**CORRELAÇÕES ENTRE OS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE PRÓPOLIS E
AS ATIVIDADES ANTIBIOFILME E ANTITRICOMONAS**

Trabalho de qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para futura obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Linha de Pesquisa: Prospecção, Síntese, Controle de qualidade, tecnologia farmacêutica e toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Brentan da Silva

CAMPO GRANDE-MS
2017

*Aos meus pais, por terem me guiado por bons caminhos.
Ao meu marido por ter me dado forças para chegar até aqui.*

*Pequena é a abelha entre os seres alados,
mas o que ela produz é o que há de mais doce e nobre.
(Eclesiástico 11,3)*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dilza e Juseval, por me incentivarem, darem apoio e serem exemplos de trabalho e dedicação.

Ao meu marido, Alexangelo, pelo apoio, por seu amor e por ser essa pessoa tão dedicada e companheira.

Ao Prof. Dr. Patrik Oening Rodrigues por me receber com sua orientação no programa de Pós-Graduação em Farmácia com um projeto diferente do proposto.

À Prof^a. Dr^a. Denise Brentan da Silva por ter me acolhido de braços abertos quando mais precisei, sendo paciente, amiga, compreensiva e acima de tudo acreditando em mim e no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo por ser um professor muito dedicado e presente no laboratório, estando à disposição dos alunos para ensinar e sanar dúvidas prontamente.

Ao Prof. Dr. Alexandre José Macedo e a Prof^a. Dr^a. Danielle da Silva Trentin, do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, pela parceria, suporte e desenvolvimento dos experimentos.

À Prof^a. Dr^a. Tiana Tasca e a Graziella de Vargas Rigo, do Grupo de Pesquisa em Tricomonas, pela parceria, apoio e obtenção dos dados.

A todos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, que me receberam calorosamente e atenciosamente na minha permanência nos laboratórios para participação e aprendizado dos métodos.

Aos técnicos Vanderlei, Micheli e Rúbia pelo auxílio e disposição a mim prestados.

As técnicas Amanda e Nadla pelos ensinamentos e suporte proporcionados.

Aos colegas de laboratório pela cooperação, convivência e pela descontração e trocas de experiências.

A amiga de mestrado Rosane Dias Cezar por dividirmos os momentos difíceis e as conquistas juntas.

Ao Apiários Vovô Pedro, Albano e Sônia, por disponibilizar todas as amostras de própolis utilizadas no decorrer deste trabalho.

Ao Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas, pela acolhida e aprendizado proporcionado.

A todos que colaboraram para conclusão deste trabalho, meu muito obrigada.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Própolis é uma mistura resinosa complexa produzida por abelhas. Sua composição varia, pois está relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas e a variedade genética da rainha. Os principais compostos da própolis são flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos clorogênicos e seus derivados, e responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória. O objetivo deste estudo é avaliar diferentes extratos de própolis contra biofilmes e o parasita *Trichomonas vaginalis* e caracterizar os constituintes responsáveis por estas atividades, pois ainda não há descrição dessas atividades associadas a própolis marrom brasileira, o que pode representar um avanço nos estudos biológicos de própolis, além de representar o desenvolvimento de novos produtos para o mercado correlacionados a estas atividades. Os biofilmes tratam-se de comunidades bacterianas complexas, que vivem organizadas e aderidas a uma superfície, biótica ou abiótica, envoltas em uma matriz exopolimérica. Cerca de 80% das bactérias vivem organizadas na forma de biofilmes, pois estas estruturas são menos sensíveis aos antibióticos e a resposta imune do hospedeiro, tornando-se um problema de saúde pública com recursos escassos que necessita de novas estratégias para prevenção e tratamento. Assim como *Trichomonas vaginalis*, o protozoário que parasita o sistema urogenital humano causando tricomoníase, doença sexualmente transmissível, com 276 milhões de casos anuais no mundo. Ao contrário de outras DSTs que majoritariamente ocorrem em adolescente e jovens adultos, a prevalência de tricomoníase é igualmente distribuída entre mulheres e homens sexualmente ativos de todas as faixas etárias. O tratamento para tricomoníase é restrito ao uso apenas dos fármacos metronidazol e tinidazol, apesar de serem uma opção terapêutica efetiva e de baixo custo há um crescimento nos casos de resistência a essa classe de antimicrobianos, com taxas próximas a 10%. Frente a estas limitações terapêuticas, é essencial a pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas para esta DST.

Palavras-Chave: Própolis, biofilme, *Trichomonas vaginalis*, artepilina C.

ABSTRACT

Propolis is a complex resinous mix produced by bees. Its composition changes because its related to the flora of each region visited by the bees and the queen genetic diversity. It has been used for centuries as food and popularly for treating various diseases. The main compounds of própolis and biological properties holders are flavonoids, phenolic acids, chlorogenic acids and their derivatives. The most important pharmacological activities already studied are antibacterial, antifungal, antitumor, antioxidant and anti-inflammatory. The aim of this study is to evaluate different extracts of propolis against biofilms and *Trichomonas vaginalis*, because there is still no description of these activities associated with Brazilian propolis, which may represent an advance in the biological studies of propolis, besides representing the development of new products to the market correlated with this activities. Biofilms are complex bacterial communities living organized and attached on a surface, wrapped in exopolimeric matrix. About 80% of live bacteria are organized in the form of biofilms because in these structures are less sensitive to antibiotics and host immune response, becoming a public health problem with scarce resources that needs new strategies for prevention and treatment. Like as *Trichomonas vaginalis*, the protozoan that parasites the human urogenital system causing trichomoniasis, a sexually transmitted disease, with 276 million annual cases in the world. Unlike other sexually transmitted disease that mostly happens in adolescent and young adults, the prevalence of trichomoniasis is also distributed among sexually actived women and men of all age groups. The trichomoniasis treatment is restricted to the use os metronidazole and tinidazole alone, although they are an effective and inexpensive therapeutic option and there is a increase in resistance to this class of antimicrobials, with rates close to 10%. Faced with this therapeutic limitation, it is essential to research and develop new alternatives for this sexually transmitted disease.

Keywords: Propolis, biofilm, *Trichomonas vaginalis*, artepillin C.

SUMÁRIO

<u>Resumo</u>	
<u>Abstract</u>	
<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>CAPÍTULO 1</u>	<u>3</u>
• <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>4</u>
1.1. <u>Composição química de própolis de origem brasileira</u>	<u>5</u>
1.1.1. <u>Tipos de própolis brasileiras e suas propriedades biológicas</u>	<u>7</u>
1.1.1.a. <u>Própolis Vermelha (PVeB) e Verde brasileiras (PVdB)</u>	<u>8</u>
1.1.1.b. <u>Própolis Marrom Brasileira (PMB)</u>	<u>16</u>
1.2. <u>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) na análise de produtos naturais</u>	<u>20</u>
1.3. <u>Biofilme</u>	<u>22</u>
1.3.1. <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	<u>25</u>
1.4. <u><i>Trichomonas vaginalis</i></u>	<u>26</u>
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>29</u>
• <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>30</u>
<u>CAPÍTULO 2</u>	<u>54</u>
• <u>ARTICLE THAT WILL SUBMIT TO FOOD CHEMISTRY</u>	<u>55</u>
• <u>ABSTRACT</u>	<u>56</u>

- **INTRODUCTION**..... 57
- **MATERIALS AND METHODS**..... 59
- **RESULTS AND DISCUSSION**..... 65
- **CONCLUSIONS**..... 76
- **REFERENCES**..... 77
- **CAP OF FIGURES AND TABLES**..... 82
- **SUPPLEMENTARY MATERIAL**..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de Diodos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSTs	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas <i>tandem</i>
EtOH	Etanol
Hx	Hexano
IES	Ionização por eletrospray
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
PR	Paraná
PEtH ₂ O/PR	Extrato hidroetanólico bruto de própolis marrom do Paraná
PEtH ₂ O/MG	Extrato hidroetanólico bruto de própolis marrom de Minas Gerais
PEtH ₂ O/MS	Extrato hidroetanólico bruto de própolis marrom de Mato Grosso do Sul
PEt/PR	Extrato etanólico de própolis marrom do Paraná após 1 <i>clean up</i> com hexano
PEt/MG	Extrato etanólico de própolis marrom de Minas Gerais após <i>clean up</i> com hexano
PEt/MS	Extrato etanólico de própolis marrom de Mato Grosso do Sul após <i>clean up</i> com hexano
PMS/DCM	Fração proveniente do extrato etanólico de própolis de MS (PEt/MS) obtida com diclorometano
PMS/AcOEt	Fração proveniente do extrato etanólico de própolis de MS (Pet/MS) obtida com acetato de etila
PMS/EtOH	Fração proveniente do extrato etanólico de própolis de MS (Pet/MS) obtida com etanol
PMB	Própolis marrom brasileira
PVdB	Própolis verde brasileira
PVeB	Própolis vermelha brasileira
UV	Espectro de ultravioleta

INTRODUÇÃO

A própolis, resina produzida por abelhas para vedar e proteger a colmeia, é utilizada desde os tempos remotos na medicina tradicional e atualmente é componente de vários produtos existentes no mercado como, por exemplo, sabonete, creme dental, antisséptico bucal, pomada, creme, spray de própolis, entre outros. Sua produção anual é de 100 toneladas no Brasil, e seu maior comprador é o Japão, absorvendo cerca de 80% da produção (Fernandes, 2014).

No Brasil, a própolis é frequentemente comercializada na forma de extrato hidroalcolólico ou em sua forma *in natura*. Esta comercialização é regida por regras que foram modificadas em Setembro de 2016 pela ANVISA, sendo que foram estabelecidos requisitos mínimos para o controle de qualidade de medicamentos a base de própolis. Dentre esses requisitos, constam informações sobre as características organolépticas (aspecto, cor, sabor e odor), físico-químicas (perda por dessecação, teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico, densidade, teor alcoólico, pH), determinação de contaminantes (pesquisa e identificação de patógenos, coliformes, fungos e leveduras, metais pesados, determinação de material estranho), determinação da atividade antioxidante, bem como determinações químicas que incluem teor de fenóis totais e flavonoides, análises qualitativa (perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica) e quantitativa de marcadores específicos ou controle biológico. Além disso, as empresas produtoras também devem fornecer informação sobre a espécie da abelha e as espécies da flora presentes no local da colmeia onde foi coletada a própolis (BRASIL, 2001, 2011, 2016).

A coloração da própolis e sua composição química variam de acordo com o bioma local, podendo ser encontradas própolis verde, vermelha e marrom no Brasil (Silva *et al.*, 2013; Shimomura *et al.*, 2013), sendo que a própolis marrom é a menos estudada até o momento e esta foi o alvo de estudo neste trabalho. Os componentes químicos predominantes já descritos em própolis são flavonoides, ácidos clorogênicos, ácidos fenólicos e seus derivados. Dentre as propriedades biológicas já exploradas para os extratos de própolis, encontram-se diversas atividades como, por exemplo, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-*Trypanossoma*, anti-leishmania, antitumoral e outras (Zhang *et al.*, 2014; Marcucci *et al.*, 2001; Sforcin, 2007). Porém, ainda há poucas descrições de suas atividades antibiofilme e antitricomonas, o que poderia representar um avanço nos estudos biológicos de própolis, além

de também poder representar o desenvolvimento de novos produtos no mercado correlacionados a essas atividades.

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte no mundo, sendo que as infecções bacterianas possuem grande destaque devido as altas taxas de mortalidade associadas a elas. Aproximadamente 80% das bactérias se organizam se na forma de biofilmes, o qual é resultante da produção de substâncias poliméricas extracelulares estabelecendo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as bactérias (Davey & O'Toole, 2000). Dentro dos biofilmes, as bactérias são menos sensíveis aos antibióticos, o que confere menor eficiência dos tratamentos terapêuticos e o desenvolvimento de infecções persistentes (Fletcher *et al.*, 2014). Os biofilmes bacterianos também estão associados a muitas infecções nosocomiais, principalmente a implantes biomédicos, como cateteres e próteses. Assim, grandes esforços são destinados à investigação de terapias capazes de impedir ou erradicar biofilmes patogênicos, incluindo a exploração de novos compostos e novos mecanismos de ação (Neidell *et al.*, 2012).

Outro alvo de estudo do projeto foi a avaliação de extratos e frações de própolis contra *Trichomonas vaginalis*, uma vez que há escassez de informações sobre a atuação da própolis contra este parasita. O protozoário flagelado *T. vaginalis* parasita o sistema urogenital humano causando a tricomoníase, uma doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo, e aproximadamente 276 milhões de novos casos são registrados anualmente. O tratamento para tricomoníase é baseado em nitroimidazólicos, porém já são conhecidas cepas resistentes a esses recursos terapêuticos destacando, assim, a necessidade de novos fármacos (Sutcliffe *et al.*, 2012; Schwebke e Barrientes, 2006).

Nosso trabalho será apresentado em dois capítulos; um relativo à revisão bibliográfica e outro com o artigo que será submetido. Inicialmente, serão abordados alguns aspectos sobre a comercialização da própolis, sua composição química, bem como suas propriedades biológicas. Posteriormente, o artigo será apresentado, juntamente com seu material suplementar.

Capítulo 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O nome própolis é originário do grego *pro* (em defesa) e *polis* (a cidade), o que se traduz em defesa da cidade ou colmeia (Marcucci, 1996). A própolis é uma resina natural produzida pelas abelhas que coletam material vegetal oriundo de flores, pólen, brotos e exsudados de árvores. Sua produção ocorre após a adição de secreções salivares e ceras pelas abelhas, sendo utilizada para fechar frestas da colmeia, protegendo-a contra a entrada de vento, luminosidade, insetos invasores e contaminação microbiológica (Sforcin, 2007).

Desde a antiguidade na Grécia e Roma, a própolis é utilizada para o tratamento de feridas e como cicatrizante. Os egípcios e incas a utilizavam para embalsamar corpos e como antitérmico, respectivamente (Sforcin & Bankova, 2011). Na Europa a utilização da própolis se tornou popular após o século XVII, e a primeira farmacopeia a descrevê-la foi a da Inglaterra no século XVII (Wagh, 2013). Nas décadas de 50 e 60, a própolis começou a ser difundida para tratamentos terapêuticos na ex-União Soviética e em países da Europa, como Bulgária, República Tcheca e Polônia. Já na China ela é utilizada para tratar câncer e infecções. Entretanto somente na metade dos anos 80, o Brasil começou a consumir a própolis na medicina alternativa e complementar (Salatino *et al.*, 2005).

Diversas finalidades medicinais da própolis podem ser citadas como, por exemplo, para tratar reumatismo, gripe, diabetes, úlceras e feridas (Huang *et al.*, 2014). Essa ampla utilização da própolis está relacionada a sua composição química, no qual diversos estudos já descreveram seus efeitos biológicos e a atuação de seus constituintes químicos em sinergismo (Sforcin & Bankova, 2011). Até o ano de 2000, mais de 300 compostos já haviam sido descritos em própolis, e dentre os principais compostos podemos destacar os polifenóis (Huang *et al.*, 2014). O primeiro trabalho publicado no Brasil sobre a própolis foi no ano de 1984. Esse estudo concluiu que a resina possuía efeitos de inibição contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, confirmando sua propriedade antimicrobiana (Shub *et al.*, 1981). A primeira patente brasileira sobre a própolis surgiu em 1995 para o uso em tratamentos odontológicos na prevenção de cáries e gengivites (Pereira, Seixas & Neto, 2002). Em levantamento realizado no banco de dados *Chemical Abstracts*, observamos que 741 patentes foram depositadas em 2016 envolvendo a própolis e apenas uma dessas foi a partir de própolis brasileira. Já com relação aos artigos publicados utilizando própolis, pode-se observar um elevado número de publicações

nos últimos 10 anos, porém somente 10 a 16% desses estudos foram realizados a partir de própolis brasileira (levantamentos realizados no banco *Chemical Abstracts*) (**Figura 1**).

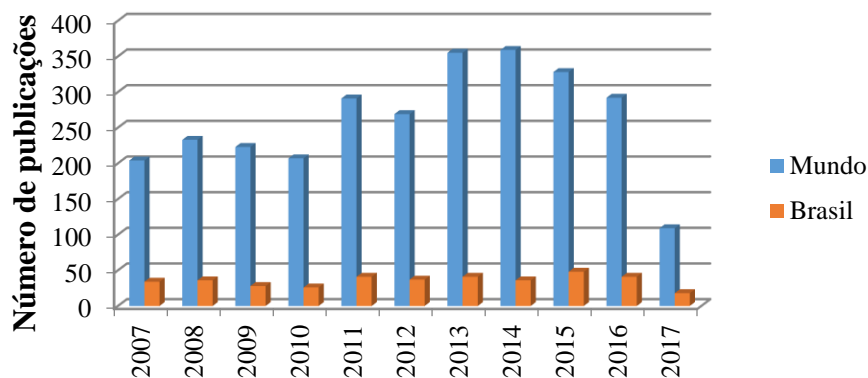


Figura 1. Número de publicações realizadas nos últimos dez anos envolvendo própolis.

No Brasil são produzidas 100 toneladas de própolis por ano, e cerca de 90% desta produção situa-se em Minas Gerais. Em 2015 o mercado, impulsionado pelas exportações, cresceu 18,8% (Evans, 2016). A própolis brasileira é exportada para diversos países, principalmente Japão, e é alvo de variadas investigações etnofarmacológicas como antimicrobiana, antinociceptiva, hepatoprotetora, anti-inflamatória e anticâncer (Franchin *et al.*, 2012, Park *et al.*, 2002, Bueno-Silva *et al.*, 2016a). Além de aplicações terapêuticas, a própolis também é utilizada como aditivo em alimentos e em cosméticos (De Groot, 2013), demonstrando a grande importância da própolis em diferentes áreas.

1.1. Composição química de própolis de origem brasileira

A composição da própolis inclui 50-60% de resinas, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de vários compostos orgânicos incluindo polifenóis (flavonoides e ácidos fenólicos) e terpenos, além de metais como ferro, zinco e magnésio, açúcares e vitaminas (B1, B2, B3 e B6) (Pastor *et al.*, 2010, Salatino *et al.*, 2005).

Os componentes químicos predominantes já descritos em própolis são flavonoides, ácidos clorogênicos e ácidos fenólicos e seus derivados. Dentre as atividades já exploradas para os extratos de própolis, encontram-se as atividades antioxidante, antimicrobiana, anticâncer,

anti-inflamatória (Zhang *et al.*, 2014; Marcucci *et al.*, 2001, Franchin *et al.*, 2012, Park *et al.*, 2002, Bueno-Silva *et al.*, 2016) e muitas outras como pode ser visualizado nas **Tabelas 1 e 2**.

Os polifenóis incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres são geralmente os componentes químicos que estão sendo correlacionados com suas bioatividades, como em própolis de zonas temperadas de ambos os hemisférios Norte e Sul (Zhang *et al.*, 2014). Alguns estudos apontam que a própolis da Europa e China contém vários tipos de flavonoides e ácidos fenólicos, enquanto que amostras brasileiras contém majoritariamente terpenoides e derivados prenilados de ácido *p*-cumárico (Mello *et al.*, 2010).

Os flavonoides são compostos fenólicos e um dos mais importantes grupos constituintes da própolis, podendo representar até 50% do seu conteúdo, dependendo da região onde é coletada. A quantidade total de flavonoides é um importante índice que se reflete em sua qualidade e seu valor medicinal (Sohrabi & Darabi, 2016). Esses compostos são abundantes em plantas e originários de uma biossíntese mista (via chiquimato e acetato). Eles podem ser divididos em diferentes grupos, dependendo do nível de oxidação do anel C e e substituição na posição C-3 (**Figura 2**) (Zuanazzi & Montanha, 1999).

Os flavonoides compoem uma grande família de metabólitos secundários encontrados nas plantas, e eles existem em formas de agliconas e glicosídeos. Um crescente interesse em flavonoides vem sendo observado devido a seus efeitos benéficos sobre a saúde, tais como as propriedades antioxidantes, ação estrogênica, e um largo espectro antimicrobiano e atividades farmacológicas. Porém, os flavonoides não podem ser biossintetizados no corpo humano, sendo obtidos exclusivamente pela nossa dieta através da ingestão de vegetais, frutas e bebidas (Luo *et al.*, 2011).

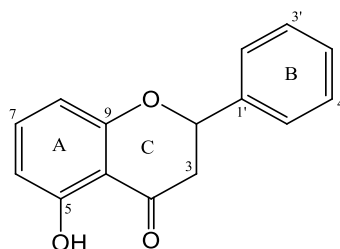


Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides descritos em própolis.

Alguns estudos têm demonstrado a relação direta entre a atividade biológica da própolis e sua composição química, a qual depende da diversidade geográfica da flora local, sazonalidade e da variedade genética da abelha rainha (Silva *et al.*, 2013). Entretanto, Simões-Ambrosio e colaboradores (2010) demonstram que a sazonalidade em um ano de coleta influenciou apenas quantitativamente a composição da própolis verde, mas essas amostras revelaram significantes diferenças nos efeitos oxidativos sobre neutrófilos. Esses efeitos foram correlacionados com as concentrações de baccharina e éter aromadendrin-4'-metílico, entretanto a artepilina C não foi de grande relevância para o efeito biológico. Já nos estudos realizados por Teixeira e colaboradores (2010), própolis verdes oriundas de três localidades de Minas Gerais foram analisadas por um período de um ano. Essas amostras, analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), mostraram alterações qualitativas e quantitativas nos perfis químicos, bem como em suas atividades antioxidantes (DPPH).

Diferentes própolis originárias de diferentes regiões do Brasil foram analisadas por cromatografia em camada delgada de alta performance, cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) e CG-EM. De acordo com suas características físico-químicas, as própolis foram classificadas em 12 grupos, sendo que os grupos originários do Sul, Sudeste e Nordeste eram produzidos principalmente a partir de resinas das espécies vegetais de *Populus ssp.*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente (Park *et al.*, 2002).

1.1.1. Tipos de própolis brasileiras e suas propriedades biológicas

As abelhas da espécie *Apis mellifera* são as principais produtoras de própolis e mel no Brasil, sua distribuição nativa está localizada na Europa, África e Oriente Médio, porém foi introduzida na América do Sul a partir de 1600 e no Brasil no ano de 1956 com colmeias experimentais na zona rural de São Paulo (Nelson *et al.*, 2017).

A coloração da própolis e sua composição química variam de acordo com o bioma local, podendo ser encontradas as própolis verde, vermelha e marrom. As diferenças na origem vegetal causam mudanças nas suas propriedades químicas, e conseqüentemente nas atividades biológicas, sabor, cor e textura (Silva *et al.*, 2013; Shimomura *et al.*, 2013).

A composição química é indicativa da origem botânica da própolis, no qual indica a(s) possível(is) fonte(s) vegetal(is). Tais informações são importantes para a aplicação em controle de qualidade e padronização de amostras para utilização terapêutica, uma vez que essa variedade química altera significativamente as suas propriedades biológicas (Park *et al.*, 2002, Lustosa *et al.*, 2008).

1.1.1.a. Própolis Vermelha (PVeB) e Verde brasileiras (PVdB)

A própolis vermelha é encontrada em países como Cuba, Venezuela, México e Brasil, possuindo algumas similaridades químicas e biológicas (Benhanifia & Mohamed, 2015). Em 2007, treze tipos de própolis vermelhas brasileiras (PVeB) foram analisadas por CG-EM e CLAE-DAD e avaliadas contra *Staphylococcus aureus* e *S. mutans*. Em todas as amostras foram identificados flavonóis e algumas isoflavonas, o que é uma característica marcante da PVeB (Alencar *et al.*, 2007).

A PVeB é encontrada na região litoral do nordeste do Brasil (nos estados da Bahia, Alagoas, Paraíba, Sergipe e Pernambuco), no qual há predomínio da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae) como fonte vegetal. A resina de própolis possui a coloração avermelhada devido a resina secretada nesta espécie possuir essa pigmentação (López *et al.*, 2014).

Recentemente, um artigo de revisão sobre as propriedades farmacológicas e constituintes químicos da própolis vermelha foi publicado (Freires *et al.*, 2016). Em sua composição já foram descritas diversas substâncias, incluindo isoflavonoides, pterocarpanos, chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, benzofenonas preniladas, terpenos e taninos (Alencar *et al.*, 2007, Piccinelli *et al.*, 2011, Trusheva *et al.*, 2006, Mayworm *et al.*, 2014, Freires *et al.*, 2016). Além disso, convém destacar que os compostos considerados marcadores da PVeB são os isoflavonoides formononetina e biochanina A, bem como a flavanona pinocembrina e o pterocarpano medicarpina (**Figura 3**) (Lopez *et al.*, 2014, Trusheva *et al.*, 2006).

A composição química da própolis vermelha é bastante diferente de outras, principalmente por causa da vegetação presente em sua origem geográfica (Alencar *et al.*, 2007, Piccinelli *et al.*, 2011, Freires *et al.*, 2016). Recentemente, uma benzofenona poliisoprenilada,

A PVeB também apresentou atividade antifúngica contra diversas espécies de *Candida* isoladas de pacientes mulheres (Bezerra *et al.*, 2015), bem como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (Freires *et al.*, 2016). Além disso, ela também mostrou efeitos modulatórios *in vivo* sobre a hipertensão e danos renais (Teles *et al.*, 2015).

A atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* do extrato etanólico de própolis foi maior do que a atividade da isoflavona isolada formononetina (Cavendish *et al.*, 2015). Alguns mecanismos de ação da própolis vermelha têm sido esclarecidos como, por exemplo, na modulação de migração de neutrófilos no processo de inflamação (Bueno-Silva *et al.*, 2016a) e atenuação na cascata de sinalização da inflamação em macrófagos LPS ativados (Bueno-Silva *et al.*, 2015) entre outros.

A própolis vermelha tem se mostrado ativa contra diversas bactérias como, por exemplo, *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii* (Bueno-Silva *et al.*, 2016 b, Alencar *et al.*, 2007), *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (Vasconcelos *et al.*, 2014), sendo aplicada em tratamento anticárie (Bueno-Silva *et al.*, 2013). O tratamento oral com PVeB também induziu a atividade estrogênica devido à presença de isoflavonoides, refletindo em melhoras dos sintomas da menopausa em mulheres (Okamoto *et al.*, 2015). Outras propriedades biológicas da própolis vermelha encontram-se sumariadas na **Tabela 1** (pag. 13).

Outro tipo de própolis encontrado no Brasil é a própolis verde, a qual é uma das mais consumidas no mercado, sendo o Brasil seu principal produtor e exportador. Popularmente, ela é relatada como detentora de excelência nas propriedades medicinais, possuindo maiores teores de flavonoides e fenóis totais, além de ser caracterizada por ter alto valor no mercado e ser produzida principalmente na região Sudeste do Brasil (Woiski & Salatino, 1998).

A própolis verde brasileira (PVdB) possui entre 6,4 a 15,2% (m/m) de compostos fenólicos em seus extratos etanólicos (Woiski & Salatino, 1998), o que está de acordo com a legislação brasileira, pois esta preconiza o mínimo de 0,5% (m/m) de flavonoides totais e 5 % de fenólicos totais em amostras de própolis (Paviani *et al.*, 2010). Esses teores de flavonoides e fenóis totais são correlacionados positivamente com a atividade antioxidante de PVdB (Cottica *et al.*, 2011), porém algumas acetofenonas já foram descritas em amostras de PVdB, sendo que estas também reagem com $AlCl_3$ e assim a quantificação de flavonoides totais podem apresentar valores distorcidos do real (Bankova & Marcucci, 2000, Sawaya *et al.*, 2011).

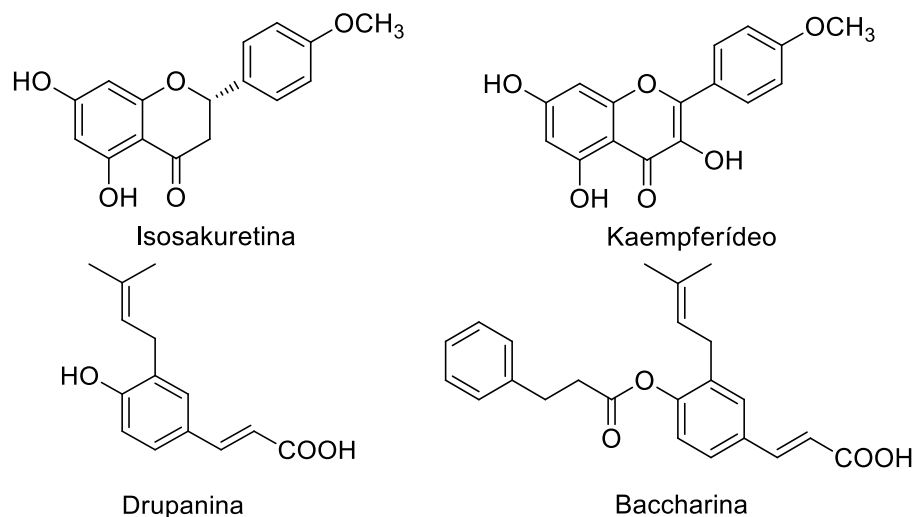


Figura 4. Estruturas químicas de alguns importantes constituintes da própolis verde brasileira (PVdB).

A constituição química de PVdB inclui vários tipos de terpenoides, ácidos hidroxicinâmicos, seus derivados prenilados e ácidos cafeoilquímicos (ácidos clorogênicos) (Salatino *et al.*, 2011, Bankova, 2005). A artepilina C, baccharina e drupanina (**Figuras 4-5**, pag. 17) são os principais compostos presentes em PVdB, os quais são constituintes também presentes em *Baccharis dracunculifolia*, uma das espécies utilizadas pelas abelhas como fonte de coleta para a produção da própolis (Park *et al.*, 2002, Simões *et al.*, 2004, Salatino *et al.*, 2005, Teixeira *et al.*, 2005). A coloração verde de PVdB está relacionada a presença de clorofila coletada pelas abelhas em tecidos jovens de *B. dracunculifolia*, a qual é uma espécie pertencente a família Asteraceae, sendo encontrada no Brasil (Sul e Sudeste), Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia (Fukuda *et al.*, 2006).

Além de artepilina C, baccharina e drupanina, também foram identificados de PVdB ácidos cumárico e ferúlico, bem como os flavonoides pinobanksina, isosakuretin e kaempferídeo (**Figura 4**) (Simões *et al.*, 2004). Recentemente, um método de análise por CLAE-DAD foi desenvolvido, juntamente com a utilização de análises multivariadas, para a discriminação de PVdB em relação aos outros tipos de própolis, sendo este um método eficiente e reprodutível (Funari *et al.*, 2016).

A artepilina C (**Figura 5**) está presente apenas em própolis que foram produzidas a partir da fonte vegetal *B. dracunculifolia*, sendo encontrada em própolis verde e marrom (Matsuda & Almeida-Muradian, 2008, Machado *et al.*, 2016). Os primeiros relatos da determinação desta substância como biomarcador da própolis brasileira foram publicados por pesquisadores

japoneses, sendo que nestes estudos a artepilina C foi identificada como o principal composto bioativo e responsável pelas atividades antitumoral e antioxidante (Kimoto *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2004). Além disso, esta substância possui atividade analgésica e anti-inflamatória (Paulino *et al.*, 2008).

Diversas propriedades biológicas já foram descritas para PVdB como antimicrobiana, antioxidante, antiúlcera, anti-inflamatória, imunomodulatório, antitumoral e outras. As principais propriedades biológicas de PVdB encontram-se sumariadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais atividades biológicas descritas para as própolis vermelha brasileira (PVeB) e verde brasileira (PVdB).

Tipo de própolis	Atividades farmacológicas	Referência
Própolis vermelha	Antibacteriana	
	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Oldoni <i>et al.</i> , 2011, Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013a, 2016
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Lopez <i>et al.</i> , 2014
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014, Siqueira <i>et al.</i> , 2014, Lopez <i>et al.</i> , 2014
	<i>Escherichia coli</i>	Trusheva <i>et al.</i> , 2006, Lopez <i>et al.</i> , 2014
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Lopez <i>et al.</i> , 2014
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014
	<i>Prevotella intermedia</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Alencar <i>et al.</i> , 2007, Oldoni <i>et al.</i> , 2011, Grenho <i>et al.</i> , 2015, Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014, Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013a, 2016b, Trusheva <i>et al.</i> , 2006, Lopez <i>et al.</i> , 2014
	<i>Streptococcus mutans</i>	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014, Oldini <i>et al.</i> , 2011, Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013a, Alencar <i>et al.</i> , 2007, Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2016b, Lopez <i>et al.</i> , 2014
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2007, 2016b
	Anti-inflamatória	
	Inibição da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal	Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2016a
	Cicatrização de feridas (inflamação e epitelização - <i>in vivo</i>)	Batista <i>et al.</i> , 2012
	Queimadura	Almeida <i>et al.</i> , 2013
	Atenuação da cascata de sinalização em macrófagos ativado	Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2015
	Antinociceptivo (<i>in vivo</i> – extrato e formononetina)	Cavendish <i>et al.</i> , 2015
	Cicatrização da córnea	Martin <i>et al.</i> , 2013
Anticárie	Bueno-Silva <i>et al.</i> , 2013	
Antifúngica		
<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i>	Trusheva <i>et al.</i> , 2006, Pippi <i>et al.</i> , 2015, Bezerra <i>et al.</i> , 2015, Lopez <i>et al.</i> , 2014	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lotti <i>et al.</i> , 2011	

<i>Trichophyton</i> spp.	Siqueira <i>et al.</i> , 2009
Antioxidante	
Oxidação do ácido linoleico	Oldoni <i>et al.</i> , 2011
Oxidação do ácido linoleico e DPPH	Trusheva <i>et al.</i> , 2006
DPPH	Alencar <i>et al.</i> , 2007, Frozza <i>et al.</i> , 2014, 2013, Righi <i>et al.</i> , 2011, Mendonça <i>et al.</i> , 2015
DPPH e ABTS	Machado <i>et al.</i> , 2016
Capacidade de absorvência de radical oxigênio	Espinosa <i>et al.</i> , 2015
Ensaio de superóxido dismutase e catase	Frozza <i>et al.</i> , 2014
Antitumoral	
Apoptose e migração	Begnini <i>et al.</i> , 2014
Expressão diferencial proteica em células cancerígenas	Frozza <i>et al.</i> , 2014
Citotóxica (K562, HL60, RPMI8226, B16F10, Hep-2, HeLa, PANC-1, A549, B16, BL6, Nalm6, MCF-7, RC-58T, SF-295, OVCAR-8, HCT-116)	Novak <i>et al.</i> , 2014, Alencar <i>et al.</i> , 2007, Li <i>et al.</i> , 2008, Awale <i>et al.</i> , 2008, Kamiya <i>et al.</i> , 2012, Franchi Jr. <i>et al.</i> , 2012a, Moraes <i>et al.</i> , 2010, Pinheiro <i>et al.</i> , 2014, Mendonça <i>et al.</i> , 2015, Frozza <i>et al.</i> , 2013
Outras propriedades farmacológicas	
Efeito modulatório na hipertensão e ao dano renal (<i>in vivo</i>)	Teles <i>et al.</i> , 2015
Aumento do efluxo de colesterol em macrófagos e do transportador ligação-ATP	Iio <i>et al.</i> , 2012

Própolis verde

Antibacteriana

<i>Bacillus subtilis</i>	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Neisseria</i> spp, <i>Streptococcus acidominimus</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Veillonella parvula</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Morawiec <i>et al.</i> , 2015
<i>Escherichia coli</i>	Machado <i>et al.</i> , 2016,
<i>Helicobacter pylori</i> (<i>in vivo</i> , humanos – pouco efeito)	Coelho <i>et al.</i> , 2007
<i>Micrococcus luteus</i>	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	Machado <i>et al.</i> , 2016, Bittencourt <i>et al.</i> , 2015, Oliveira <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptococcus mutans</i>	Cardoso <i>et al.</i> , 2016, Leitão <i>et al.</i> , 2004

Anti-inflamatória

Cicatrização de feridas (inflamação e epitelização – <i>in vivo</i>)	Batista <i>et al.</i> , 2012
-----------------------------------------------------------------------	------------------------------

Analgésico e anti-inflamatório (inibição da expressão iNOS)	Paulino <i>et al.</i> , 2006
Imunomodulação (expressão de mRNA a IFN- γ)	Fischer <i>et al.</i> , 2007, Machado <i>et al.</i> , 2012
Supressão da liberação de leucotrienos e outros mediadores	Tani <i>et al.</i> , 2010, Szliszka <i>et al.</i> , 2013
Supressão da reativação de células CD4 T	Cheung <i>et al.</i> , 2011
Anti-Trypanosoma	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Salomão <i>et al.</i> , 2011
Anti-Leishmania	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Pontin <i>et al.</i> , 2008
Antifúngica	
<i>Candida ssp.</i> (candidíase oral)	Capistrano <i>et al.</i> , 2013, Santos <i>et al.</i> , 2005
Antioxidante	
DPPH e ABTS	Machado <i>et al.</i> , 2016,
DPPH	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015, Fabris <i>et al.</i> , 2013, Szliszka <i>et al.</i> , 2013
Ensaio anion superóxido	Simões <i>et al.</i> , 2004
Antitumoral	
Citotóxico (B16F10, A549, HepG2, U343, LNCaP)	Machado <i>et al.</i> , 2016, Frión-Herrera <i>et al.</i> , 2015, Oliveira <i>et al.</i> , 2014, Szliszka <i>et al.</i> , 2011
Outras propriedades farmacológicas	
Antiobesidade (indução de leptina em adipócitos)	Washi <i>et al.</i> , 2015
Antiobesidade (agonista rector retinoide)	Nakashima <i>et al.</i> , 2014
Proliferação de queratonócitos (crescimento capilar)	Miyata <i>et al.</i> , 2014
Cicatrização (fibroblastos NIH-3T3)	Funari <i>et al.</i> , 2007
Antiúlceras	Barros <i>et al.</i> , 2007
Neuroproteção (inibição do estresse oxidativo)	Shimazawa <i>et al.</i> , 2005, Nakajima <i>et al.</i> , 2009
Antiangiogênico	Dornelas <i>et al.</i> , 2012
Induz o sistema imune	Gao <i>et al.</i> , 2014

1.1.1.b. Própolis Marrom brasileira (PMB)

A variedade marrom de própolis é a mais comum produzida e estudada em outros países, porém a própolis marrom brasileira (PMB) é a menos estudada em relação às outras e esta foi o alvo em nossa pesquisa. A PMB se destaca por sua grande concentração de ácidos graxos como ácido oleico, ácido linoleico, palmitato, estearato, e também possui compostos polifenólicos, principalmente derivados do ácido cumárico e flavonoides (Castro *et al.*, 2009) (**Tabela 2**).

Na análise por microscopia de amostras de própolis brasileiras (vermelha, verde e marrom) foi possível confirmar a presença tecidos com tricomas tectores e glandulares oriundos de *B. dracunculifolia* (Bastos *et al.*, 2011) em PVdB, e elementos similares também foram observados em PMB. Além desses, em PMB também foram observadas estruturas provindas de espécies de *Copaifera*, as quais foram visitadas pelas abelhas produtoras de PMB (Sawaya *et al.*, 2006, Machado *et al.*, 2016).

Os flavonoides crisina e pinocembrina já foram descritos para própolis originários de regiões temperadas na Europa e América do Norte, assim como terpenos oriundos de resinas de *Araucaria angustifolia* (Sawaya *et al.*, 2004, Bankova *et al.*, 1999). Estes flavonoides e outros também foram observados em amostras de PMB da região Sul (Sawaya *et al.*, 2004). Além disso, a partir da PMB originária do estado do Paraná foram isolados seis diterpenos clerodanos, os quais exibiram atividade de inibição do crescimento de quatro linhagens de células de câncer humano (LNCaP, MCF-7, DLD-1 e A549) (Tazawa *et al.*, 2016).

Recentemente, um trabalho de comparação química e biológica (atividade antioxidante) foi realizado utilizando extratos etanólicos e supercrítico de PVeB (2 amostras do Nordeste – Alagoas e Sergipe), PMB (3 amostras do Sul- Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná) e a própolis verde brasileira (PVdB) (3 amostras do Sul e Sudeste - Paraná e Minas Gerais). O PVeB apresentou os maiores teores de flavonoides e fenólicos totais, com também melhores atividades antioxidantes (DPPH e ABTS). As própolis PVdB e PMB apresentaram valores semelhante de atividade antioxidante e também de teor total de fenólicos e flavonoides. Além disso, a quantificação de artepilina C e ácido cumárico nas amostras demonstrou que todas as própolis PVdB e PMB de Paraná e Santa Catarina apresentaram artepilina C, porém em concentrações menores do que as observadas em própolis PVdB (Machado *et al.*, 2016).

A artepilina C e ácido cumárico (**Figura 5**) são considerados marcadores da própolis PVdB, e sugerem a *B. dracunculifolia* como uma das principais fontes vegetais (Park *et al.*, 2002). Os extratos de própolis PVeB, PVdB, PMB também foram avaliados contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 33951 e 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), e mostraram maior atividade contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* do que na gram-negativa *E. coli* (Machado *et al.*, 2016). Esses resultados estão de acordo com dados publicados que justificam essa diferença na atividade com relação a diferenças estruturais na parede celular bacteriana (Koru *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2012, Silici & Kutluca, 2005).

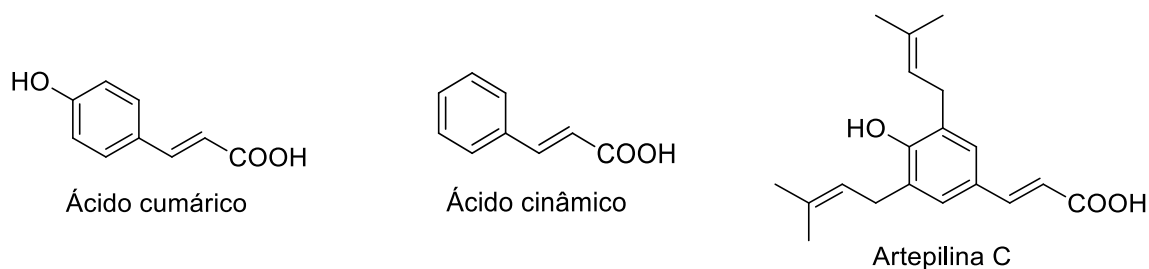


Figura 5. Estruturas químicas de alguns importantes constituintes da própolis marrom brasileira (PMB).

Tabela 2. Compostos químicos já descritos em própolis marrom brasileira (PMB).

Compostos	Referências
Flavonoides	
<i>Flavanonas</i>	
Hesperetina, pinocembrina	Waller <i>et al.</i> , 2017
<i>Flavonas</i>	
Apigenin, crisina, luteolina e 5-metoxi-luteolina	Waller <i>et al.</i> , 2017, Fernandes-Silva <i>et al.</i> , 2013, Sawaya <i>et al.</i> , 2004
<i>Flavanonols</i>	
Diidrokaempferideo, Metoxi-pinobanksina	Machado <i>et al.</i> , 2016b, Fernandes-Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>Flavonois</i>	
Dimetil quercetina, galangina, isoramnetina, kaempferol quercetina, rutina	Waller <i>et al.</i> , 2017, Machado <i>et al.</i> , 2016b, Fernandes-Silva <i>et al.</i> , 2013
Ácidos clorogênicos	
Ácido clorogênico, ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico, ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -cafeoilquínico	Waller <i>et al.</i> , 2017, Machado <i>et al.</i> , 2016b, Fernandes-Silva <i>et al.</i> , 2013
Fenilpropanoides	
Ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, hidrocinnamato de etila, ácido benzenopropanóico, cinamato de metila, <i>trans</i> -cinamato de sitosterila, hidrocinnamato de metila	Waller <i>et al.</i> , 2017, Machado <i>et al.</i> , 2016a, Bittencourt <i>et al.</i> , 2015, Fernandes-Silva, 2013 Santos, David & David, 2017
Fenilpropanoides prenilados	
Artepilina C, ácido 4-hidróxi-3-prenil- cinâmico, ácido 3,4-di-hidróxi 5-prenil cinâmico, baccharina, drupanina, ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	Machado <i>et al.</i> , 2016a, 2016b, Fonseca <i>et al.</i> , 2011, Fernandes-Silva <i>et al.</i> , 2013, Sawaya <i>et al.</i> , 2004, Rodrigues <i>et al.</i> , 2016
Outros fenólicos	
Ácido 4-hidróxido benzóico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido elágico, ácido 2,2-dimetil-6-carboxietinil-2H-1-benzopirano, ananixantona (xantona)	Waller <i>et al.</i> , 2017, Bittencourt <i>et al.</i> , 2015, Rodrigues <i>et al.</i> , 2016, Santos, David e David, 2017
Terpenos	
<i>Monoterpenos</i>	
α -pineno	Fernandes <i>et al.</i> , 2015
<i>Sesquiterpenos</i>	
7- epi-Sesquitujeno, <i>allo</i> -aromadendreno, aromadendreno, cariofileno, espatulenol, germacreno D, <i>trans</i> -cadina-1,4-dieno, <i>trans</i> -nerolidol, viridifloreno, α -cadineno, α -cis-bergamoteno, α -copaeno, α -cubebeno, α -curcumeno, α -gurjuneno, α -himachaleno, α -humuleno, α -muuroleno α - <i>trans</i> -bergamoteno, α -ylangeno, β -bisaboleno, β -curcumeno, β -elemeno, β -gurjuneno, β -selineno, γ -cadineno, γ -muuroleno, δ -cadineno	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015, Fernandes <i>et al.</i> , 2015
<i>Diterpenos</i>	
(5S,6S,8R,9R,10S,18R,19S)-18,19-epoxy-2-oxocleroda-3,12(E),14- triene-6,18,19-triol 18,19-diacetate 6-benzoate (clerodano) e outros 5 diterpenos	Shigemi <i>et al.</i> , 2016, Machado <i>et al.</i> , 2016b, Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
Ácido agático (ent-labdano)	
Epimanol	
<i>Triterpenos</i>	
Cicloartenol, lupeol	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
Ácidos Graxos	
Ácido <i>cis</i> -oleico, hexadecanoato de etila, oleato de etila, tetracosanoato de etila, γ -palmitolactona, ácido hexadecanóico, <i>cis</i> -9-octadecenoato de metila, hexadecanoato de metila, tetracosanoato de metila	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015

Estudos contra células tumorais mostraram atividades dos extratos de PVeB e PVdB, sendo a PMB menos ativa, porém entre essas amostras de PMB mais ativas observou-se maiores concentrações de artepilina C (Machado *et al.*, 2016a,b). A PMB coletada no Mato Grosso do Sul foi analisada em estudos quantitativos e demonstrou menores concentrações de artepilina C e ácidos cumárico e cinâmico (**Figura 5**) em relação a PVdB, bem como menor teor de fenóis totais (Rodrigues *et al.*, 2016). Esses extratos de PMB também mostraram ausência de efeitos mutagênicos em testes de recombinação e mutação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster*, o que confirma que a atividade antimicrobiana desses extratos não está associada a indução de danos ao DNA (Fernandes *et al.*, 2014). Além disso, o extrato aquoso de própolis de origem do Cerrado brasileiro também não apresentou mutagenicidade *in vivo* em testes do micronúcleo e *in vitro* contra células V79 (Rocha *et al.*, 2013).

Em estudo recente Waller e colaboradores (2017) analisaram amostras de própolis de Pelotas/RS, frente a cepas resistentes de *Sporothrix brasiliensis* isoladas de gatos e cachorros. O extrato hidroalcoólico dessas amostras de própolis inibiu o crescimento de 100% dos fungos e apresentou MIC de 3,125 mg/mL.

Diversas propriedades biológicas já foram descritas para PMB, como antibacteriana, antioxidante (Fernandes., *et al* 2014, 2016, Machado *et al.*, 2016a), anti-inflamatória (Conti *et al.*, 2015), antiparasitária (Alday-Provencio *et al.*, 2015, Silva *et al.*, 2017), antitumoral (Machado *et al.*, 2016a, 2016b) e outras, como pode ser observado na **Tabela 3**. Convém destacar, que em comparação com as própolis brasileiras PVeB e PVdB, a PMB apresenta informações mais restritas sobre suas propriedades biológicas.

Tabela 3. Principais atividades biológicas descritas para a própolis marrom brasileira (PMB).

Atividades farmacológicas	Referência
Antioxidante	
ABTS	Silva <i>et al.</i> , 2017, Machado <i>et al.</i> , 2016a
DPPH	Machado <i>et al.</i> , 2016a, Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
Peroxidação lipídica, Luminol/H ₂ O ₂ , Xantina	Fonseca <i>et al.</i> , 2011
Antitumoral	
Citotóxica (B16F10, SF-295, HCT-116, OVCAR-8, HL-60)	Machado <i>et al.</i> , 2016a, 2016b
Anti-inflamatório	
<i>In vivo</i> (lesões por Herpes simplex tipo 2)	Sartori <i>et al.</i> , 2010
Citocinas (TNF- α e interleucina IL-10)	Conti <i>et al.</i> , 2015, Yen <i>et al.</i> , 2017
COX-2	
Anti-Leishmania	
<i>Leishmania amazonensis</i>	Santana <i>et al.</i> , 2014
Anti-Trypanossoma	
<i>Trypanossoma cruzi</i>	Silva <i>et al.</i> , 2017
Antibacteriana	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
<i>Enterococcus faecalis</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 2015, Machado <i>et al.</i> , 2016b, Pimenta <i>et al.</i> , 2015
<i>Escherichia coli</i>	Machado <i>et al.</i> , 2016a, Bastos <i>et al.</i> , 2011a
<i>Micrococcus luteus</i>	Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	Machado <i>et al.</i> , 2016a, Bittencourt <i>et al.</i> , 2015
Antifúngica	
<i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	Waller <i>et al.</i> , 2017
Antigenotoxicidade	Fernandes <i>et al.</i> , 2014

1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) na análise de produtos naturais

A técnica hifenada CLAE-EM é um dos métodos mais robustos e versáteis utilizado nas análises de amostras complexas e na fitoquímica (Eom *et al.*, 2017). As vantagens dessa técnica são a rapidez, eficiência na separação dos compostos e alta sensibilidade. Além disso, a técnica de CLAE é facilmente acoplada a espectrômetros de massas com fonte de ionização por eletrospray (IES), sendo ideal para análises de substâncias de média a alta polaridade e termolábeis (Zhang *et al.*, 2014).

A ionização por eletrospray (IES) é totalmente compatível com esta técnica, além de possibilitar a análise de moléculas polares, passíveis de sofrerem ionização, e também permitir o estabelecimento da massa dos compostos, uma vez que é uma técnica branda de ionização (Crotti, Lopes & Lopes, 2005, Ernst *et al.*, 2014). A ionização em IES ocorre à pressão

atmosférica, no qual um campo elétrico intenso dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de um fino spray de gotas carregadas que, por evaporação, resultam em íons na fase gasosa (Crotti, Lopes & Lopes, 2005). A ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Brønsted-Lowry, ou seja, pela protonação ou desprotonação das moléculas (Ernst *et al.*, 2014).

Os principais íons formados em IES são íons protonados/desprotonados ($([M+H]^+/[M-H]^-)$), cationizados ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) e anionizados ($[M+Cl]^-$) (Vessecchi *et al.*, 2008). Por ser um método brando de ionização, pouca energia residual é retida pelo analito em IES, sendo assim, limitada fragmentação ocorre já que as moléculas recebem pouca energia diretamente, o que de certa forma, é uma desvantagem da IES para estudos de elucidção estrutural. Assim, para contornar essa desvantagem foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM ou EMⁿ) nos quais íons ativados podem ser ativados por um processo colisional e serem fragmentadas na célula de colisão gerando íons que permitem a identificação das substâncias (Demarque *et al.*, 2016).

Nas análises de EM/EM, um íon do primeiro estágio (íon precursor) é selecionado e transferido para uma célula de colisão, onde utilizando um gás inerte, usualmente Ar, N₂, He ou CO₂, a dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*) produz a fragmentação do íon precursor. Dessa forma, são gerados íons produtos ou de segunda geração, que proporcionam muita informação estrutural sobre o íon precursor. Assim a identificação de compostos, combinando dados de massas moleculares exatas com os espectros de íons produto, torna-se possível (Vessecchi *et al.*, 2008). Isto se aplica especialmente para séries homólogas de compostos cuja relação estrutura-fragmentação já foi previamente estudada e descrita, como é o caso de ácidos clorogênicos e alguns flavonoides, alcaloides e lactonas sesquiterpênicas (Demarque *et al.*, 2016).

Assim, as principais vantagens da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é que esta técnica permite a identificação de compostos com alto grau de confiança e também por poder identificar analitos que fazem parte de uma mistura complexa sem a necessidade de isolamento (Vessecchi *et al.*, 2016). Essas técnicas hífenadas são muito aplicadas em estudos de produtos naturais, podendo fornecer informações tanto quantitativas quanto qualitativas. Além disso, convém destacar que é uma das principais técnicas aplicadas em metabolômica (Santos *et al.*, 2017, Ernst *et al.*, 2014).

1.3. Biofilme

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana sésil, caracterizada pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, com resultante produção de substâncias poliméricas extracelulares, estabelecendo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes produz alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser caracterizadas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos em ambientes com condições adversas (Costerton *et al.*, Stewart e Greenberg, 1999).

As bactérias formam biofilme em várias superfícies como, por exemplo, em sistemas aquáticos naturais expostos, no interior de tubos de água, tubos de troca de calor, em tecidos vivos, superfície de dentes, no interior de dispositivos médicos e implantes. A formação de biofilme em dispositivos médicos e implantes assim como cateteres, válvulas mecânicas cardíacas, marca-passo cardíaco, articulações protéticas e lentes de contato representam um crítico problema em saúde pública. Isto porque essas bactérias em biofilmes possuem menor sensibilidade aos antibióticos, gerando menor eficiência dos tratamentos terapêuticos e o desenvolvimento de infecções persistentes, refletindo em aumentos no tempo de internação de pacientes e custos (Rochford *et al.*, 2012, Fletcher *et al.*, 2014).

Inúmeros microrganismos são capazes de participar do processo de adesão e formação de biofilmes, como bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) (Nordmann e Cornaglia, 2012). Os biofilmes bacterianos contêm uma população homogênea ou heterogênea de bactérias que permanecem na matriz constituída por substâncias poliméricas extracelulares secretadas por componentes da população do biofilme (Satpathy *et al.*, 2016). Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem fluxo de líquido e gases, dispersão de nutrientes e descarte de componentes (McLandsborough *et al.*, 2006).

A primeira etapa envolvida na formação do biofilme é a adesão dos colonizadores primários, controlada por interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionador, produzido a partir de resíduos do próprio ambiente. As propriedades da superfície da célula, como presença de flagelo,

fímbrias, pílí, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula influenciam na aderência à superfície, que ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (**Figura 6**) (Prakash *et al.*, 2003).

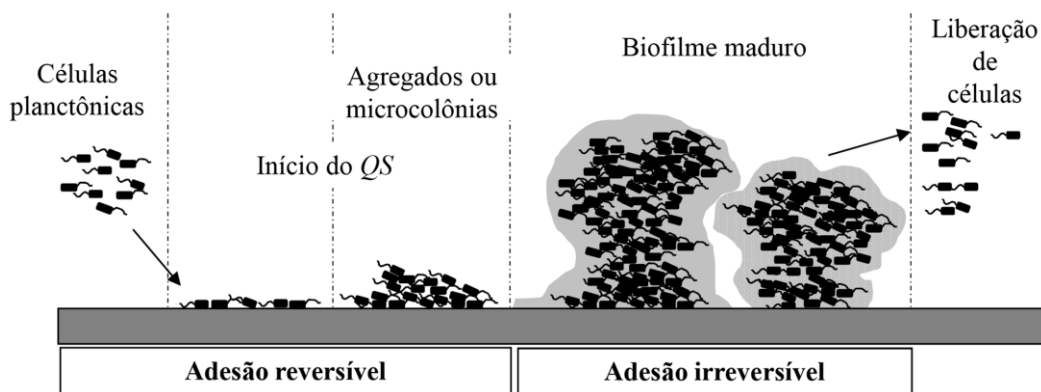


Figura 6. Mecanismo de formação dos biofilmes: da adesão à superfície a liberação e dispersão. Fonte: Trentin *et al.*, 2013).

Após a instalação microbiana com a superfície ocorrem fases de crescimento e divisão celular. As proteínas de adesinas, flagelo e pílí funcionam como apêndices que fortalecem as ligações entre as células e a superfície. A migração de células ou agregados celulares para colonização, assim como o desenvolvimento primário e a maturação, são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica, controlados por moléculas sinalizadoras, processo denominado *quorum sensing* (Chopp *et al.*, 2002). Dentro de dias a meses as bactérias presentes no biofilme se multiplicam, construindo microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares, onde pode ocorrer a adesão de outros microrganismos presentes no meio, intitulados de colonizadores secundários (Trachoo, 2003).

Com a superpopulação microbiana no interior do biofilme, o ambiente se torna anaeróbio, promovendo o aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis que debilitam a estrutura, causando o desprendimento de células únicas ou de fragmentos. Posteriormente, a camada microbiana mais externa da estrutura inicia a produção de células bacterianas planctônicas. Para sobrevivência bacteriana a estratégia é a transferência celular do biofilme maduro para uma superfície ainda não colonizada, em que esses microrganismos dispersos formarão novos biofilmes configurando um novo ciclo de contaminações (Sauer *et al.*, 2002).

Os biofilmes podem ser resistentes a mudanças ambientais drásticas, a antibióticos e desinfetantes, e conseqüentemente são extremamente difíceis de erradicar (Hoiby *et al.*, 2010).

Assim, intensos esforços têm sido investidos para a descoberta de novos compostos que atuem contra a instalação e manutenção do biofilme. Em seu estilo de vida planctônico, os microrganismos recebem um estímulo que os levam a aderir em alguma superfície. Entretanto, este processo ainda não esteja totalmente esclarecido, alguns fatores capazes de influenciá-lo são caracterizados como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura (Oulahal *et al.*, 2008).

Para a prevenção da adesão celular bacteriana a superfícies abióticas, incluindo revestimento de dispositivos biomédicos, é feito o uso profilático de antibióticos e biocidas como imersão do dispositivo em solução antibiótica, irrigação do sítio cirúrgico com antibiótico e terapia de bloqueio com antibiótico utilizada em cateteres, alguns dos antibióticos utilizados são vancomicina e gentamicina, que podem reduzir a incidência de infecções associadas a biofilmes em dispositivos implantáveis (Lynch e Robertson, 2008).

No intuito de impedir a adesão celular bacteriana a um substrato biótico, são utilizados compostos pilicidas e os compostos quelantes de ferro. Os pilicidas, como as 2-piridonas bicíclicas, são capazes de inibir a biossíntese de pili, uma das estruturas bacterianas responsáveis pela adesão de certas bactérias às células humanas, (Macedo e Abraham, 2009). Dessa maneira esses compostos são aptos a evitar a adesão de *Escherichia coli* às células da bexiga (Pinkner *et al.*, 2006; Aberg *et al.*, 2008) e do *Vibrio cholerae* às células intestinais (Hung *et al.*, 2005).

As substâncias naturais tornaram-se uma promessa para estratégias contra bactérias multirresistentes, o emprego de pesquisas inovadoras pode superar obstáculos associados as infecções humanas em que 80% delas envolvem biofilmes e são um problema de saúde pública (Joo e Otto, 2012). Inúmeros produtos naturais são testados contra doenças há anos, entretanto em diversos estudos pode-se observar uma tendência para a pesquisa da atividade antibiofilme de produtos naturais. Por exemplo, Lee e colaboradores (2014) que testaram o resveratrol (polifenol encontrado em uvas, vinho tinto e amendoins) e seu dímero ϵ -viniferin contra cepas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, sendo observada uma inibição de 98% o crescimento planctônico.

O flavonoide baicaleina, isolado da *Scutellaria baicallensis*, inibiu o sistema *quorum sensing* na formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, apresentando 4,3 UFC/mL na

concentração de 64 µg/mL. Já na associação de baicaleína (32 µg/mL) e vancomicina (4 µg/mL) foram observadas apenas 7,3 UFC/mL (Chen *et al.*, 2016). Similarmente Luo e colaboradores (2016) avaliaram a baicaleína contra biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo confirmada uma redução da biomassa de até 53% na concentração de 128 µg/mL.

Embora os extratos de inúmeras variedades de própolis e suas substâncias isoladas sejam testadas frente a diversas bactérias, em análise da literatura a PMB ainda não foi investigada contra biofilmes de *Staphylococcus aureus*, em vista disso neste estudo iremos explorar as interações entre os principais compostos bioativos de amostras de PMB e *S. aureus*.

1.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas pode provocar infecções na pele, osteomielites, meningite, endocardite, pneumonia, abscessos, entre outras (Babu *et al.*, 2014).

A alteração no comportamento do *S. aureus* de comensal a patogênico reflete a sua necessidade de se adequar a alterações do ambiente, e de escapar do sistema imune do hospedeiro. Quando fagocitados por neutrófilos, seu perfil de expressão gênica é alterado, favorecendo genes relacionados à virulência e permitindo, a conversão de comensalismo para virulência (Feng *et al.*, 2008).

O tratamento contra *S. aureus* tem sido de grande preocupação para a clínica médica, pois além de se tratar de um microrganismo com largo potencial de virulência as opções de antimicrobianos estão sendo reduzidas a partir do surgimento da resistência à penicilina, à meticiclina e a vancomicina (Mahmoudi *et al.*, 2015).

Na década de 60, a inserção das penicilinas resistentes a penicilinases, como a meticiclina, proporcionou o avanço no tratamento de infecções causadas pelo *S. aureus*. No entanto, essa melhora foi acompanhada pelo surgimento de cepas resistentes, denominadas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticiclina (MRSA), cujo padrão de resistência muitas vezes se estende a outros antibióticos do tipo β-lactâmicos. Nos anos 90, foram descobertas cepas de *S. aureus* resistentes aos glicopeptídeos como, por exemplo, a vancomicina (Mimica & Mendes, 2007).

São descritos três mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em *S. aureus*: superprodução de β -lactamases, presença de proteína PBP2a (*protein binding penicilin 2a*) alterada, e modificações na capacidade de ligação das PBPs. Os autores tem sugerido que esses três mecanismos podem co-existir em uma mesma cepa (Reddy *et al.*, 2004).

As infecções causadas por cepas resistentes de *S. aureus* elevam o tempo de estadia nos hospitais, oneram o sistema de saúde e aumentam as taxas de mortalidade. Além disso, a presença de MRSA em uma instituição está claramente relacionada com um número aumentado de bacteremias que prolongam o tempo de permanência no hospital, quando comparado com bacteremias provocadas por *S. aureus* resistente à meticilina (Wooten & Winston, 2013)

Por fim, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* são limitadas, sendo imprescindível a necessidade de investimento na pesquisa científica para o desenvolvimento de inovações tecnológicas visando a descoberta e/ou síntese de novos e mais eficazes fármacos antibióticos para combater esses agentes infecciosos multirresistentes que são um problema de saúde pública.

1.4. *Trichomonas vaginalis*

O protozoário *Trichomonas vaginalis* causa a tricomoníase que é a segunda infecção não viral mais comum em humanos transmitida sexualmente (Ravaee *et al.*, 2015). A tricomoníase infecta aproximadamente 276 milhões de pessoas anualmente (WHO, 2012). Este protozoário possui morfologia elipsóide, piriforme ou oval em preparações fixadas e coradas. Não possuem a forma cística, somente a trofozoítica, que é simultaneamente infecciosa e ativa. Morfologicamente o *T. vaginalis* possui quatro flagelos anteriores, de tamanhos distintos, um flagelo recorrente que se adere ao corpo pela parte posterior. Possui uma estrutura interna rígida e hialina chamada axóstilo, formada por microtúbulos. É um organismo anaeróbio facultativo, se desenvolve na faixa de pH 5,0 a 7,5 e em temperaturas entre 20°C e 40°C. O flagelo utiliza glicose, maltose e galactose como fonte de energia (Maciel *et al.*, 2004).

A transmissão ocorre, principalmente, por via sexual, entretanto por ser resistente ao meio externo, conserva sua infecciosidade em gotículas de secreção vaginal depositadas em fômites como artigos de toalete e assentos de privada (Afzan & Suresh, 2012; Pessoa & Martins, 1982).

A presença do parasita na vagina está associada a um corrimento de aspecto cremoso, ácido e de cor amarelo esverdeado, caracterizando uma leucorréia persistente. Os sinais e sintomas da tricomoníase vão depender das condições individuais, da agressividade e do número de parasitas (Maciel *et al.*, 2004). Foi constatado que há um aumento da incidência de *T. vaginalis* no período do ciclo após a menstruação. Este fato é possivelmente causado pela capacidade de fagocitar hemácias a fim de adquirir ferro da hemoglobina, que constitui um componente essencial ao metabolismo do parasita (Menezes *et al.*, 2016)

As manifestações clínicas de *T. vaginalis* são irritação e secreção vaginal com mau cheiro, disúria, dor abdominal, uretrites, cervicite e infertilidade, além de parto prematuro e baixo peso do recém-nascido (Fichorova, 2009; Quintas-Granados *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015). Em homens, esta infecção é mais de 70% dos casos assintomática, sendo que os sintomas, quando manifestados, são secreção uretral e disúria (Kung *et al.*, 2016).

Em estudo feito na cidade de Porto Alegre, Sul do Brasil, no período entre 2011 e 2012, foram coletadas amostras de urina de 530 pacientes, dentre estas 30 foram positivas para infecção por *T. vaginalis* (24 mulheres e 6 homens). Das 30 amostras infectadas, 26 foram sensíveis a metronidazol, porém 4 eram cepas resistentes (Becker *et al.*, 2015). Ao avaliar a prevalência de importantes infecções sexualmente transmissíveis, Souza e colaboradores (2013) coletaram amostras de 556 mulheres de Maringá (PR) e separam em dois grupos; grupo HIV positivo com 178 pacientes, onde foram detectadas *T. vaginalis* em 20 amostras; e grupo controle HIV negativo com 378 pacientes que entres estes 49 amostras estavam infectadas. É importante destacar que esta infecção ocorre mundialmente, havendo um aumento na suscetibilidade a infecção por pacientes portadores de HIV e, além disso, essas infecções por *T. vaginalis* aumentam o risco de câncer cervical e de próstata (WHO, 2012).

Atualmente, o tratamento da infecção por *T. vaginalis* é realizado com os nitroimidazólicos metronidazol e tinidazol (Ravaee *et al.*, 2015). Porém, os casos de resistência a esses medicamentos tem sido comumentemente descritos (Kirkcaldy *et al.*, 2012, Muzny & Schwebke, 2013), o que ressalta a necessidade de novos medicamentos para tratar a tricomoníase. Neste contexto, uma alternativa para essa busca de novos protótipos são os produtos naturais, já que mais de 40% dos fármacos antiparasitários aprovados entre 1981 e 2014 são produtos naturais ou derivados, e assim comprovam sua importância nesses desenvolvimentos (Newman & Cragg, 2016). Além disso, um creme vaginal contendo a mistura de extratos das plantas *Azadirachta indica*, *Sapindus mukerossi* (saponinas) e *Mentha citrate*

(óleo essencial) está em fase II de triagem clínica. Esta formulação demonstrou 77% e 100% de inibição de *C. albicans* e *T. vaginalis*, respectivamente (Sharma *et al.*, 2009), o que também destaca a participação dos produtos naturais na busca por novos recursos terapêuticos para tratar a tricomoníase.

Assim, nosso estudo também focou em explorar a atividade da própolis marrom brasileira (PMB) contra *T. vaginalis*, pois esta ainda não foi estudada. Somente há descrito na literatura a atividade de um extrato de própolis cubana contra *T. vaginalis* (Fidalgo *et al.*, 2011), logo esses relatos estimularam nossos estudos com PMB.

2. OBJETIVOS

2.3. Objetivo geral

Analisar os perfis químicos e atividades biológicas (antibiofilme e antitricomonas) de amostras de própolis marrons brasileiras provenientes de localidades diferentes e compreender as correlações entre suas composições químicas com as propriedades biológicas através de ferramentas metabolômicas.

2.4. Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia reprodutível e eficiente para a obtenção de extratos de própolis e frações provenientes dos extratos;
- Analisar e desreplicar os extratos de própolis a partir de CLAE-DAD-EM;
- Avaliar as atividades biológicas dos extratos e frações de própolis em testes antibiofilme frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e antiparasitária contra *Trichomonas vaginalis*.
- Aplicar a metabolômica e análises estatísticas para dos dados obtidos dos extratos e frações e determinar os compostos bioativos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberg, V., Das, P., Chorell, E., Hedenstrom, M., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J., Almqvist, F. Carboxylic acid isosteres improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in *E. coli*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 18, 3536-3540, 2008.
- Afzan, M.Y., Suresh, K. Phenotypic (variant) forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from Cervical Neoplasia patients. **Experimental Parasitology** 131, 267-273, 2012.
- Alday-Provencio, S., Diaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernandez, J., Velazquez, C. Sonoran Propolis and some of its chemical constituents inhibit growth of trophozoites. **Planta Medica** 81, 742-747, 2015.
- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 278-283, 2007.
- Almeida, E.B., Cardoso, J.C., Lima, A.K., Oliveira, N.L., Pontes-Filho, N.T., Lima, S.O., Souza, I.C.L., Albuquerque-Júnior, R.L.C. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology** 147, 419-425, 2013.
- Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 16, 181-189, 2008.
- Babatunde, I.R., Abdulbasit, A., Oladayo, M.I., Olasile, O.I., Olamide, F.R., Gbolahan, B.W. Hepatoprotective and pancreatoprotective properties of the ethanolic extract of Nigerian propolis. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology** 4, 102-108, 2015.
- Babu, N.R., Shree, G.B., Rekha, L., Karthiga, P. Molecular analysis of coagulase (*coa*) gene polymorphism in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology** 3, 8163-8168, 2014.

- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology** 100, 114-117, 2005.
- Bankova, V., Marcucci, M.C. Standardization of propolis: present status and perspectives. **Bee World** 81, 182-188, 2000.
- Bankova V., Boudorova-Krasteva G., Sforcin J., Frete X., Kujumjiev A., Maimoni-Rodella R., Popov S. Phytochemical Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Z. Naturforsch.** 54, 401-405, 1999.
- Barros, M.P., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Andrade, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 110, 567-571, 2007.
- Bastos, E.M.A.F., Santana, R.A., Calaça-Costa, A.G.F., Thiago, P.S. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Brazilian Journal of Biology** 71, 727-734, 2011.
- Bastos, E.M.A.F., Galbiati, C., Loureiro, E.M., Scoaris, D.O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 63, 1255-1259, 2011a.
- Batista, L.L.V., Mella, E.A.C., Assis, M.L.B., Barbosa, A.P.F., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões** 39, 515-520, 2012.
- Becker, D.L., Santos, O., Frasson, A.P., Rigo, G.V., Macedo, A.J., Tasca, T. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in south Brazil. **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases** 15, 2015
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.005>.
- Benhanifia, M., Mohamed, W.M. Phenolics constituents of different types of propolis and their antimicrobial activities. **Anti-Infective Agents** 13, 17-27, 2015.
- Bezerra, K.K.S., Farias, M.C.A.D., Maracajá, P.B., Araújo, A.S., Silva, R.A., Filho, A.F., Bezerra, A.M.F., Belchior, A.C.S., Silva, F.A., Gadelha, C.S., Bezerra, W.K.T.,

Cavalcante, J.C.B. Vaginal yeasts and the antifungal action of red propolis extract. **International Archives of Medicine** 8, 2015 doi: 10.3823/1753

Bittencourt, M.L.F., Ribeiro, P.R., Franco, R.L.P., Hilhorst, H.W.M., Castro, R.D., Fernandez, L.G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International** 76, 449-457, 2015.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**. Instrução Normativa. MAPA. 2001.

Brasil, Resolução - RDC n° 24 de 14 de Junho de 2011. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. ANVISA, 2011.

Brasil, Resolução - RDC n° 97 de 01 de Agosto de 2016. Altera a Resolução - RDC n° 24, de 14/06/2011 (Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos). ANVISA, 2016.

Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V.J., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 61, 4546-4550, 2013a.

Bueno-Silva, B., Franchin, M., Alves, C.F., Denny, C., Colón, D.F., Cunha, T.M., Alencar, S.M., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine** 23, 1583-1590, 2016a.

Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Suguimoto, E.S., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., Mayer, M.P. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **Plos One** 10, 0144954, 2015.

Bueno-Silva, B., Koo, H., Falsetta, M.L., Alencar, S.M., Ikegaki, M., Rosalen, P.L. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling** 29, 1233-1242, 2013.

- Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Rosalen, P.L. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research** 4, 1-7, 2016b.
- Burdock, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chemical Toxicology** 36, 347-363, 1998.
- Capistrano, H.M., Assis, E. M., Leal, R.M., Alvarez-Leite, M.E., Brener, S., Bastos, E.M.A.F. Brazilian Green Propolis Compared to Miconazole Gel in the Treatment of Candida-Associated Denture Stomatitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2013, 1-6, 2013.
- Cardoso, J.G., Iorio, N.L.P., Rodrigues, L.F., Couri, M.L.B., Farah, A., Maia, L.C., Antonio, A.G. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. **Archives of Oral Biology** 65, 77-81, 2016.
- Castro, M.L., Vilela, W.R., Zauli, R.C., Ikegaki, M., Rehder, V.L., Foglio, M.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **Complementary and Alternative Medicine** 9, 25, 2009.
- Cavendish, R.L., de Souza Santos, J., Belo Neto, R., Oliveira Paixão, A., Valéria Oliveira, J., Divino de Araujo, E., Berretta, E., Silva, A.A., Maria Thomazzi, S., Cordeiro Cardoso, J., Zanardo Gomes, M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 173, 127-33, 2015.
- Chen, L. Wang, X., Liu, Y., Di, X. Dual-target screening of bioactive components from traditional Chinese medicines by hollow fiber-based ligand fishing combined with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2017.06.001>, 2017.
- Chen, Y., Liu, T., Wang, K., Hou, C., Cai, S., Huang, Y., Du, Z., Huang, H., Kong, J., Chen, Y. Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the *quorum sensing* system *in vitro*. **Plos One** 11, doi:10.1371/journal.pone.0153468, 2016.

- Cheung, K.W., Sze, D.M.Y., Chan, W.K., Deng, R.X., Tu, W., Chan, G.C.F. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. **Journal of Ethnopharmacology** 138, 463-471, 2011.
- Chopp, D.L., Kirisits, M.J., Moran, B., Parsek, M.R. A mathematical model of *quorum sensing* in a growing bacterial biofilm. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**. 29, 339-346, 2002.
- Coelho, L.G.V., Bastos, E.M.A.F., Resende, C.C., Silva, C.M.P., Sanches, B.S.F., Castro, F.J., Moretzsohn, L.D., Vieira, W.L.S., Trindade, O.R. Brazilian Green Propolis on *Helicobacter pylori* Infection. A Pilot Clinical Study. **Helicobacter** 12, 572-574, 2007.
- Conti, B.J., Santiago, K.B., Búfalo, M.C., Herrera, Y.F., Alday, E., Velazquez, C., Hernandez, J., Sforcin, J.M. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 67, 1431-1438, 2015.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284, 1318-1322, 1999.
- Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S., Zeoulae, L.M., Visentainer, J.V: Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of Brazilian Chemical Society** 22, 927-933, 2011.
- Crotti, A.E.M., Lopes, J.L.C., Lopes, N.P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry** 40, 1030-1034, 2005.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B.A., Ramirez-Apan, T., Cardenas, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. **Zeitschrift fur Naturforschung C** 57, 372-378, 2002.
- Daugusch, A., Moraes, C.S., Fort, P., Yong, K. Park Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 5, 435-441, 2008.

- Davey, M. E.; O'Toole, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64, 847-867, 2000.
- De Groot, A.C. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. **Dermatitis** 24, 263-282, 2013.
- Demarque, D.P., Crotti, A.E.M., Vessecchi, R., Lopes, J.L.C., Lopes, N.P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports** 33, 367-524, 2016.
- Dornelas, C.A., Fechine-Jamacaru, F.V., Albuquerque, I.L., Magalhães, H.I., Dias, T.A., Faria, M.H., Alves, M.K., Rabenhorst, S.H., de Almeida P.R., Lemos, T.L., Castro, J.D., Moraes, M.E., Moraes, M.O. Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** 27, 529-536, 2012.
- Dos Santos Thomazelli, A.P., Tomiotto-Pellissier, F., da Silva, S.S., Panis, C., Orsini, T.M., Cataneo, A.H., Miranda-Sapla, M.M., Custódio, L.A., Tatakihara, V.L., Bordignon, J., Silveira, G.F., Sforcin, J.M., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I. Brazilian propolis promotes immunomodulation on human cells from American Tegumentar Leishmaniasis patients and healthy donors infected with *L. braziliensis*. **Cellular Immunology** 8749, 30114-30119, 2016.
- Eom, T., Cho, H., Kim, J., Park, M., An, J., Kim, M., Kim, S., Han, S.B. Multiclass mycotoxin analysis in edible oils using a simple solvent extraction method and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A** 14, 1-12, 2017. Doi: 10.1080/19440049.2017.1363416.
- Ernst, M., Silva, D.B., Silva, R.R., Vêncio, R.Z.N., Lopes, N.P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Products Report** 31, 784-806, 2014.
- Espinosa, R.R., Inchingolo, R., Alencar, S.M., Rodriguez-Estrada, M.T., Castro, I.A. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters, **Food Chemistry** 182, 95-104, 2015.

- Evans, L. Crise econômica faz crescer o uso da própolis verde. Disponível em: http://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2016/03/14/interna_agropecuario,743149/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolis-verde.shtml. Acesso em : 02/10/2016.
- Fabris, S., Bertelle, M., Astafyeva, O., Gregoris, E., Zangrando, R., Gambaro, A., Lima, G.P.P., Stevanato, R. Antioxidant Properties and Chemical Composition Relationship of Europeans and Brazilians Propolis. **Pharmacology & Pharmacy** 4, 46-51, 2013.
- Feng, Y., Chen, C.J., Su, L.H., Hu, S., Yu, H., Chiu, C.H. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews** 32, 23-37, 2008.
- Fernandes-Silva, C.C., Salatino, A., Salatino, M.L.F., Breyer, E.D.H., Negri, G. Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. **Química Nova** 36, 237-240, 2013.
- Fernandes, F.H., Guterres, Z.R., Garcez, W.S., Lopes, S.M., Corsino, J., Garcez, F.R. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International** 62, 20-26, 2014.
- Fernandes, F.H., Guterres, Z.R., Violante, I.M.P., Lopes, T.F.S., Garcez, W.S., Garcez, F.R. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. **Toxicology Reports** 2, 1482-1488, 2015.
- Fichorova, R.N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune response and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology** 83, 185-189, 2009.
- Fidalgo, L.M., Ramos, I.S., Parra, M.G., Cuesta-Rubio, O., Hernandez, I.M., Fernandez, M.C., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L. Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. **Natural Product Communications** 6, 973-976, 2011.
- Fischer, G., Conceição, F.R., Leite, F.P.L., Dummer, L.A., Vargas, G.D., Hübner, S.O., Dellagostin, O.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vidor, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine** 26, 1250-1256, 2007.

- Fletcher, M.H., Jennings, M.C., Wuest, W.M. Draining the moat: disrupting bacterial biofilms with natural products. **Tetrahedron** 70, 6373-6383, 2014.
- Fonseca, Y.M., Marquele-Oliveira, F., Vicentini, F.T.M.C., Furtado, N.A.J.C., Sousa, J.P.B., Lucisano-Valim, Y.M., Fonseca, M.J.V. Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2011, Article ID 863917, 1-8. Doi:10.1155/2011/863917
- Franchi Jr., G.C., Moraes, C.S., Toreti, V.C., Dausch, A., Nowill, A.E., Park, Y.K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian Propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Acta Cirúrgica Brasileira** 2012, 918956, 2012a.
- Franchin, M. , Da Cunha, M.G. , Denny, C. , Napimoga, M.H. , Cunha, T.M. , Koo, H. , De Alencar, S.M. , Ikegaki, M. , Rosalen, P.L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology** 143, 709-715, 2012.
- Franchin, M., Colón, D.F., da Cunha, M.G., Castanheira, F.V., Saraiva, A.L., Bueno-Silva, B, Alencar, S.M., Cunha, T.M., Rosalen, P.L. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports** 6, 36401, 2016.
- Freires, I.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry** 110, 267-79, 2016.
- Frión-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., Sforcina, J.M. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 67, 1448-1456, 2015.
- Frozza, C.O.S., Garcia, C.S., Gambato, G., de Souza, M.D., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Roeschely, M. Chemical characterization, antioxidante and cytotoxic activities of brazilian red propolis. **Food Chemical Toxicology** 52, 137-142, 2013.

- Frozza, C.O.S., Ribeiro, T.S., Gambato, G., Menti, C., Moura, S., Pinto, P.M., Staats, C.C., Padilha, F.F., Beghini, K.R., Leon, P.M.M., Borsuk, S., Savegnago, L., Dellagostin, O., Collares, T., Seixas, F.K., Henriques, J.A.P., Roesch-Ely, M. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food Chemical Toxicology** 63, 195-204, 2014.
- Fukuda, M., Ohkoshi, E., Makino, M., Fujimoto, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 54, 1465-1468, 2006.
- Funari, C. S., Ferro, V. O., Mathor, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology** 111, 206–212, 2007.
- Funari, C.S., Carneiro, R.L., Creese, M.E., Leme, G.M., Cavalheiro, A.J., Hilder, E.F. On Track for a Truly Green Propolis—Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering** 2016.
- Gao, W., Wu, J., Wei, J., Pu, L., Guo, C., Yang, J., Yang, M, Luo, H. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition** 55, 7-10, 2014.
- Grenho, L., Barros, J., Ferreira, C., Santos, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, M.E. Cortes, *In vitro* antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite, **Biomedical Materials** 10, 025004, 2015.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents** 35, 322-332, 2010.
- Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.K., Hu, F.L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules** 19, 19610-19632, 2014.
- Hung, D.T., Shakhnovich, E.A., Pierson, E., Mekalanos, J.J. Small-Molecule inhibitors of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. **Science** 310, 670-674, 2005.

- Ibekwe, N.N., Ameh, S.J. Hyphenated techniques in liquid chromatography as current trends in natural products analysis. **International Research Journal of Pure & Applied Chemistry** 7, 132-149, 2015.
- Iio, A., Ohguchia, K., Maruyama, H., Tazawa, S., Arakic, Y., Ichihara, K., Nozawa, Y., Ito, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine** 19, 383-388, 2012.
- Joo, H., Otto, M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology** 19, 1503-1513, 2012.
- Josesh, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. Biofilme formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology** 64, 367-372, 2001.
- Kamiya, T., Nishihara, H., Hara, H., Adachi, T. Ethanol extract of Brazilian Red Propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 60, 11065-11070, 2012.
- Kimoto, T., Koya-Miyata, S., Hino, K., Micallef, M.J., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. **Virchows Archiv** 438, 259-270, 2001.
- Kirkcaldy, R.D., Augostini, P., Asbel, L.E., Bernstein, K.Y., Kerani, R.P., Mettenbrink, C.J., Pathela, P., Schwebke, J.R., Secor, W.E., Workowski, K.A., Davis, D., Braxton, J., Weinstock, H.S. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in 6 US cities, STD Surveillance Network, 2009-2010 **Emerging Infectious Diseases** 18, 939-43, 2012.
- Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C.H., Tunca, Y.M., Baysallar, M., Guclu, A.U., Akca, E., Ozkok Tuylu, A., Sorkun, K., Tanyuksel, M., Salih, B. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe** 13, 140-145, 2007.
- Kumar, K., Lui, N., Yang, D., Na, D., Thompson, J., Wrischnik, L.A., Land, K.M., Kumar, V. Synthesis and antiprotozoal activity of mono- and bis-uracil isatin conjugates against the

- human pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 23, 5190-5197, 2015.
- Kung, E., Pietrzak, J., Claus, C., Walochnik, J. In vitro effect of octenidine dihydrochloride against *Trichomonas vaginalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents** 47, 232-234, 2016.
- Lee, J., Kim, Y., Ryu, S.Y., Cho, M.H., Lee, J. Resveratrol oligomers inhibit biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products** 77, 168-172, 2014.
- Leitão, D.P.S., Filho, A.A.S., Polizello, A.C.M., Bastos, J.K., Spadaro, A.C.C. Comparative Evaluation of in-Vitro Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 27, 1834-1839, 2004.
- Lemos, P.A.P., García-Zapata, M.T.A. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in HIV - positive and negative patients in referral hospitals in Goiania, Goiás, Brazil. **International Journal of Tropical Medicine** 5, 24-2, 2010.
- Lessa, P.R.A., Ribeiro, S.G., Lima, D.J.M., Nicolau, A.I.O., Damasceno, A.K.C., Pinheiro, A.K.B. Presença de lesões intraepiteliais de alto grau entre mulheres privadas de liberdade: Estudo documental. **Revista Latino Americana de Enfermagem** 20, 1-9, 2012.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 16, 5434–5440, 2008.
- Lopez, B.G.C., Schmidt, E.M., Eberlin, M.N., Sawaya, A.C.H.F. Phytochemical markers of different types of red propolis, **Food Chemistry** 146, 174-180, 2014.
- Lotti, C., Castro, G.M.M., Sa, L.F.R., Silva, B.A.F.S., Tassis, A.C., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., Ferreira-Pereira, A. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Brazilian Journal Pharmacognosy** 21, 901-907, 2011.

- Luis-Villaroya, A., Espina, L., García-Gonzalo, D., Bayarri, S., Pérez, C., Pagán, R. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. **International Journal of Food Microbiology** 205, 90-97, 2015.
- Luo, C., Zou, X., Li, Y., Sun, C., Jiang, Y., Wu, Z. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reserved phase high performance liquid chromatography with diode array detection. **Food Chemistry** 127, 314-320, 2011.
- Luo, J., Kong, J., Dong, B., Huang, H., Wang, K., Wu, L., Hou, C., Liang, Y., Li, B., Chen, Y. Baicalein attenuates the quorum sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and relieves the inflammatory response in *P. aeruginosa*-infected macrophages by downregulating the MAPK and NFκB signal-transduction pathways. **Drug Design, Development and Therapy** 10, 183-203, 2016.
- Lustosa, S.R., Galindo, A.B., Nunes, L.C.C., Randau, K.P., Rolim Neto, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18, 447-454, 2008.
- Lynch, A.S., Robertson, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine** 59, 415-428, 2008.
- Macedo, A.J., Abraham, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry** 5, 517-528, 2009.
- Machado, B.A., Silva, R.P., Barreto Gde, A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandão, H.N., Rocha, J.L., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Umsza-Guez, M.A., Padilha, F.F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One** 11, e0145954, 2016a. doi: 10.1371/journal.pone.0145954.
- Machado, C.S., Mokochinski, J.B., Lira, T.O., Oliveira, F.C.E., Cardoso, M.V., Ferreira, R.G., Sawaya, A.C.H.F., Ferreira, A.G., Pessoa, C., Cuesta-Rubio, O., Monteiro, M.C., Campos, M.S., Torres, Y.R. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-Based**

Complementary and Alternative Medicine 2016, Article ID 6057650, 11 pages, 2016b.
doi 10.1155/2016/6057650

Machado, J.L., Assunção, A.K.M., Silva, M.C.P., Reis, A.S., Costa, G.C., Arruda, D.S., Rocha, B.A., Vaz, M.M.O.L.L., Paes, A.M.A., Guerra, R.M.N., Berretta, A.A., Nascimento, R.F.R. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2012, 157652, 2012.

Maciel, G.P., Tasca, T., De Carli, G.A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial** 40, 152-160, 2004.

Mahmoudi, H., Arabestani, M.R., Mousavi, S.F., Ghafel, S., Alikhani, M.Y. Study of polymorphism *spa* gene (encoding protein A) of *Staphylococcus aureus* in clinical isolates and nasal carries. **Tehran University Medical Sciences** 73, 24-30, 2015.

Marcucci, M.C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Química Nova** 19, 529-336, 1996.

Marcucci, M.C., Ferreres, F., Viguera, C. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology** 74, 105-112, 2001.

Martin, L.F.T., Rocha, E.M., Garcia, S.B., Paula, J.S. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **Complementary and Alternative Medicine** 13, 337, 2013.

Matsuda, A.H., Almeida-Muradian, L.B.D. Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis. **Phytochemical Analysis** 19, 179-183, 2008.

Mayworm, M.A.S., Lima, C.A., Tomba, A.C.B., Fernandes-Silva, C.C., Salatino, M.L.F., Salatino, A. Does Propolis Contain Tannins? **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2014, 613647, 2014.

McLandsborough, L., Rodriguez, A., Pérez-Conesa, D., Weiss, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics** 1, 94-114, 2006.

- Mello, B.C.B.S.; Petrus, J.C.C.; Hubinger, M.D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering** 96, 533-539, 2010.
- Mendonça, I.C.G., Porto, I.C.C.M., Nascimento, T.G., Souza, N.S., Oliveira, J.M.S., Arruda, R.E.S., Mousinho, K.C., Santos, A.F., Basílio-Júnior, I.D., Parolia, A., Barreto, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 15, 357, 2015.
- Menezes, C.B., Frasson, A.P., Meirelles, L.C., Tasca, T. Adenosine, but not guanosine, protects vaginal epithelial cells from *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. **Microbes and Infection** 16, 30170-30178, 2016.
- Mimica, M.J., Mendes, C.M.F. Dagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 43, 399-406, 2007.
- Miyata, S., Oda, Y., Matsuo, C., Kumura, H., Kobayashi, K. Stimulatory effect of Brazilian propolis on hair growth through proliferation of keratinocytes in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62, 11854-11861, 2014.
- Moraes, C.S., Dausch, A., Li, H., Rhim, J.S., Park, Y.K. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Food Science and Technology** 30, 539-543, 2010.
- Morawiec, T., Mertas, A., Wojtyczka, R.D., Niedzielska, I., Dzedzic, A., BubiBek-Bogacz, A., Sender, J., Wróbel, J., Tanasiewicz, M., Bowski, P.W., Król, W. The Assessment of oral microflora exposed to 3% ethanolic extract of brazilian green propolis preparation used for hygiene maintenance following minor oral surgeries. **BioMed Research International** 2015, 1-10, 2015.
- Muzny, C.A., Schwebke, J.R. The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. **Sexually Transmitted Infectious** 89, 423-425, 2013.
- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H. Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis and its Main Constituents against Oxygen-glucose Deprivation Stress, with a Gene-expression Analysis. **Phytotherapy Research** 23, 1431-1438, 2009.

- Nakashima, K., Murakami, T., Tanabe, H., Inoue, M. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1840, 3034-3041, 2014.
- Neidell, M.J., Cohen, B., Furuya, Y., Hill, J., Jeon, C.Y., Glied, S., Larson, E.L. Costs of healthcare- and community- associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Disease** 55, 807-815, 2012.
- Nelson, R.M., Wallberg, A., Simões, Z.L.P., Lawson, D.J., Webster, M.T. Genome-wide analysis of admixture and adaptation in the Africanized honeybee. **Molecular Ecology** <http://doi.org/10.1111/mec.14122>, 2017.
- Neto, F.C., Guaratine, T., Costa-Lotufo, L., Colepicolo, P., Gates, P.J., Lopes, N.P. Re-investigation of the fragmentation of protonated carotenoids by electrospray ionization and nanospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 30, 1540-1548, 2016.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products** 79, 629–661, 2016.
- Nordmann, P., Cornaglia, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection** 18, 411-412, 2012.
- Novak, E.M., Silva, M.S.C., Marcucci, M.C., Sawaya, A.C.H.F., López, B.G.C., Fortes, M.A.H.Z., Giorgi, R.R., Marumo, K.T., Rodrigues, R.F., Maria, D.A. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An *in vitro* and *in vivo* study. **Journal of Functional Foods** 11, 91-102, 2014.
- Ohlemeyer, C.L., Hornberger, L.L., Lynch, D.A., Swierkosz, E.M., Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in adolescent females: in pouch TV culture versus wet-mount microscopy. **Journal of Adolescent Health** 22, 205-208, 1998.
- Okamoto, Y., Tobe, T., Ueda, K., Takada, T., Kojima, N. Oral administration of Brazilian propolis exerts estrogenic effect in ovariectomized rats. **The Journal of Toxicological Sciences** 40, 235-242, 2015.

- Oldoni, T.L.C., Cabral, I.S.R., d'Arce, M.A.B.R., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., Nascimento, A.M., Alencar, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology** 77, 208-213, 2011.
- Oliveira, P.F., Lima, I.M.S., Munari, C.C., Bastos, J.K., Filho, A.A.S., Tavares, D.C. Comparative Evaluation of Antiproliferative Effects of Brazilian Green Propolis, Its Main Source *Baccharis dracunculifolia*, and Their Major Constituents Artepillin C and Baccharin. **Planta Med** 80, 490-492, 2014.
- Oliveira, R.N., McGuinness, G.B., Rouze, R., Quilty, B., Cahill, P., Soares, G.D.A., Thiré, R.M.S.M. PVA hydrogels loaded with a Brazilian propolis for burn wound healing applications. **Journal of Applied Polymer Science** 132, 2015.
- Oulahal, N., Brice, W., Martial, A., Degraeve, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control** 19, 178-185, 2008.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 2502-2506, 2002.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers** 82, 1174-1183, 2010.
- Paulino, N., Abreu, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Scremin, A., Bretz, W.A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology** 587, 296-301, 2008.
- Paulino, N., Teixeira, C., Martins, R., Scremin, A., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Abreu, S.R.L., Castro, S.L., Marcucci, M.C. Evaluation of the Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of a Brazilian Green Propolis. **Planta Med** 72, 899-906, 2006.

- Paviani, L., Dariva, C., Marcucci, M.C., Cabral, F.A: Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from dry ethanolic extract of propolis. **Journal of Food Process Engineering** 33, 15-27, 2010.
- Pereira, A.S.; Seixas, F.R.M.S.; Neto, F.R.A.; Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** 25, 321-326, 2002.
- Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rastrelli, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59, 6484-6491, 2011.
- Pimenta, H.C., Musis, C.R., Borges, A.H., Aranha, A.M.F., Violante, I.M.P.. In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian oral research**, 29, 2015.
- Pinheiro, K.S., Ribeiro, D.R., Alves, A.V.F., Pereira-Filho, R.N., Oliveira, C.R., Lima, S.O., Reis, F.P., Cardoso, J.C., Albuquerque-Júnior, R.L.C. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis, **Acta Cirúrgica Brasileira** 29, 111-117, 2014.
- Pinkner, J.S., Remaut, H., Buelens, F., Miller, E., Aberg, V., Pemberton, N., Hedenstrom, M., Larsson, A., Seed, P., Waksman, G., Hultgren, S.J., Almqvist, F. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **PNAS** 47, 17897-17902, 2006.
- Pippi, B., Lana, A.J.D., Moraes, R.C., Güez, C.M., Machado, M., Oliveira, L.F.S., Lino von Poser, G., Fuentefria, A.M. *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology** 118, 839-850, 2015.
- Pontin, K., Filho, A.A.S., Santos, F.F., Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Nanayakkara, N.P.D., Bastos, J.K., Albuquerque, S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research** 103, 487-492, 2008.

- Prakash, B., Veeregowda, B.M., Krishnappa, G. Biofilms: a survivor strategy of bacteria. **Current Science** 85, 1299-1307, 2003.
- Quintas-Granados, L.I., Gamez, B.I.C., Villalpando, J.L., Ortega-Lopez, J., Arroyo, R., Azuara-Liceara, E., Alvarez-Sanchez, M.E. Biofunctional activity of deoxyhypusine synthase/hydroxylase from *Trichomonas vaginalis*. **Biochimie** 123, 37-51, 2016.
- Ravaee, R. Synthetic siRNAs effectively target cysteine protease 12 and actinin transcripts in *Trichomonas vaginalis*. **Experimental Parasitology** 157, 30-34, 2015.
- Reddy, K., Yedery, R., Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents** 24, 536-547, 2004.
- Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A. Brazilian Red Propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities, **Journal of the Science of Food and Agriculture** 91, 2363-2370, 2011.
- Rocha, B.A., Bueno, P.C.P., Vaz, M.M.O.L.L., Nascimento, A.P., Ferreira, N.U., Moreno, G.D.P., Rodrigues, M.R., Costa-Machado, A.R.D.M., Barizon, E.A., Campos, J.C.L., De Oliveira, P.F., Acésio, N.D.O.E., Martins, S.D.P.L., Tavares, D.C., Berretta, A.A. Evaluation of a propolis water extract using a reliable RPHPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterisation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2013, 670451-670462, 2013.
- Rochford, E.T., Richards, R.G., Moriarty, T.F. Influence of material on the development of device-associated infections. **Clinical Microbiology and Infection** 18, 1162-1167, 2012.
- Rodrigues, C.R.F., Plentz, L.C., Marcucci, M.C., Dihl, R.R., Lehmann, M. In vivo evaluation of mutagenic and recombinogenic activities of Brazilian propolis. **Food and Chemical Toxicology** 96, 117-121, 2016.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C.C., Righi, A.A., Salatino, M.L.F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports** 28, 925-936, 2011.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 1, 33-38, 2005.

- Salomão, K., Souza, E.M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H.S., Castro, S.L. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2011, 1-11, 2011.
- Santana, L.C.L.R., Carneiro, S.M.P., Caland-Neto, L.B., Arcanjo, D.D.R., Moita-Neto, J.M., Citó, A.M.G.L., Carvalho, F.A.A. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Natural Product Research** 28, 340-343, 2014.
- Santos, D.C., David, J.M., David, J.P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Química Nova** 40, 171-175, 2017.
- Santos, V.R., Pimenta, F.J.G.S., Aguiar, M.C.F., do Carmo, M.A.V., Naves, M.D., Mesquita, R.A. Oral Candidiasis Treatment with Brazilian Ethanol Propolis Extract. **Phytotherapy Research** 19, 652-654, 2005.
- Santos, V.S., Macedo, F.A., Vale, J.S., Silva, D.B., Carollo, C.A. Metabolomics as a tool for understanding the evolution of *Tabebuia sensu lato*. **Metabolomics** <http://doi.org/10.1007/s11306-017-1209-8>, 2017.
- Sartori, G., Pesarico, A.P., Pinton, S., Dobrachinski, F., Roman, S.S., Pauletto, F., Junior, L.C.R., Prigol, M. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Cell Biochemistry and Function** 30, 1-10, 2010.
- Satpathy, S., Sudip, K.S., Smaranika, P., Sangeeta, R. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 7, 56-66, 2016.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology** 184, 1140-1154, 2002.
- Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian própolis. **Chemistry Central Journal** 5, 27, 2011.

- Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C., Rodrigues, R.F.D., Eberlin, M.N. Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie** 37, 398–407, 2006.
- Sawaya A.C.H.F., Tomazela D.M., Cunha I.B.S., Bankova V.S., Marcucci M.C., Custodio A.R., Eberlin M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis, **Analyst** 129, 739–744, 2004.
- Sforcin, J.M. Propolis and the immune system: A review. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 1-14, 2007.
- Sforcin, J.M., Bankova, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology** 133, 253-260, 2011.
- Sharma, R.S., Mathur, A.K., Chandhiok, N., Datey, S., Saxena, N.C., Gopalan, S., Sharma, S., Mittal, S., Sehgal, R., Sumandal, B.K., Chanda, A., Salvi, V., Mutalik, N., Coyaji, K.J., Gibsson, A., Hazari, K., Kalgutkar, S., Talwar, G.P. Phase II clinical trial with Praneem polyherbal tablets for assessment of their efficacy in symptomatic women with abnormal vaginal discharge (an ICMR task force study). **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 103, 167-172, 2009.
- Shigemi, T., Yasuko, A., Sho, H., Taichi, M., Hiroshi, N., Kenji, L. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. **Natural Product Communications** 11, 201-205, 2016.
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H., Hara, H. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against in vitro and in vivo Ischemic Neuronal Damage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2, 201-207, 2005.
- Shimizu, K. Ashida, H., Matsuura, Y., Kanazawa, K. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 424, 181-188, 2004.
- Shub, T.A., Kagramanova, K.A., Voropaeva, S.D., Kivman, G. Effect of propolis on *Staphylococcus aureus* strains resistant to antibiotics. **Antibiotiki** 26, 268-271, 1981.

- Silici, S., Kutluca, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology** 99, 69-73, 2005.
- Silva, D.B., Rodrigues, E.D., Silva, G.V.J., Lopes, N.P., Oliveira, D.C.R. Post-column sodiation to enhance the detection of polyacetylene glycosides in LC-DAD-MS analyses: an example from *Bidens gardneri* (Asteraceae). **Talanta** 135, 87-93, 2015.
- Silva, E.C.C.; Muniz, M.P.; Nunomura, R.C.S. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova** 36, 628-633, 2013.
- Silva, J.C., Rodrigues, S., Feás, X., Estevinho, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology** 50, 1790-1795, 2012.
- Silva, R.P.D., Machado, B.A.S., Barreto, G.A., Costa, S.S., Andrade, L.N.N., Amaral, R.G., Carvalho, A.A., Padilha, F.F., Barbosa, J.D.V., Umsza-Guez, M.A., Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One** 12,,: e0172585. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>
- Simões, L.M.C., Gregório, L.E., Da Silva Filho, A.A., de Souza, M.L., Azzolini, A.E.C.S., Bastos, J.K., Lucisano-Valim, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology** 94, 59-65, 2004.
- Simões-Ambrosio, L.M.C., Gregório, L.E., Sousa, J.P.B., Figueiredo-Rinhel, A.S.G., Azzolini, A.E.C.S., Bastos, J.K., Lucisano-Valim, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia** 81, 1102-1108, 2010.
- Siqueira, A.B.S., Gomes, B.S., Cambuim, I., Maia, R., Abreu, S., Souza-Motta, C.M., de Queiroz, L.A., Porto, A.L. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil, **Letters in Applied Microbiology** 48, 90-96, 2009.

- Siqueira, A.L., Dantas, C.G., Gomes, M.Z., Padilha, F.F., Albuquerque-Júnior, R.L.C., Cardoso, J.C. Study of antibacterial action of hydroalcoholic extract of Red Propolis on *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP** 43, 359-366, 2014.
- Sohrabi, M.R., Darabi, G. The application of continuous wavelet transform and least squares support vector machine for the simultaneous quantitative spectrophotometric determination of Myracetin, Kaempferol and Quercetin as flavonoids in pharmaceutical plants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 152, 443-452, 2016.
- Souza, R.P., Abreu, A.L.P., Ferreira, E.C., Rocha-Brischiliari, S.C., Carvalho, M.D.B., Pelloso, S.M., Bonini, M.G., Gimenes, F., Consolaro, M.E.L. Short Report: Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus-infected brazilian women by multiplex polymerase chain reaction. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 89, 1199-1202, 2013.
- Szliszka, E., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A., Mertas, A., Czuba, Z.P., Król, W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2013, 1-13, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/976415>
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., Krol, W. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology** 38, 941-953, 2011.
- Tani, H., Hasumi, K., Tatefuji, T., Hashimoto, K., Koshino, H., Takahashi, S. Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 18, 151-157, 2010.
- Tazawa, S., Arai, Y., Hotta, S., Mitsui, T., Nozaki, H., Ichihara, K. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. **Natural Products Communications** 11, 201-205, 2016.
- Teixeira, E.W., Message, D., Negri, G., Salatino, A., Stringheta, P.C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 7, 307-315 2010.

- Teles, F., da Silva, T.M., da Cruz Júnior, F.P., Honorato, V.H., Costa, H.O., Barbosa, A.P.F., de Oliveira, S.G., Porfírio, Z., Liborio, A.B., Borges, R.L., Fanelli, C. Brazilian Red Propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model, **Plos One** 10, e0116535, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116535>.
- Trachoo, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarín Journal of Science and Technology** 25, 807-815, 2003.
- Trentin, D. S., Giordani, R.B., Macedo, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato** 14, 213-238, 2013.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., Rocha Pasin, F., Tsvetkova, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 3, 249-254, 2006.
- Vasconcelos, W.A., Braga, N.M.A., Chitarra, V.R., Santos, V.R., Andrade, R A.L., Domingues, Z. Bioactive glass-green and Red Propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Natural Products Chemistry e Research** 2, 6, 2014.
- Vasconcelos, W.A., Braga, N.M.A., Chitarra, V.R., Santos, V.R., Andrade, A.L., Domingues, R.Z. Bioactive glass-green and Red Propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Natural Products Chemistry e Research** 2, 6, 2014.
- Vessecchi, R., Galembeck, S.E., Lopes, N.P., Nascimento, P.G.B.D., Crotti, A.E.M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova** 31, 840-853, 2008.
- Vessecchi, R., Borges, L.S., Emery, F.S., Lopes, N.P. Understanding the fragmentation mechanisms of methoxy-, mesyl-, and tosyl-lapachol derivatives by computational chemistry and mass spectrometry analysis. **International Journal of Mass Spectrometry** <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2016.11.012>, 2016.
- Wagh, V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences** 2013, 2013.
- Waller, S.B., Peter, C. M., Hoffmann, J.F., Picoli, T., Osorio, L.G., Chaves, F., Zani, J.L., de Faria, R.O., de Mello, J.R.B., Meireles, M.C.A. Chemical and cytotoxic analyses of

brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis** 105, 117-121, 2017.

Washi, K., Shimamoto, Y., Kitamura, H. Brazilian propolis extract increases leptin expression in mouse adipocytes. **Biomedical Research** 36, 343-346, 2015.

WHO, 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: World Health Organization, Departamente of reproductive health and research. Disponível em: [http://www.rhm-elsevier.com/article/S0968-8080\(12\)40660-7/abstract?showall=true](http://www.rhm-elsevier.com/article/S0968-8080(12)40660-7/abstract?showall=true). Acesso em: 20/11/2016.

Woiski, R.G., Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research Impact e Description** 37, 99-105, 1998.

Wooten, D.A., Winston, L.G. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with community-onset and hospital-onset pneumonia. **Respiratory Medicine** 107, 1266-1270, 2013.

Yen, C., Chiu, H., Wu, C., Lu, Y., Han, Y., Shen, Y., Venkatakrishnan, K., Wang, C. Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. **Food Science and Technology** 17, 6290, 2017.

Zhang, T., Omar, R., Siheri, W., Mutairi, S.A., Clements, C., Fearnley, J., Edrada-Ebel, R., Watson, D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. **Talanta**. 120, 181-190, 2014.

Zuanazzi, J.A.S., Montanha, J.A. Capítulo do Livro: Flavonoides. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.O., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. UFRGS, UFSC. 5, 557-576, 1999.

Capítulo 2

1 **Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of**
2 **killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis***

3 Djaceli Sampaio de Oliveira Dembogurski¹, Danielle da Silva Trentin^{2,3}, Graziela Vargas Rigo⁴,
4 Rodrigo Campos², Tiana Tasca⁴, Alexandre José Macedo², Carlos Alexandre Carollo¹, Denise
5 Brentan Silva^{1*}

6 ¹*Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências*
7 *Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo*
8 *Grande, MS, Brazil.*

9 ²*Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana (LaBDiM), Faculdade de Farmácia and Centro de*
10 *Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil.*

11 ³*Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre*
12 *(UFCSPA), Porto Alegre (RS), Brazil*

13 ⁴*Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*
14 *(UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

15

16

17

18

19

20

21

22

23 *Corresponding author. Tel.: +55 67 33457366. E-mail address: denise.brentan@ufms.br

24 **Abstract**

25 Propolis, a resin produced by bee, is widely used in industrial products, including food,
26 cosmetics, supplements and pharmaceutical. Extracts (ethanolic and hydroethanolic) and
27 fractions yielded by accelerated solvent extraction methodology were obtained from different
28 samples of Brazilian brown propolis (BBP). They were evaluated for antioxidant capacity, total
29 phenolic content (TPC), antimicrobial, antibiofilm and anti-*Trichomonas vaginalis* activities.
30 The metabolomics profiling was determined by LC-DAD-MS and an innovative application of
31 statistical analyses (multivariate and chemometrics) was applied to correlate chemical
32 compounds with biological activities. Eighty six compounds were identified, like as
33 phenylpropanoic acids, flavonoids, chlorogenic acids and prenylated phenylpropanoic acids.
34 Propolis-fractions killed about 93% of *Staphylococcus aureus* in biofilm (at concentration of
35 125 µg/mL) and showed activity against *T. vaginalis* with MIC at 400 µg/mL. The prenylated
36 phenylpropanoic acids correlated positively with both activities, such as the metabolites
37 artepillin C, drupanin and baccharin.

38

39 **Keywords:** propolis, biofilm, *Trichomonas vaginalis*, LC-DAD-MS, artepillin C.

40 1. Introduction

41 Propolis, a natural resin produced by bee from several plant botanical sources, is applied
42 in traditional medicine since remote times to the treatment of different diseases (Bankova,
43 2005). Several pharmacological and biological properties have been described for propolis
44 (Bittencourt, Ribeiro, Franco, Hilhorst, Castro & Fernandez, 2015, Tiveron *et al.*, 2016),
45 justifying and stimulating the increased number of health food products, cosmetics,
46 pharmaceuticals with propolis, and it remains as a potential source for the discovery and
47 development of new products (Toreti, Sato, Pastore, & Park, 2013). Propolis can exhibit
48 different colors (green, brown and red), showing distinct chemical compositions, which reflects
49 on differences of their biological properties (Tiveron *et al.*, 2016). The chemical constituents
50 presented from Brazilian propolis are mainly flavonoids, chlorogenic acids, terpenes, phenolic
51 acids and derivatives, fatty acids, prenylated benzophenones and prenylated phenylpropanoid
52 acids (Trusheva *et al.*, 2006, Piccinelli, Lotti, Campone, Cuesta-Rubio, Campo Fernandez, &
53 Rastrelli, 2011, Fernandes-Silva, Salatino, Salatino, Breyer, & Negri, 2013, Bittencourt *et al.*,
54 2015, Tiveron *et al.*, 2016). Brazilian brown propolis (BBP) is commonly composed by
55 flavonoids, fatty acids, phenylpropanoid acid and their prenylated derivatives, such as artepillin
56 C (Fernandes-Silva *et al.*, 2013). This compound has been described in high amounts in
57 Brazilian green propolis, which is considered a marker of the botanical source *Baccharis*
58 *draculculifolia* (Machado *et al.*, 2016) and it possess several biological activities, including
59 antibacterial properties (Veiga *et al.*, 2017, Messerli *et al.*, 2009, Paulino *et al.*, 2008).

60 Recently, a green propolis ethanolic extract revealed promising results against
61 *Streptococcus mutans* dental biofilm, and chlorogenic and phenylpropanoid acids (caffeic,
62 ferrulic and *p*-coumaric acids) could be identified (Cardoso *et al.*, 2016). However, the activity
63 of Brazilian propolis against bacterial biofilm has been scarcely explored, including the study
64 of agents able to prevent biofilm formation and agents able to kill bacteria in biofilm form. New

65 strategies to inhibit the biofilm formation or to combat formed biofilms are attractive for
66 medicinal area, since antibacterial treatments are frequently ineffective against bacteria into
67 biofilm leading to chronic infectious diseases. The bacterial infections in humans by
68 *Staphylococcus aureus* are common in hospitals, increasing the time hospital stay, death
69 incidence and medical costs (Bjarnsholt *et al.*, 2013).

70 *Trichomonas vaginalis*, this is a parasitic protozoan that causes trichomoniasis, the most
71 common non viral sexually transmitted disease worldwide with an incidence of 276 million
72 cases per year (WHO, 2012). Of concern, this infection is associated with complications such
73 as pregnancy outcomes, infertility, cervical and prostate cancers (Vieira, Tasca, & Secor, 2017).
74 The treatment of trichomoniasis is based on 5'-nitroimidazoles derivatives, with only two drugs
75 approved by the Food and Drug Administration (FDA, USA), metronidazole and tinidazole.
76 The main failures in the treatment include side effects, treatment noncompliance, and an
77 increase number of *T. vaginalis* resistant isolates (Muzny & Schwebke, 2013) that it highlights
78 the requirement of new drugs and treatments (Vieira *et al.*, 2017). To our knowledge, only
79 cuban propolis was studied against *T. vaginalis* (Fidalgo *et al.*, 2011), and promising results
80 were described. Thus, this is another underexplored field for propolis that is relevant to develop
81 new products from it.

82 The developing of innovative strategies for screening and analysis of natural products
83 has been applied to reduce the barriers for new drugs developing, accelerating the processes
84 and getting a holistic perspective based on metabolic profiling (Wishart, 2016). Thus
85 metabolomics approaches can be applied to identify action mode of drugs and novel drugs
86 targets, as well as to detect diseases, to discovery potential drugs and others (Wishart, 2016,
87 Harvey, Edrada-Ebel & Quinn, 2015). Although the traditional methods to determine bioactive
88 compounds, like as isolation by guided-studies from extracts, have successful, they required
89 long time and this reductionist procedure could not allow the determination of synergist effects

90 between the components (Wang *et al.*, 2005). Therefore, recently the correlation between
91 biological properties and metabolome by multivariate statistical analysis has been applied to
92 identify the potential bioactive compounds from extracts (Harvey, Edrada-Ebel & Quinn, 2015,
93 Bittencourt *et al.*, 2015). This technique has been scarcely explored, but it induces a new time
94 for drug discovery by detection and identification of new bioactive compounds and the
95 synergism effects in the systems biology (Wang *et al.*, 2005, Bittencourt *et al.*, 2015). An
96 application example of this methodology is the identification antibacterial active compounds
97 from Brazilian brown and green propolis. However, only non-polar constituents were studied
98 by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) such as triterpenoids, steroids,
99 sesquiterpenes and hydrocarbons, and they were suggested synergy action for the antibacterial
100 activity (*M. luteus*, *S. aureus* and *B. subtilis*) (Bittencourt *et al.*, 2015). Then our study aimed
101 the application of metabolic profiling (compounds more polar) by LC-DAD-MS and statistical
102 analyses to identify them potential bioactive metabolites against bacterial biofilms and *T.*
103 *vaginalis* from Brazilian brown propolis (BBP).

104

105 **2. Materials and Methods**

106 *2.1. Propolis samples and extration*

107 Brazilian brown propolis (BBP) samples were acquired commercially. They were
108 collected in the period of 2015 December and 2016 March and produced from tree different
109 Brazilian states: Mato Grosso do Sul (MS) [Apiário Vovô Pedro Ltda], Paraná (PR) [Apiário
110 Mel da Ilha Ltda] and Minas Gerais (MG) [Natucentro Ltda]. The samples were stored at -16°C
111 until its use for extraction.

112 Initially, the BBP samples (500 mg) were extracted with ethanol:water (7:3, v/v) and
113 ethanol (4 mL) applying an ultrasonic bath (25 min) to produce hydroethanolic and ethanolic
114 extracts. The supernatants were maintained at 10°C for 2h to remove waxes as described by

115 Sawaya, Cunha & Marcucci, 2011. Subsequently, the supernatants were partitioned with
116 hexane and hydroethanolic extracts were concentrated and freeze-dried. Thus, two extracts
117 from each BBP were obtained; the ethanolic (P-Et/MS, P-Et/MG and P-Et/PR) and
118 hydroethanolic (P-EtH₂O/MS, P-EtH₂O/MG and P-EtH₂O/PR) extracts.

119

120 *2.2 Fractionation of propolis extract*

121 The BBP sample from MS (100 g) were extracted with ethanol (2.8 L) by ultrasonic
122 bath (25 min) and processed as described previously. The P-Et/MS extract (1g) was fractionated
123 by accelerated solvent extractor Dionex™ ASE™ 150 using silica gel 230-400 mesh MERCK
124 (39 g). The fractions were obtained with hexane (P-Et/MS-Hx, 0.3%), dichloromethane (P-
125 Et/MS-DCM, 17.8%), ethyl acetate (P-Et/MS-Ac, 44.2%) and ethanol (P-Et/MS-Et, 37.7%).
126 The parameters used in the extractor were the following: temperature of 100 °C, static
127 extraction cycle of 1 min, 150% volume wash, pressure of 1,500 psi and purge of 100 sec. All
128 the fractions were concentrated on rotatory evaporator and freeze-dried.

129

130 *2.3 Analyses of extracts and fractions by liquid chromatography coupled to diode array 131 detector and mass spectrometry (LC-DAD-MS)*

132 An UFLC LC-20AD Shimadzu Prominence and a high-resolution mass spectrometer with
133 electrospray ionization source (MicrOTOF-Q III - Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) were
134 used to analyze the samples. A Kinetex C18 column (2.6μ, 100A, 150 X 2.1 mm, Phenomenex)
135 was used. The samples were prepared at 1mg/mL concentration, filtered on PTFE filters (Millex
136 0.22 mm x 13 mm, Millipore) and 1 μL was injected into chromatographic system. The oven
137 temperature and flow rate were 50°C and 0.3 mL/min, respectively. The mobile phase was
138 acetonitrile (B) and water (A) both added formic acid 0.1% (v/v). The elution profile was 0-2

139 min 3% of B, 2-25 min 3 to 25% of B, 25-40 min 25 to 80% of B and 40-43 min 80% of B. The
140 samples were analyzed in negative and positive ion mode. Nitrogen was used as nebulizer gas
141 (4 Bar) and drying gas (9 L/min), applying the capilar voltage of 2500 Kv. The identification
142 of the compounds was performed by UV, MS (accurate mass) and fragmentation profile data
143 compared to data published and some compounds were confirmed by co-injection of authentic
144 standard.

145

146 *2.4 Bacteria and parasites culture conditions*

147 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25904 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
148 27853 were cultivated in Mueller Hinton (MH) agar (Oxoid Ltda., Inglaterra) at 37°C for 24 h.
149 Bacterial suspensions in 0.9% NaCl sterile were prepared by adjusting optical density at 600
150 nm to 0.15, which corresponds to 3×10^8 CFU/mL.

151 *T. vaginalis* isolate ATCC 30236 (JH 31A #4, from the American Type Culture
152 Collection, ATCC, USA) was used in this study. Trophozoites were cultivated in trypticase-
153 yeast extract-maltose (TYM) medium at pH 6.0, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated
154 bovine serum and incubated at 37 °C (Diamond, 1957). Organisms in the logarithmic phase of
155 growth and exhibiting more than 95 % viability and normal morphology were harvested,
156 centrifuged, and resuspended on new TYM medium for testing propolis extracts and fractions.

157

158 *2.5 Activity on bacterial growth: determination of minimal bactericidal concentration for* 159 *planktonic cells (MBC-P)*

160 Broth microdilution and MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich,
161 EUA, Bellefonte, PA) assays were applied in order to determine the minimal concentration of
162 sample able to kill bacteria. Briefly, in 96-well plate (Costar 3599, Corning, Inc., Corning,
163 NYC), bacteria were cultured on Brain Hearth Infusion medium (BHI) during 24 h of at 37°C

164 in presence of extracts or fractions. After incubation, the content of wells was removed and
165 planktonic cells were plated on Mueller Hinton agar (37°C, 24 h) to verify the presence of
166 viable cells. In parallel, the content of wells (planktonic cells) was transferred to a new
167 microplate and 0.3 mg/mL of MTT was added. After incubation (1h, 37°C), the absorbance at
168 570 nm was measured. Minimal bactericidal concentration for planktonic cells (MBC-P) was
169 determined as the lowest concentration able to avoid bacterial colonies development and which
170 bacteria were classified as unviable according measurement in MTT assay.

171

172 2.6 Activity on biofilm formation

173 Biofilm formation was evaluated using crystal violet assay according Trentin *et al.*
174 (2011), with modifications. In a 96-well plate (Costar 3599, Corning, Inc., Corning, NYC), 4
175 µL of the extracts and fraction dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) were added to 76 µL of
176 sterile water, 40 µL culture broth (Brain Heart Infusion medium (BHI) for *S. aureus* and
177 Tryptone Soya Broth (TSB) for *P. aeruginosa*) and 80 µL of bacterial suspension. Controls
178 possessing 4 µL of DMSO (vehicle) or antibacterial (vancomycin for *S. aureus* or gentamicin
179 for *P. aeruginosa*) were included. The extracts/fractions were evaluated at concentrations of
180 100 and 500 µg/mL. Microplates were incubated during 24 h at 37°C and adherent cells were
181 revealed with crystal violet while viability was measured by MTT assay. The bacterial grown
182 was evaluated in parallel according the absorbance at 600 nm measured between the initial (0
183 h) and final (24 h) times. The values higher 100% represent induction of bacterial grown or
184 biofilm formation compared to the negative control.

185

186 2.7 Activity on established biofilm: Minimal bactericidal concentration for biofilm cells (MBC-
187 B) and minimal biofilm eradication concentration (MBEC)

188 *S. aureus* biofilm was grown for 24 h at 37°C (80 µL of bacterial suspension, 40 µL of
189 BHI and 80 µL of sterile water). Afterwards, the content of wells was removed (in order to
190 remove planktonic bacteria) and adherent cells were treated with samples (4 µL of samples, 76
191 µL of sterile water, 40 µL of BHI and 80 µL of sterile 0.9% NaCl) and microplates were
192 incubated during 24 h at 37°C. Then, the content of wells were removed, and biofilm biomass
193 and viability of the remaining biofilm were determined by crystal violet (Trentin *et al.*, 2011)
194 and MTT staining (0.3 mg/mL MTT, 37 °C 1h) methods, respectively. Minimal bactericidal
195 concentration for biofilm cells (MBC-B) was determined as the less concentration of sample
196 able to turn biofilm bacteria unviable as measured by MTT assay. Minimal biofilm eradication
197 concentration (MBEC) was determined as the lowest concentration of sample able to disrupt
198 biofilm biomass as measured by crystal violet assay. Positive (vancomycin) and negative
199 (vehicle DMSO) controls were included.

200

201 2.8. Confocal Laser Scanning microscopy (CLSM)

202 Biofilms were formed in the plates (37°C during 24 h) and after the content was removed
203 and biofilms were treated (37°C during 24 h), including positive and negative controls. The
204 compartments were gently washed with sterile saline and cells were stained during 30 minutes
205 with the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Life Technologies, USA), according
206 to the manufacturer instructions. In this staining, the SYTO-9 labels cells with damaged or
207 intact membranes (green fluorescence), whereas the propidium iodide penetrates only in the
208 cells with damaged membranes (red fluorescence), reducing the fluorescence of SYTO-9.
209 Images were obtained using an Olympus IX81 confocal microscope and UPLSAPO 60X W
210 NA:1.20 objective and were overlaid using Olympus FV 1000 software.

211

212 2.9 Anti-*T. vaginalis* assay

213 In the 96-well microplate, 50 μ L of the extracts and fractions (concentrations of 100 and
214 500 μ g/mL) were added to 150 μ L of trophozoites suspension (2.0×10^5 trophozoites/mL final
215 concentration). The plate was maintained for 24 h at 37 °C in 5% of CO₂ humidify.
216 Subsequently, the exclusion dye trypan blue was added and counting of viable number by
217 Neubauer camera. The viability of trophozoites was calculated considering 100% of negative
218 control by counting viable parasites in Neubauer camera using exclusion by trypan blue dye
219 (0.2%). Three controls were carried out: negative control (TYM only with trophozoites),
220 vehicle control (DMSO 0.6%) and positive control (100 μ M metronidazole). The
221 extracts/fractions that reduced 100% of viability trophozoites were used to determine the
222 minimum inhibitory concentration (MIC) by inoculating the content of the wells in new TYM
223 and checking up to 120h.

224

225 *2.10 Antioxidant capacity by DPPH assay*

226 The antioxidant was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-
227 Aldrich) method, as described by Herald, Gadgil & Tilley (2012). In a 96-well plate, 25 μ L of
228 the extracts/fractions (1 mg/mL) were added, as well as quercetin standard (400 μ g/mL). The
229 samples were serially diluted resulting in ten concentrations (extracts/fractions: 1, 0.5, 0.25,
230 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008 and 0.002 mg/mL; quercetin: 400, 200, 100, 50, 25, 12.5,
231 6.25, 3.125, 1.56 and 0.78 μ g/mL), which were analyzed in triplicates. All the samples were
232 added 200 μ L of DPPH (150 μ M/L in methanol 8:2, v/v), except in the negative and
233 extract/standard controls. The plate was incubated in the dark room temperature for 12h. The
234 measured absorbance was performed at 517 nm using an Elisa reader (SpectraMax Plus 384).
235 The IC₅₀ was calculated by the equation from standard curve and replacing the y value to reduce
236 50% of the DPPH. These calculations were carried out in Minitab 16 software.

237

238 *2.11. Statistical analyses for biological evaluations*

239 For the comparison between groups, Student's t-test ($p \leq 0.05$) was used. The
240 experiments were performed in triplicate and using different cultures ($n = 3$). The results were
241 expressed as mean \pm SD.

242

243 *2.12. Data processing for metabolomics analysis*

244 All the extracts/fractions were analyzed by LC-MS in positive and negative ion mode at
245 concentration 1 mg/mL, but the positive ion mode analyses were selected due to higher number
246 of peaks observed. The pool (produced from all the samples) was used to determine the
247 reproducibility of the equipment, as well as the stability of the substances. Initially, the data
248 was analyzed and processed on software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics). Metalign
249 software was applied to align the data; subsequently they were reduced through software
250 MSclust. Thus, the data was analyzed by Metaboanalyst 3.0 platform by statistical analyses
251 such as principal component analysis (PCA) and PatternHunter. The data were normalized by
252 median and transformed by log transformation. The biological results were inserted on input
253 array (100 - % trophozoites viability or % of biofilm x 100) and the positive and negative
254 correlations were determined applying Pearson correlation (significant at $p \leq 0.05$). The
255 metabolites with ion intensity lower than 2000 were excluded of input array.

256

257

258 **3. Results and Discussion**

259 *3.1. Extracts and fractions from BBP*

260 The extracts (ethanolic and hydroethanolic) and fractions were analyzed by LC-DAD-
261 MS. The extracts showed similar chemical compositions, but differences on intensity peaks

262 were observed (**Figure S1** – Supplementary Material). The principal component analysis (PCA)
263 analysis explained 66.8 % of data variability (50.1% and 16.7 % from component 1 and 2,
264 respectively) between the extracts and fractions (**Figure S2**). The dendrogram resulting from
265 hierarchal cluster (**Figure S2**) showed higher proximities of the metabolome of extracts and the
266 fraction P-Et/MS-Et. In addition, the fractions P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac revealed more
267 chemical similarities that could also be observed from their biological activity data.

268 The fractionation by accelerated solvent extractor was an efficient methodology to get
269 enriched fractions on artemillin C and prenylated coumaric acid derivatives (**Figure S3**). The
270 accelerated solvent extraction (ASE) has shown several advantages, such as high
271 reproducibility and efficiency, which can be easily applied in industrial processes (Camel,
272 2001). However the application of ASE is innovative for the purification of the compounds, as
273 we demonstrated in this study for the obtaining of the artemillin C, and it allow the application
274 in higher scales. Thus, we produced fractions from P-Et/MS to evaluate against *T. vaginalis*
275 and biofilm formation and subsequently they were analyzed by LC-DAD-MS applying
276 metabolomics tools and statistical analyses to correlate the chemical compounds with the
277 biological activities, as subsequently demonstrated.

278

279 *3.2. Identification of the constituents by LC-DAD-MS from extracts and fractions from* 280 *Brazilian brown propolis (BBP)*

281 The chromatograms of the ethanol extracts and fractions were illustrated in the **Figure**
282 **1**. The constituents from BBP were identified based on the spectral data of UV, MS and
283 MS/MS, compared to the data reported in the literature and to the injection of some authentic
284 standards (**Table 1**).

285 The extracts of BBP have showed several similar chemical constituents, including
286 chlorogenic acids, phenylpropanoids acids, flavonoids, prenylated phenylpropanoids acids,

287 diterpenes and others (**Table 1, Figure 1**). A total of 86 metabolites were detected and identified
288 from the samples, showing the prenylated phenylpropanoids acids with higher intensities in the
289 chromatogram (**Figure 1 and S3**).

290 The chromatographic peaks **3, 9, 10, 15, 16, 20** and **28** showed two bands in the UV
291 spectra at $\lambda_{\max} \approx 299$ and 325 nm, which are compatible to caffeic acid and the MS data to
292 chlorogenic acids (Silva, Okano, Lopes & Oliveira, 2013). Their identifications were based on
293 the comparison of the fragmentation pathway described by Clifford, Knight & Kuhnert (2003)
294 in negative ion mode. The product ions at m/z 179 and 191 are yielded by losses of quinic and
295 caffeic acids, respectively. While the product ion at m/z 173 is relative to loss of a caffeoyl unit
296 and a molecule of water. This ion is a diagnostic ion for 4-*O-E*-caffeoylquinic acid, because the
297 water elimination is mandatory to occur the loss of caffeoyl unit due to the absence of spatial
298 proximity of this unit and COOH or OH (at C-1) (Clifford, Zheng & Kuhnert, 2006). In
299 addition, the quinic acid esterification by caffeoyl at C-3 and C-5 was confirmed by ion m/z
300 179 from 50 and 5% intensity in relation to base peak (m/z 191), respectively. Thus, the
301 chlorogenic acids from BPP was identified as 5-*O-E*-caffeoylquinic acid (**3**), 3,4-di-*O-E*-
302 caffeoylquinic acid (**9**), 3,5-di-*O-E*-caffeoylquinic acid (**10**), 4,5-di-*O-E*-caffeoylquinic acid
303 (**15**), *O-E*-coumaroyl-caffeoylquinic acid (**16, 20**), and 3,4,5-tri-*O-E*-caffeoylquinic acid (**28**).
304 These constituents were already described in Brazilian propolis in green propolis (Fernandes-
305 Silva *et al.*, 2013).

306 Several phenylpropanoic acid derivatives were also identified from the samples, which
307 are basically composed by coumaric or caffeic acid. The UV spectra of these compounds were
308 used to suggest the presence of coumaroyl ($\lambda_{\max} \approx 299$ and 310 nm) or caffeoyl units ($\lambda_{\max} \approx 299$
309 and 325 nm) (Silva *et al.*, 2013). The fragment ions at m/z 163 ($C_9H_7O_3^-$) and 179 ($C_9H_7O_4^-$)
310 are relative to coumaric and caffeic acid, respectively, and confirmed them in the structures.
311 The compound **11** showed an intense ion at m/z 505.13990 [$M-H$]⁻ (compatible to $C_{24}H_{25}O_{12}^-$),

312 like as compound **12**, and the fragment ions m/z 181 relative to dihydrocaffeic acid, which is
313 yielded by the loss of hexosyl-caffeoyl group. Thus the compounds **11** and **12** were putatively
314 identified as *O*-hexosyl-caffeoyl dihydrocaffeate, which were already isolated from *B.*
315 *dracunculifolia* (Nagatani, Warashina & Noro, 2001), but it has not been described from
316 propolis. By the similar fragmentation pathway, the compound **19** was putatively identified as
317 *O*-deoxyhexosyl-*O*-methyl-dihydrocoumaroyl-caffeate. In addition, the substances **45** and **52**
318 exhibited intense ions at m/z 327.1250 [M-H]⁻ (compatible to C₁₉H₁₉O₅⁻) and fragment ions at
319 m/z 181 and 163 that suggested dihydroconiferyl and coumaroyl groups. Thus they were
320 putatively identified as dihydrocoumaroyl coumarate, which are constituents described from
321 Brazilian propolis (Tazawa, Warashina & Noro, 1999). Besides, the dihydrocoumaric (**4**) and
322 coumaric acids (**5**) were also observed in the samples.

323 The prenylated coumaric and caffeic acids were also detected from BBP with one or
324 two prenyl units. These constituents are common compounds in the botanical source *B.*
325 *dracunculifolia*, and they are also founded commonly in Brazilian green and brown propolis
326 (Tazawa *et al.*, 1999, Fernandes-Silva *et al.*, 2013). From compound **14**, a UV spectrum similar
327 to caffeic acid was observed and its deprotonated ion (m/z 247.0997 relative to C₁₄H₁₅O₄⁻)
328 yielded the fragment ion at m/z 179 by loss of a prenyl that confirmed the esterification of
329 caffeic acid with this group. This compound was identified as *O*-prenyl caffeate, which was
330 already described from Brazilian propolis (Gardana & Simonetti, 2011) and MS data are
331 compatible to report in the literature (Piccinelli *et al.*, 2013). The compound **74** revealed an
332 intense ion at m/z 299.1636 [M-H]⁻ (C₁₉H₂₃O₃⁻) and its fragment ions m/z 255 and 200 are
333 produced by losses of 44 *u* (CO₂) and subsequently 55 *u* (*C₄H₇), which characterized the
334 carboxyl and prenyl groups, like as reported in the literature (Gardana, Scaglianti, Pietta &
335 Simonetti, 2007). This substance was also confirmed by ¹H NMR from the fraction P-Et/MS-
336 DCM (data not shown) as artepillin C. The similar fragmentation pattern was used to identify

337 the other prenylated compounds such as drupanin (**43**, m/z 187 $[M-H-CO_2]^-$ and 176 $[M-H-$
338 $\cdot C_4H_7]^-$) and baccharin (**77**) that showed an additional loss of a hydrocinnamoyl. The substances
339 with hydroxylated prenyl group was suggested based on further fragment yielded by 30 u losses
340 (CH_2O), as described for them (Carrão *et al.*, 2017). Thus, twenty four prenylated
341 coumaric/caffeic acids were identified from the analyzed samples.

342 Flavonoids were also detected from propolis samples, including flavanones (**25**, **49**, **50**
343 and **60** - $\lambda_{max} \approx 290$ and 330/shoulder nm), flavanonols (**8** and **30** - $\lambda_{max} \approx 290$ and 330/shoulder
344 nm), flavones (**6** and **36**- $\lambda_{max} \approx 265$ and 330 nm) and flavonols (**33**, **34**, **37**, **57** and **58** - λ_{max}
345 ≈ 270 and 360 nm), and the UV spectra were compatible for each class (Silva *et al.*, 2013). The
346 fragmentation pathway has been described in many studies, and basically the main fragments
347 ions to identify the aglycones are yielded the retro Diels Alder reactions (RDA) from C-ring,
348 as well as losses of CO by single-step mechanism (concerted mechanism) in the C-ring
349 (Cuycken & Claeys, 2004, Silva *et al.*, 2013). From RDA fragmentation, A- and B-ring
350 substitution pattern can be determined, such as the ion at m/z 151 (relative to ring A) of
351 compounds **49** and **50** that confirmed two hydroxyl groups in the A-ring. For the flavanones
352 and flavanonols, the structural characterization was also performed from the fragment ions
353 yielded by losses of a molecule of water ($[M-H-H_2O]^-$), which confirmed the hydroxyl at C-3
354 in flavanonols, such as the product ions at m/z 269 and 283 of compounds **8** and **30**, respectively.
355 In addition, the methoxyl groups were confirmed by losses of $\cdot CH_3$ for the flavonoids **30**, **34**,
356 **36**, **37**, **50**, **57**, **58** and **60**. The flavonoids identified from BBP samples have been described
357 from Brazilian propolis (Tazawa *et al.*, 1999, Piccinelli *et al.*, 2011, Banksota *et al.*, 2001,
358 Bankova *et al.*, 2005, Fernandes-Silva *et al.*, 2013, Gardana *et al.*, 2007, Tiveron *et al.*, 2016).

359

360 *3.3. Antioxidant capacity*

361 The antioxidant capacity, determined by DPPH assay, of ethanolic (P-Et/PR, P-Et/MG,
362 P-Et/MS) and hydroethanolic extracts (P-EtH₂O/PR, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/MS) showed IC₅₀
363 ranged from 2.53 to 3.35 and 1.72 to 2.81 µg/mL, respectively (**Table 2**). The hydroethanolic
364 extracts P-EtH₂O/PR and P-EtH₂O/MS revealed higher antioxidant capacity, and the fraction
365 P-Et/MS-Et revealed higher antioxidant capacity than the other fractions (P-Et/MS-Ac and P-
366 Et/MS-DCM) and its extract P-Et/MS. These extracts and fractions showed higher antioxidant
367 capacity than the observed from Brazilian green and brown propolis extracts by Bittencourt and
368 coworkers (2015).

369

370 3.4. Activity against bacterial biofilm

371 BBP extracts were not active for *P. aeruginosa* (**Figure S4**) but they showed significant
372 activities against *S. aureus* (**Figure 3**). The bacterial growth and biofilm formation were
373 determined by different times (1.5, 3, 6 and 24h) (**Figure 2 and S6**), and the higher biofilm
374 inhibition of *S. aureus* was detected after 24h (**Figure 2**). The extracts P-EtH₂O/MG, P-Et/MG
375 and P-EtH₂O/MS possess a strong capacity to inhibit bacterial growth (classical antibiotic
376 activity). The extracts P-Et/MS and P-Et/PR slightly influenced bacterial growth, but inhibited
377 significantly the biofilm formation. Thus, P-Et/MS extract was selected, since the chemical
378 composition of the extracts were similar, and fractionated to produce the fractions P-Et/MS-
379 DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et, which were evaluated against bacterial biofilm.

380 The samples P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et presented distinct profiles of
381 activity: (i) P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-DCM presented a pronounced antibiotic activity and (ii)
382 P-Et/MS-Et slightly inhibited bacterial growth and was capable to avoid 50% of biofilm
383 formation. Interestingly P-Et/MS-DCM kills bacteria inside the mature biofilm, in the same
384 magnitude as planktonic cells (**Table 2**), being more active than the extracts tested (P-Et/MS,

385 P-Et/MG and P-Et/PR), demonstrating the importance of the compounds presents on P-Et/MS-
386 DCM, mainly when compared with the extract P-Et/MS.

387 Regarding the ability of the samples to act against bacteria into biofilm, it was observed
388 that the ethanolic extracts (P-Et/MS, P-Et/MG and P-Et/PR) did not reduce the total biomass of
389 pre-formed (mature) biofilms but they reduced the viability of cells into biofilm (**Figure 2**).
390 The extracts P-Et/MG and P-Et/MS exhibited higher reduction of biofilm viability when
391 compared to P-Et/PR, showing similar reductions at concentration 125 µg/mL with the results
392 observed for vancomycin (control). However, the greatest activity of viability biofilm was
393 observed for the fraction P-Et/MS-DCM, exhibiting a reduction of 92.9% at concentration of
394 125 µg/mL, but it did not show influence on the total biomass.

395 Confocal microscopy obtained by LIVE/DEAD staining (**Figure 2f-i**) was applied to
396 confirm the colorimetric assays obtained the treatment of *S. aureus* pre-biofilm. P-Et/MS-DCM
397 was evaluated at concentrations 125 and 62.5 µg/mL, the lower active and the higher non-active
398 concentrations, respectively (**Figure 2h-i**). The biofilm treated with P-Et/MS-DCM at 125
399 µg/mL showed the most part of bacterial cell stained with red, which was higher than the
400 observed for the control vancomycin. The propidium iodide penetrates only in bacteria with
401 damage membranes and stained them with red color. Thus from the data of colorimetric assays
402 and turbidimetry, we confirmed that the biofilm treated with the fraction P-Et/MS-DCM the
403 cells lost their viability, showing a great activity when compared to the control vancomycin
404 (**Figure 2e**).

405 The Russian propolis have been demonstrated antibacterial (against planktonic cells)
406 and antibiofilm activities for *E. coli* and *S. aureus* and their action mechanism was on structural
407 rather than functional, acting by cell membrane damage and consequently bacterial death by
408 cell lysis (Bryan, Redden & Traba, 2015). Recently, Doganli (2016) observed a maximum *S.*
409 *aureus* ATCC 33862 biofilm reduction of 60.4% by the Turkey propolis extracts at 20 mg/mL.

410 Its chemical composition was composed by flavonoids and phenolic acids, including the
411 phenylpropenoic acid such as caffeic acid, ferrulic acid, p-coumaric acid and others. However,
412 prenylated phenylpropenoid acids were not described in these samples by Doganli (2016),
413 differently to the observed for the BBP in our study.

414 Although antibiofilm activity are described for Italian and Chilean propolis, the
415 inhibition rates were inferior than the observed in our studies and probably the action
416 mechanism could be different, since the Italian propolis showed reduction of the biofilm mass
417 of 68% (De Marco, Piccioni, Pagiotti & Pietrella, 2017). Other important issue is about the
418 chemical composition, chemical variations from propolis collected in different periods and
419 places represented changes of *S. mutans* antibiofilm from Chilean propolis, but only
420 phenylpropanoic acids and flavonoids were reported (Veloz, Saavedra, Lillo, Alvear,
421 Barrientos & Salazar, 2015). The ethanolic extract of Brazilian green propolis showed
422 promising results against *Streptococcus mutans* dental biofilm, but the prenylated
423 phenylpropanoic acids were not characterized in these samples (Cardoso *et al.*, 2016).

424 Although some studies described the antibiofilm activity of propolis, this information is
425 scarce in the literature, and underexplored for the Brazilian propolis. Thus our study was
426 important to demonstrate the action of BBP on bacteria into biofilm, and to establish the
427 importance of the prenylated phenylpropenoid acids for this activity.

428

429 3.5. Anti-*T. vaginalis* activity

430 The extracts and fractions from BBP were evaluated in our study and the results
431 demonstrated their potential and innovative use against *T. vaginalis*. The ethanolic extracts were
432 more active than hydroethanolic extracts, and the extracts P-Et/MS and P-Et/MG reduced more
433 than 99% of *T. vaginalis* viability (**Table 2, Figure S6**).

434 The fractions P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et, produced from the active
435 extract P-Et/MS, were also evaluated against *T. vaginalis* (**Table 2, Figure S6**). The fractions
436 P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac exhibited 100% of trophozoites viability reduction at 500
437 $\mu\text{g/mL}$, differently of results observed for P-Et/MS-Et (trophozoites viability: $83.93\% \pm 2.20$).
438 The MIC values were calculated for the fractions P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac (**Figure S7**),
439 showing the MIC value of $400\ \mu\text{g/mL}$ for both fractions. These results suggest that the anti-*T.*
440 *vaginalis* activity is related to the presence of prenylated coumaric acid derivatives in the
441 fractions P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac, such as artepillin C, drupanin, baccharin and others.

442 The Cuban propolis were evaluated against *T. vaginalis* (Fidalgo *et al.*, 2011),
443 demonstrating lower activities than the observed in our study. Thus, we demonstrated one new
444 potential application for the Brazilian brown propolis. In addition, the activity against *Candida*
445 *albicans*, a fungal that cause a common genital infection in women, has been described for the
446 ethanolic extract of Brazilian brown propolis from Parana (Brazil); this is the same sample P-
447 Et/PR evaluated here. After 48h, the extract (at $546.9\ \mu\text{g/mL}$) showed 40.8% of viable cells and
448 reduction of 95.3% of biofilm formation for *C. albicans* (Capoci *et al.*, 2015). Thus, ethanolic
449 extracts from BBP can also be useful for both important genital infections such as candidiasis
450 and trichomoniasis. Besides, it is relevant to highlight that these results can stimulate the
451 development of new strategies necessary due to the resistant *T. vaginalis* isolates and the scarce
452 therapeutic available alternatives (Vieira *et al.*, 2017).

453

454 3.6. Correlation test between the chemical constituents and biological activities

455 The univariate statistical analyses were applied by correlation analysis using Pearson r
456 correlation and Pattern Hunter. These analyses were performed to identify potential active
457 compounds from samples by correlation with antibiofilm and anti-*T. vaginalis* activities, as
458 well as with the antioxidant capacity values. The correlation coefficients were considered the

459 threshold 0.5 to consider a strong correlation, like as used by Bittencourt et al. (2015). This
460 methodology has been described for research active compounds and the determination of
461 potential synergistic between the compounds (Bittencourt *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2005), but
462 its applications is underexplored yet. From the Pattern Hunter (**Figure 3**), the correlations
463 statistically significant between the metabolites and the biological activities were obtained.

464 The chlorogenic acids did not show significant correlations with anti-*T. vaginalis* and
465 *S. aureus* antibiotic activities, and only the flavonoids dihydrokaempferide (**30**), *O*-methyl
466 quercetin (**34**), pinocembrin (**49**), *O*-methyl kaempferol (**57**) and di-*O*-methyl quercetin (**58**)
467 revealed positive correlations with both the activities.

468 Thus, more apolar compounds in the chromatogram revealed positive and strong
469 correlations with the activities and the main bioactive compounds, that correlated with the
470 evaluated biological activities, were the prenylated phenylpropanoic acids derivatives, such as
471 prenyl caffeic acid derivative (**40**), diprenylated hydroxyl caffeic acid (**41**, **53**), drupanin (**43**),
472 capillartemisin A (**47**), hydroxyl diprenyl coumaric acid (**51**, **62**), di-prenylated coumaric acid
473 (**59**), prenyl coumarate (**67**), artepillin C (**74**) and its isomer (**73**), baccharin (**77**) and *O*-
474 cinnamoyl di-prenyl-coumaric acid (**78**, **79**).

475 A heat map was produced from ion intensities of the chromatographic peaks relative to
476 prenylated phenylpropanoic acids derivatives that showed positive correlation with the
477 antibiofilm and anti-*T. vaginalis* activities (**Figure 4**). The ion intensities were normalized for
478 each compound to facilitate the determination of the highest intensity in the samples. The more
479 apolar and polar prenylated phenylpropanoic acids derivatives were distributed mainly in the
480 fractions P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac, respectively. As these fractions showed high and
481 similar anti-*T. vaginalis* activities, while the fraction P-Et/MS-Et was not active, it is certainly
482 related to prenylated phenylpropanoic acids derivatives.

483 The fractions P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac revealed pronounced antibiotic activity,
484 but only P-Et/MS-DCM exhibited high antibacterial activity at lower concentration against
485 planktonic and biofilm cells. They exhibited different bacterial profile, which can be related to
486 the differences in their chemical compositions. The chromatographic peaks relative to
487 compounds hydroxyl diprenyl coumaric acid (**62**), *O*-cinnamoyl di-prenyl-coumaric acid (**79**),
488 artepillin C (**74**) and its isomer (**73**) demonstrated higher ion intensities in the fraction P-Et/MS-
489 DCM when compared to other fractions and extracts, and they correlated positively with the
490 biological activities.

491 Artepillin C is a prenylated derivative common in green Brazilian propolis, which is
492 characteristic of the botanical source *B. dracunculifolia* used by bees. It demonstrated
493 correlation with the evaluated activities and showed more than 70% of chromatographic purity
494 ($\lambda=230-350$ nm, **Figure S3**) in the fraction P-Et/MS-DCM. In addition, artepillin C has shown
495 several biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antitumor
496 and others (Veiga *et al.*, 2017, Messerli *et al.*, 2009, Paulino *et al.*, 2008). However, Veiga and
497 collaborators (2017) suggested a synergy between artepillin C and other phenolic compounds
498 from Brazilian green propolis and *B. dracunculifolia* extracts to produce the antibacterial
499 against *S. aureus*.

500 The prenylation is structurally important for anti-*T. vaginalis* and antibiotic activities,
501 since the coumaric acid (**5**) did not exhibited positive correlation with the activities, while
502 drupranin (**43**), that has one prenyl group attached on coumaric acid, showed positive
503 correlation, as well as for other prenylated compounds of BBP. Thus, the data suggest a
504 synergistically effects mainly related to prenylated coumaric acid derivatives. These prenylated
505 derivatives exhibited antibacterial and antifungal activities, and these biological properties have
506 been related to increase of number of prenyl groups attached, but a synergism between the

507 complex constituents from propolis has been suggested to explain the significant activity and
508 the mechanism was not determined yet (Marcucci *et al.*, 2001).

509 The Brazilian green and brown propolis (ethanol extracts and fractions obtained with
510 hexane and dichloromethane) were analyzed by GC-MS and the chemical compounds were
511 correlated with antioxidant capacity and antibacterial activity by univariate and multivariate
512 statistical analysis. However, only triterpene, steroids, sesquiterpenes and hydrocarbons were
513 identified and they were correlated with the antibacterial activity, demonstrating distinct action
514 at different bacteria (Bittencourt *et al.*, 2015). Thus, our study is innovative and an evaluation
515 more holist of the components present in the BBP and their importance for antibiotic and anti-
516 *Trichomanas vaginalis* activities and antioxidant capacities could be determined.

517

518 **4. Conclusions**

519 Different Brazilian brown propolis were analyzed and all the samples showed artepillin
520 C as one of the main constituent, which indicate the vegetal source *Baccharis dracunculifolia*.
521 A total of 86 compounds were identified and the fractions were efficiently produced with an
522 innovative method by accelerated solvent extraction (ASE). The extracts and fractions revealed
523 high anti-*T. vaginalis* and antibiotic activities, mainly the fraction P-Et/MS-DCM. Person's
524 correlation (r) analysis shows that artepillin C and other prenylated coumaric acid derivatives
525 correlated positively with anti-trichomonocidal and antibiotic activities. P-Et/MS-DCM
526 demonstrated action on *S. aureus* living inside biofilm. Thus, these finds are valuable,
527 innovative and could be applied to develop new products and drugs from Brazilian brown
528 propolis.

529

530 **Conflicts of interest**

531 The authors declare no conflict of interest.

532

533 **Acknowledgement**

534 The authors would like to thank FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do
535 Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), CNPq (Conselho Nacional de
536 Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de
537 Pessoal de Nível Superior) for grant given.

538

539 **References**

- 540 Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal*
541 *of Ethnopharmacology*, *100*, 114-117.
- 542 Bittencourt, M.L.F., Ribeiro, P.R., Franco, R.L.P., Hilhorst, H.W.M., Castro, R.D., &
543 Fernandez, L.G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of
544 brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potencial
545 bioactive compounds. *Food Research International*, *76*, 449-457.
- 546 Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen,
547 P.Ø., & Høiby, N. (2013) The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology*, *21*, 466-474.
- 548 Bryan, J., Redden, P., & Traba, C. (2015). The mechanism of action of Russian propolis ethanol
549 extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Letters in Applied*
550 *Microbiology*, *62*, 192-198.
- 551 Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction,
552 pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls.
553 *Analyst*, *126*, 1182-1193.
- 554 Capoci, I.R.G., Bonfim-Mendonça, P.S., Arita, G.S., Pereira, R.R.A., Consolaro, M.E.L.,
555 Bruschi, M.L., Negri, M., & Svidzinski, T.I.E. (2015). Propolis is an efficient fungicide
556 and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based*
557 *Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 287693. Doi: 10.1155/2015/287693
- 558 Cardoso, J.B., Iorio, N.L.P., Rodrigues, L.F., Couri, M.L.B., Farah, A., Maia, L.C., & Antonio,
559 A.G. (2016). Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and
560 *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Archives of Oral Biology*, *65*, 77-81.

561 Carrão, D.B., Albuquerque, N.C.P., Marques, L.M.M., Crotti, A.E.M., Pilon, A.C., Bolzani,
562 V.S., Berretta, A.A., & Oliveira, A.R.M. (2017). In Vitro Metabolism of Artepillin C by
563 Rat and Human Liver Microsomes. *Planta Medica*, 83, 737-745.

564 Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for
565 LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
566 51, 2900-2911.

567 Clifford, M. N., Zheng, W., & Kuhnert, N. (2006). Profiling the chlorogenic acids of Aster by
568 HPLC-MSⁿ. *Phytochemical Analysis*, 17, 384-393.

569 Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids.
570 *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.

571 De Marco, S., Piccioni, M., Pagiotti, R., & Pietrella, D. (2017). Antibiofilm and antioxidant
572 activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-
573 Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 5163575. Doi:
574 10.1155/2017/5163575

575 Doganli, G.A. (2016). Phenolic content and antibiofilm activity of propolis against clinical
576 MSSA strains. *Records of Natural Products*, 10, 617-627.

577 Fernandes-Silva, C.C., Salatino, A., Salatino, M.L.F., Breyer, E.D.H., & Negri, G. (2013).
578 Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Química Nova*, 36, 237-240.

579 Fidalgo, L.M., Ramos, I.S., Parra, M.G., Cuesta-Rubio, O., Hernandez, I.M., Fernandez, M.C.,
580 Piccinelli, A.L., & Rastrelli, L. (2011). Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania
581 amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Natural Product Communications*, 6, 973-976.

582 Gardana, C., & Simonetti, P. (2011). Evaluation of allergens in propolis by ultra-performance
583 liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass
584 Spectrometry*, 25, 1675-1682.

585 Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., & Simonetti, P. (2007). Analysis of the polyphenolic
586 fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass
587 spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 390-399.

588 Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R.A., Quinn, R.J. (2015). The re-emergence of natural products for
589 drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 111-129.

590 Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening
591 flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the
592 Science Food and Agriculture*, 92, 2326-2331.

593 Machado, B.A., Silva, R.P., Barreto Gde, A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandão, H.N., Rocha,
594 J.L., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Umsza-Guez, M.A., & Padilha, F.F. (2016).
595 Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical
596 extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different
597 geographic regions in Brazil. *Plos One*, *11*, e0145954. doi: 10.1371/journal.pone.0145954.

598 Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P.,
599 Valente, P.H., & Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with
600 pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*, 105-112.

601 Messerli, S.M., Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Yanagihara, M., Tatefuji, T., Hashimoto, K.,
602 Mautner, V., Uto, Y., Hori, H., Kumazawa, S. (2009). Artepillin C (ARC) in Brazilian green
603 propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF
604 tumors in mice. *Phytotherapy Research*, *23*, 423-427.

605 Muzny, C.A., & Schwebke, J.R. (2013). The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis*
606 infection and challenges to management. *Sexually Transmitted Infections*, *89*, 423-425.

607 Nagatani, Y., Warashina, T., & Noro, T. (2001). Studies on the constituents from the aerial part
608 of *Baccharis dracunculifolia* DC. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *49*, 1388-1394.

609 Paulino, N., Abreu, S.R.L., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M.,
610 Vollmar, A.M., Scremin, A., Bretz, W.A. (2008). Anti-inflammatory effects of a
611 bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of*
612 *Pharmacology*, *587*, 296-301.

613 Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., & Rastrelli,
614 L. (2011). Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by
615 high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray
616 ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*,
617 6484-6491.

618 Piccinelli, A.L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R.P., &
619 Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of algerian propolis.
620 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 5080-5088.

621 Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., & Marcucci, M.C. (2011). Analytical methods applied to
622 diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, *5*, 27.

623 Silva, D.B., Okano, L.T., Lopes, N.P., & Oliveira, D.C.R. (2013). Flavanone glycosides from
624 *Bidens gardneri* Bak. (Asteraceae). *Phytochemistry*, *96*, 418-422.

625 Tazawa, S., Warashina, T., & Noro, T. (1999). Studies on the constituents of Brazilian propolis.
626 II. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 47, 1388-1392.

627 Tiveron, A.P., Rosalen, P.L., Franchin, M., Lacerda, R.C.C., Bueno-Silva, B., Benso, B.,
628 Denny, C., Ikegaki, M., Alencar, S.M. (2016). Chemical characterization and antioxidant,
629 antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south brazilian organic propolis. *PLoS*
630 *One*, 11, e0165588. doi:10.1371/journal.pone.0165588

631 Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., & Park, Y.K. (2013). Recent progress of propolis for
632 its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based*
633 *Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 0-13. doi: 10.1155/2013/697390

634 Trentin, D. S., Giordani, R. B., Zimmer, K. R., da Silva, A. G., da Silva, M. V., Correia, M. T,
635 Baumvol, I.J., & Macedo, A. J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian
636 semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm
637 lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 327-335.

638 Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., Rocha
639 Pasin, F., & Tsvetkova, I. (2006). Bioactive constituents of Brazilian red propolis.
640 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3, 249-254.

641 Veiga, R.S., De Mendonca, S., Mendes, P.B., Paulino, N., Mimica, M.J., Lagareiro Netto, A.A.,
642 Lira, I.S., Lopez, B.G.-C., Negrao, V., & Marcucci, M.C. (2017) Artepillin C and phenolic
643 compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and
644 *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 911-920.

645 Veloz, J.J., Saavedra, N., Lillo, A., Alvear, M., Barrientos, L., & Salazar, L.A. (2015).
646 Antibiofilm activity of Chilean propolis on *Streptococcus mutans* is influenced by the year
647 of collection. *BioMed Research International*, 2015, 291351. Doi: 10.1155/2015/291351.

648 Vieira, P.B., Tasca, T., & Secor, W.E. (2017). Challenges and Persistent Questions in the
649 Treatment of Trichomoniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17, 1249-1265.

650 Wang, M., Lamers, R.J.A.N., Korthout, H.A.A.J., van Nesselrooij, J.H.J., Witkamp, R.F., Van
651 der Heijden, R., Voshol, P.J., Havekes, L.M., Verpoorte, R., van der Greef, J. (2005).
652 Metabolomics in the Context of Systems Biology: Bridging Traditional Chinese Medicine
653 and Molecular Pharmacology. *Phytotherapy Research*, 19, 173-182.

654 WHO. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted
655 infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and
656 Research, ISBN 978 92 4 150383 9

657 Wishart, D.S. (2016). Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision
658 medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 473-484.

659

660

661

662 **Cap of figures and Tables**

663 **Table 1.** Compounds identified from Brazilian brown propolis samples by LC-DAD-MS.

664 **Table 2.** Antioxidant capacity (DPPH), trophozoites viability (%) (*T. vaginalis*), minimal
665 bactericidal concentration for planktonic cells (MBC-P), minimal bactericidal concentration for
666 biofilm cells (MBC-B) and minimal biofilm eradication concentration (MBEC) against *S.*
667 *aureus* for the extracts (P-EtH₂O/MS, P-Et/MS, P-EtH₂O/MG, P-Et/MG, P-EtH₂O/PR and P-
668 Et/PR) and fractions (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Ac) from Brazilian brown
669 propolis (BBP).

670 **Figure 1.** LC-DAD profile at wavelength 230-350 nm of the extracts from Brazilian brown
671 propolis (BBP) and the fractions from P-Et/MS (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et)
672 with some chromatographic peaks marked and chemical structures of some compounds
673 identified from BBP.

674 **Figure 2.** The effects of BBP extracts (ethanolic: P-Et/PR, P-Et/MG, P-Et/MS and
675 hydroethanolic: P-EtH₂O/PR, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/MS) and fractions (P-Et/MS-DCM, P-
676 Et/MS-Ac, P-Et/MS-Et) at concentration 500 and 100 µg/mL on bacterial biofilm formation
677 and growth of *S. aureus* after 24h (a). Total biomass and viability of pre-formed *S. aureus*
678 biofilm treated with ethanolic extracts from Brazilian brown propolis P-Et/MS (b), P-Et/MG
679 (c), P-Et/PR (cd) and the fraction P-Et/MS-DCM (e). CLSM images demonstrating pre-formed
680 biofilms: treated with 2% DMSO (negative control) (f), treated with vancomycin (positive
681 control) (g), treated with 125 µg/mL of fraction P-Et/MS-DCM (h) and treated with 62.5 µg/mL
682 fraction P-Et/MS-DCM (i). (* p<0.05, Student's t-test).

683 **Figure 3.** Compounds identified in Brazilian brown propolis (red: prenylated phenylpropanoic
684 acids and blue: flavonoids) that correlated with antibiofilm (A-Biof) and anti-*Trichomonas* (A-
685 Trich) activities. (DPPH: antioxidant capacity). Blue and pink bars are metabolites that showed
686 negative and positive correlations with biological activities, respectively.

687 **Figure 4.** Ion intensity of chromatographic peaks relative to prenylated phenylpropanoic acid
688 derivatives from extracts (ethanolic: P-Et/MS, P-Et/MG, P-Et/PR; hydroethanolic: P-
689 EtH₂O/MS, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/PR) and fractions (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac, P-Et/MS-
690 Et) that correlated with biological activities.

691

Table 1. Compounds identified from Brazilian brown propolis samples by LC-DAD-MS.

Peak	RT	Compound	Class	UV (nm)	MF	Negative mode (<i>m/z</i>)		Positive mode
						[M-H] ⁻	MS/MS	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)
1	1.11	Di- <i>O</i> -hexoside	Sugar	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.112	-	-
2	1.13	Quinic acid	Carboxylic acid	-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0576	-	-
3	10.45	5- <i>O-E</i> -caffeoylquinic acid*	Chlorogenic acid	299, 325	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0872	191	355.1005
4	11.88	Dihydrocoumaric acid	Phenylpropanoic acid	278	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.056	-	-
5	13.41	Coumaric acid*	Phenylpropanoic acid	299, 309	C ₉ H ₈ O ₃	163.0401	-	165.0555
6	14.85	6,8-di- <i>C</i> -hexosyl apigenin	Flavone	270, 330	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1519	-	595.168 ¹
7	17.30	Unknown	-	284	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₄	519.1753	339, 309, 279, 267, 237, 209	521.1865
8	20.04	Aromadendrin	Flavanonol	290, 330sh	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0574	269, 259, 177	289.0716
9	20.07	3,4-di- <i>O-E</i> -caffeoylquinic acid	Chlorogenic acid	299, 325	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1206	335, 191, 179, 173, 161	517.135
10	20.65	3,5-di- <i>O-E</i> -caffeoylquinic acid	Chlorogenic acid	299, 325	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.1226	191, 179	517.1363
11	21.28	<i>O</i> -hexosyl-caffeoyl dihydrocaffeate	Phenylpropanoic acid	290, 322	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₂	505.1390	181, 179, 161	507.1487
12	21.54	<i>O</i> -hexosyl-caffeoyl dihydrocaffeate	Phenylpropanoic acid	290, 325	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₂	505.1398	181, 179, 161	507.1485
13	21.87	Propol	Prenylated phenylpropanoic acid	298	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	231.0674	187, 169, 159, 145	-
14	22.11	<i>O</i> -prenyl caffeate	Prenylated phenylpropanoic acid	298, 322	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	247.0997	179	-
15	22.22	4,5-di- <i>O-E</i> -caffeoylquinic acid	Chlorogenic acid	299, 325	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.12	191, 179, 173, 161	517.1356
16	22.36	<i>O-E</i> -coumaroyl-caffeoylquinic acid	Chlorogenic acid	299, 325	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₁	499.1209	191, 173, 163, 161	-

17	23.73	Caffeic acid derivative	Phenylpropanoic acid	299, 320	C ₂₀ H ₂₈ O ₇	379.1747	243	-
18	23.94	Caffeic acid derivative	Phenylpropanoic acid	299, 320	C ₂₀ H ₂₈ O ₇	379.1751	243	-
19	24.68	<i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>O</i> -methyl-dihydrocoumaroyl-cafate	Phenylpropanoic acid	299, 320	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₀	487.1607	179, 161	511.1602
20	25.07	<i>O</i> - <i>E</i> -coumaroyl-caffeoylquinic acid	Chlorogenic acid	299, 323	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₁	499.1274	191, 179, 173	501.1413
21	25.44	Prenylated coumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 313	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	245.0828	173, 157	247.0987
22	26.77	Unknown	-	290	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.1675	243	363.1818
23	27.15	Unknown	-	288	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.1675	243	363.1808
24	27.50	Unknown	-	290	C ₁₉ H ₂₈ O ₅	335.1874	231	337.2022
25	27.91	Naringenin	Flavanone	290, 330 ^{sh}	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.062	153	
26	28.12	Unknown	-	-	C ₂₀ H ₂₈ O ₆	363.1830	289	365.1942
27	28.23	Unknown	-	-	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	421.1900	-	445.1837
28	28.42	3,4,5-tri- <i>O</i> - <i>E</i> -caffeoylquinic acid	Chlorogenic acid	299, 325	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	677.1526	515, 353, 335, 191, 179, 173, 161	679.1666
29	28.45	Caffeic acid derivative	Phenylpropanoic acid	299, 325	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.1684	289, 179, 161	363.1802
30	28.98	Dihydrokaempferide	Flavanonol	291, 330 ^{sh}	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301.0728	283, 268, 255, 212, 176	303.0869
31	29.17	Unknown	-	-	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.1668	287, 243	363.1792
32	29.42	Unknown	-	-	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.1689	243	363.1818
33	29.53	kaempferol	Flavonol	265, 365	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0420	255, 217, 151	287.056
34	29.99	<i>O</i> -methyl quercetin	Flavonol	270, 355	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.0492	271, 255, 243, 166	317.0663
35	30.05	Diprenylated hydroxyl-caffeic acid	Prenylated phenylpropanoic acid	320	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331.1566	251, 239, 211, 199	333.1692
36	30.57	<i>O</i> -methyl luteolin	Flavone	268, 332	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0573	284, 255, 227	301.0692
37	30.99	Betuletol	Flavonol	270, 352	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.0692	299, 271, 165	331.0812

38	31.37	Prenylated caffeic acid	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 323	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	247.0981	203, 187	249.1111
39	31.80	Prenyl methylpropionyloxy coumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 316	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	301.1457	231	-
40	31.88	Prenyl caffeic acid derivative	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 318	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	273.1145	201, 146	275.1278
41	32.08	Diprenylated hydroxyl caffeic acid	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 320	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331.157	316, 205	333.1697
42	32.08	Unknown	-	280	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	259.0991	199, 171	
43	32.24	Drupanin	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 311	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	231.1032	218, 176	233.1175
44	32.79	Diterpene	Diterpene	-	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347.1886	273, 255, 177	349.2007
45	32.86	Dihydroconiferyl coumarate	Phenylpropanoic acid	295, 312	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	327.1250	216, 181, 169	329.1365
46	32.86	Unknown	-	315	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	333.173	315, 253, 230, 201	335.1868
47	32.97	Capillartemisin A	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 310	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	315.1619	297, 253, 241, 230	317.1757
48	33.03	Unknown	-	284	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	275.0927	187	-
49	33.11	Pinocembrin	Flavanone	285, 330 sh	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0664	213, 185, 171, 151	257.0824
50	33.15	<i>O</i> -methyl naringenin	Flavanone	288, 327sh	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	285.0776	243, 227, 196, 164, 151	287.0916
51	33.19	Hydroxyl diprenyl coumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	310	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	315.1617	253, 241, 230, 218, 199	317.1764
52	33.37	Dihydroconiferyl coumarate	Phenylpropanoic acid	295, 310	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	327.1252	163	-
53	33.51	Diprenylated hydroxyl caffeic acid	Prenylated phenylpropanoic acid	295, 320	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331.1561	316, 205	-
54	33.60	Diprenylated hydroxyl coumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	313	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	317.1758	273, 250, 232, 215, 159	319.1901
55	33.64	Unknown	-	290	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	389.1988	241, 223	391.2118
56	33.65	Hydroxyl diprenyl coumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	314	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	315.1618	297, 253, 241, 230, 218	317.1726

57	33.70	<i>O</i> -methyl kaempferol	Flavonol	265, 365	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0571	284, 255, 227, 163, 151	301.0724
58	34.04	Di- <i>O</i> -methyl quercetin	Flavonol	265, 358	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.0667	271, 225	331.0812
59	34.09	Di-prenylated coumaric acid (pyrane)	Prenylated phenylpropanoic acid	311	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	313.1458	269, 241, 232, 218, 199, 159	315.1595
60	34.30	di- <i>O</i> -methyl luteolin	Flavone	265, 340	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.0734	283, 255, 227, 211	315.0868
61	34.50	Dihydro-coumaroyloxy-methylethyl-benzofuranylpropenoic acid	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 313	C ₂₃ H ₂₂ O ₆	393.1364	247, 217, 185, 163	395.1503
62	34.58	Hydroxyl diprenyl coumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 320	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	315.1610	253, 230, 215, 190, 173	-
63	34.69	Benzyl coumarate	Phenylpropanoic acid	300, 315	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	253.0870	163	-
64	34.82	Unknown	-	287	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	269.0825	227, 165	271.0975
65	34.95	Unknown	-	290	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	313.145	269, 173, 156	315.1586
66	35.01	Dihydroxycinnamoyloxy-cinnamic acid	Phenylpropanoic acid	299, 313	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	295.0985	163	-
67	35.13	Prenylated coumarate	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 315	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	315.1612	253, 230, 201	317.1741
68	35.33	Unknown	-	-	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	389.1982	299, 255, 187	391.2117
69	35.34	Phenethyl coumarate	Phenylpropanoic acid	311	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	267.1039	163	-
70	35.38	Unknown	-	-	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347.1891	253, 201, 146	-
71	35.53	Di-prenyl <i>O</i> -methyl coumarate	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 320	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329.1774	299, 255, 187, 159	331.1904
72	36.43	Unknown	-	290, 320	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	281.1195	-	-
73	36.84	Diprenylated coumaric acid (artepillin C isomer)	Prenylated phenylpropanoic acid	308	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	299.165	255, 232, 199, 186	301.1798
74	36.96	Artepillin C*	Prenylated phenylpropanoic acid	299, 313	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	299.1636	255, 199	301.1818
75	38.20	Unknown	-	290	C ₃₉ H ₄₈ O ₈	643.3267	-	-
76	38.37	Unknown	-	290	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	405.2667	-	429.2619

77	38.56	Baccharin	Prenylated phenylpropanoic acid	280	C ₂₃ H ₂₄ O ₄	363.1615	319, 187	365.173
78	38.62	<i>O</i> -cinnamoyl di-prenylcoumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	298, 313	C ₂₈ H ₃₂ O ₅	447.2195	297, 253, 230, 197	449.2332
79	38.80	<i>O</i> -cinnamoyl di-prenylcoumaric acid	Prenylated phenylpropanoic acid	276, 314	C ₂₈ H ₃₂ O ₅	447.2191	297, 253, 230, 197	471.2152
80	39.08	Unknown	-	295, 315	C ₃₈ H ₄₆ O ₇	613.3204	467, 313, 269, 229	615.3333
81	39.38	Unknown	-	285	C ₃₈ H ₄₆ O ₈	629.3146	-	653.3089
82	40.42	Unknown	-	-	C ₂₂ H ₃₈ O ₁₀	461.2365	-	-
83	42.04	Diterpene	Diterpene	-	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	371.1884	353, 327, 313, 287, 371, 243	-
84	42.37	Caffeic acid derivative	Phenylpropanoic acid	299, 320	C ₃₈ H ₄₆ O ₇	613.319	333, 299, 281, 255, 211	637.3133
85	42.56	Unknown	-	284, 327sh	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	405.1732	387, 347, 333, 305, 277	-
86	42.69	Unknown	-	290, 375sh	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	385.2732	327, 235, 207	-

RT: retention time; MF: molecular formula; *confirmed by injection of authentic standard; ¹MS/MS (+): *m/z* 409, 391, 379, 355, 337, 325, 307

Table 2. Antioxidant capacity (DPPH), trophozoites viability (%) (*T. vaginalis*), minimal bactericidal concentration for planktonic cells (MBC-P), minimal bactericidal concentration for biofilm cells (MBC-B) and minimal biofilm eradication concentration (MBEC) against *S. aureus* for the extracts (P-EtH₂O/MS, P-Et/MS, P-EtH₂O/MG, P-Et/MG, P-EtH₂O/PR and P-Et/PR) and fractions (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et) from Brazilian brown propolis (BBP).

Sample	DPPH (IC ₅₀ , µg/mL)*	Trophozoites viability (%)#		MBC-P (µg/mL)	MBC-B (µg/mL)	MBEC (µg/mL)
		500 µg/mL**	100 µg/mL***			
P-EtH ₂ O/PR	1.89 ± 0.16	96.22 ± 3.29	-	-	-	-
P-Et/PR	2.53 ± 0.18	51.11 ±4.68	-	500	> 500	> 500
P-EtH ₂ O/MG	2.81 ± 0.22	9.73 ±1.64	-	-	-	-
P-Et/MG	3.19 ± 0.27	0.62 ±0.43	-	250	> 500	> 500
P-EtH ₂ O/MS	1.72 ± 0.14	92.89 ±6.71	-	-	-	-
P-Et/MS	3.35 ± 0.24	0.00 ±0.00	-	250	> 500	> 500
P-Et/MS-DCM	3.80 ± 0.29	0.00 ±0.00	103.05 ±3.00	125	125	> 500
P-Et/MS-Ac	3.72 ± 0.31	0.00 ±0.00	94.74 ±3.81	-	-	-
P-Et/MS-Et	2.32 ± 0.19	83.93 ±2.20	95.01 ±4.10	-	-	-
Control (neg)	-	100 ± 0.0	100 ± 0.0	-	-	-
Vancomycin	-	-	-	2	> 2	> 2

Conc.: concentration evaluated; *quercetin of IC₅₀ 0.80 µg/mL; **vehicle (DMSO): 94.67±3.53; **vehicle (DMSO): 101.94 ± 1.73; #positive control: metronidazole (trophozoites viability = 0%)

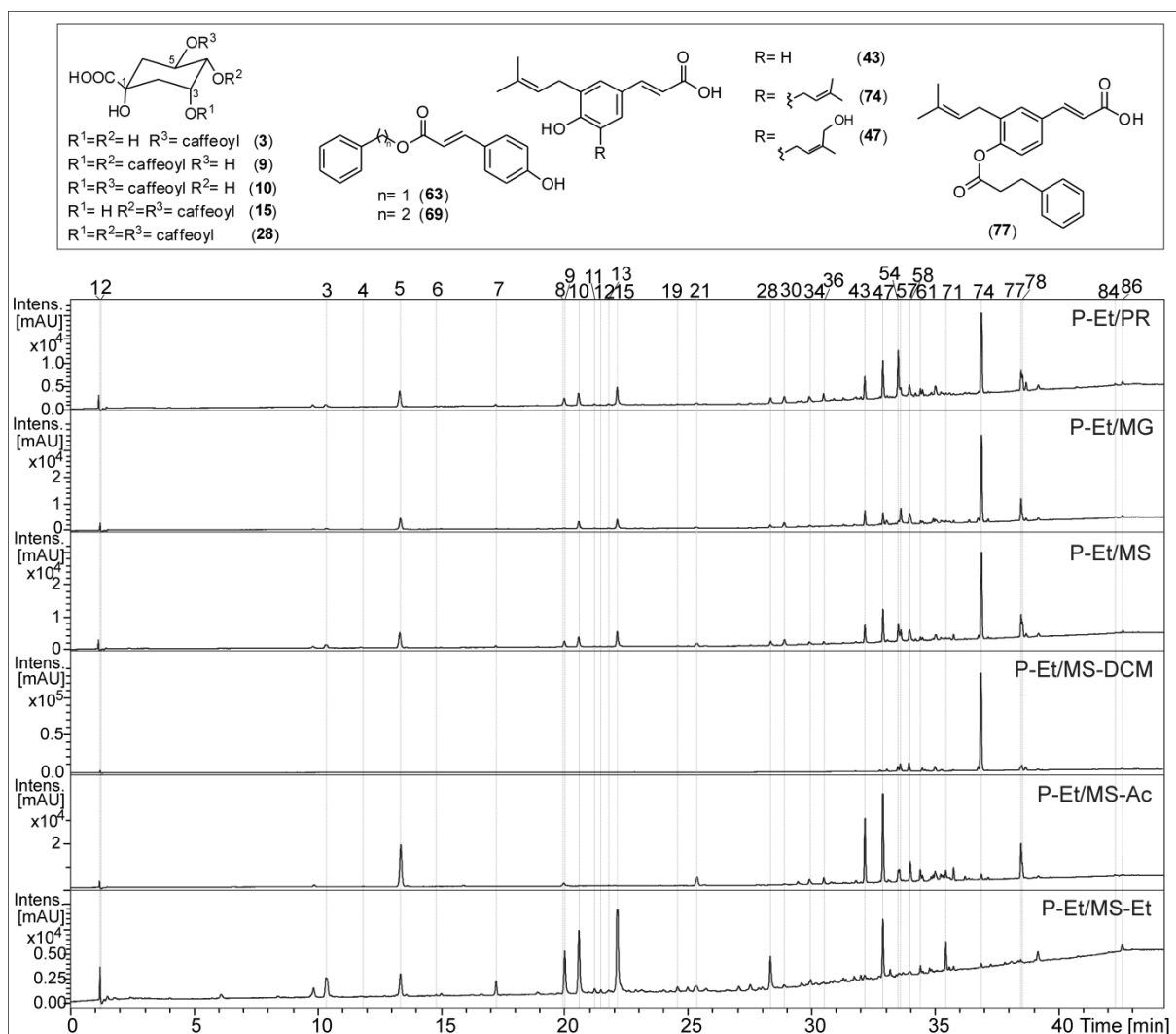


Figure 1. LC-DAD profile at wavelength 230-350 nm of the extracts from Brazilian brown propolis (BBP) and the fractions from P-Et/MS (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et) with some chromatographic peaks marked and chemical structures of some compounds identified from BBP.

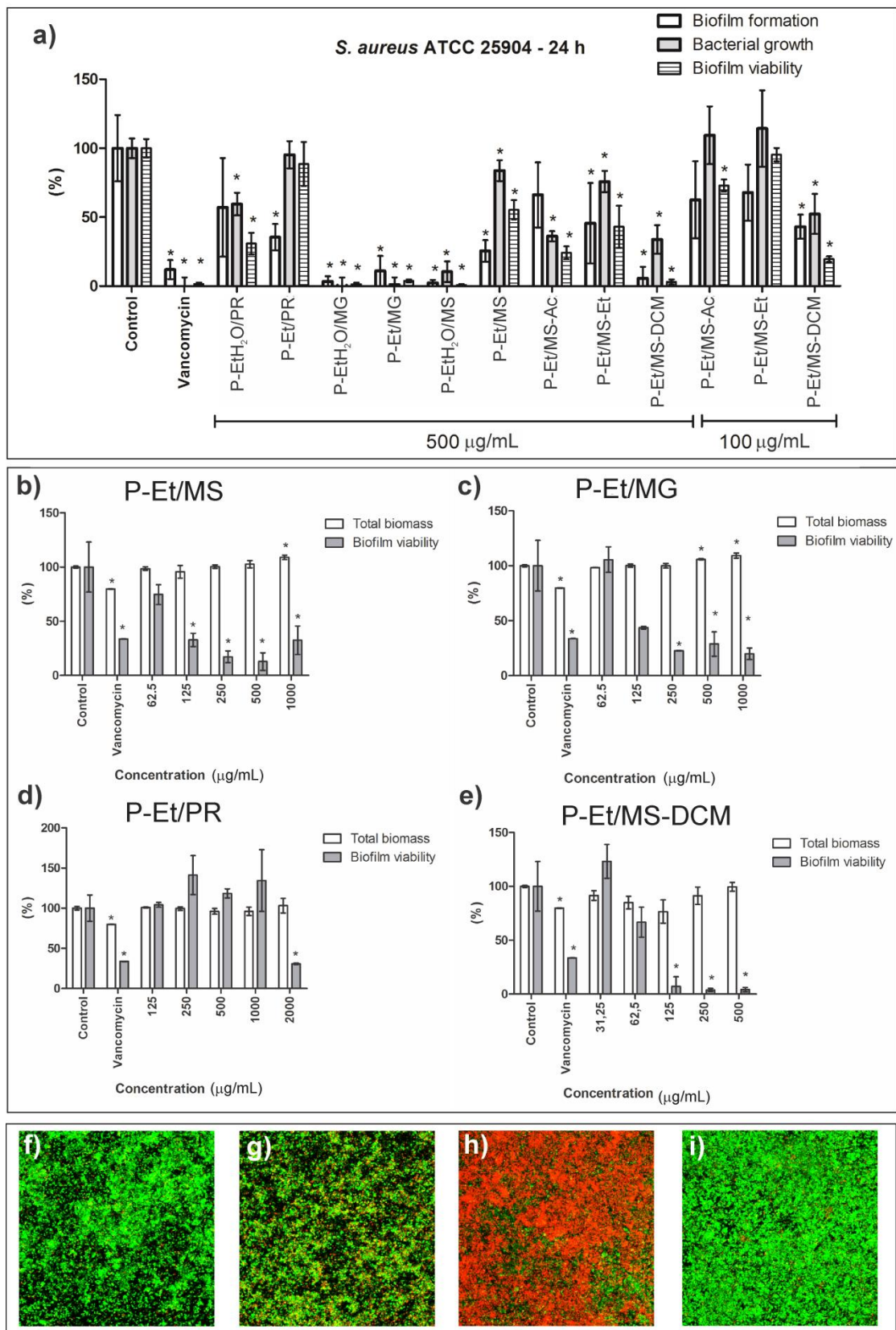


Figure 2. The effects of BBP extracts (ethanolic: P-Et/PR, P-Et/MG, P-Et/MS and hydroethanolic: P-EtH₂O/PR, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/MS) and fractions (P-Et/MS-DCM, P-

Et/MS-Ac, P-Et/MS-Et) at concentration 500 and 100 µg/mL on bacterial biofilm formation and growth of *S. aureus* after 24h (**a**). Total biomass and viability of pre-formed *S. aureus* biofilm treated with ethanolic extracts from Brazilian brown propolis P-Et/MS (**b**), P-Et/MG (**c**), P-Et/PR (**cd**) and the fraction P-Et/MS-DCM (**e**). CLSM images demonstrating pre-formed biofilms: treated with 2% DMSO (negative control) (**f**), treated with vancomycin (positive control) (**g**), treated with 125 µg/mL of fraction P-Et/MS-DCM (**h**) and treated with 62.5 µg/mL fraction P-Et/MS-DCM (**i**). (* $p < 0.05$, Student's t-test).

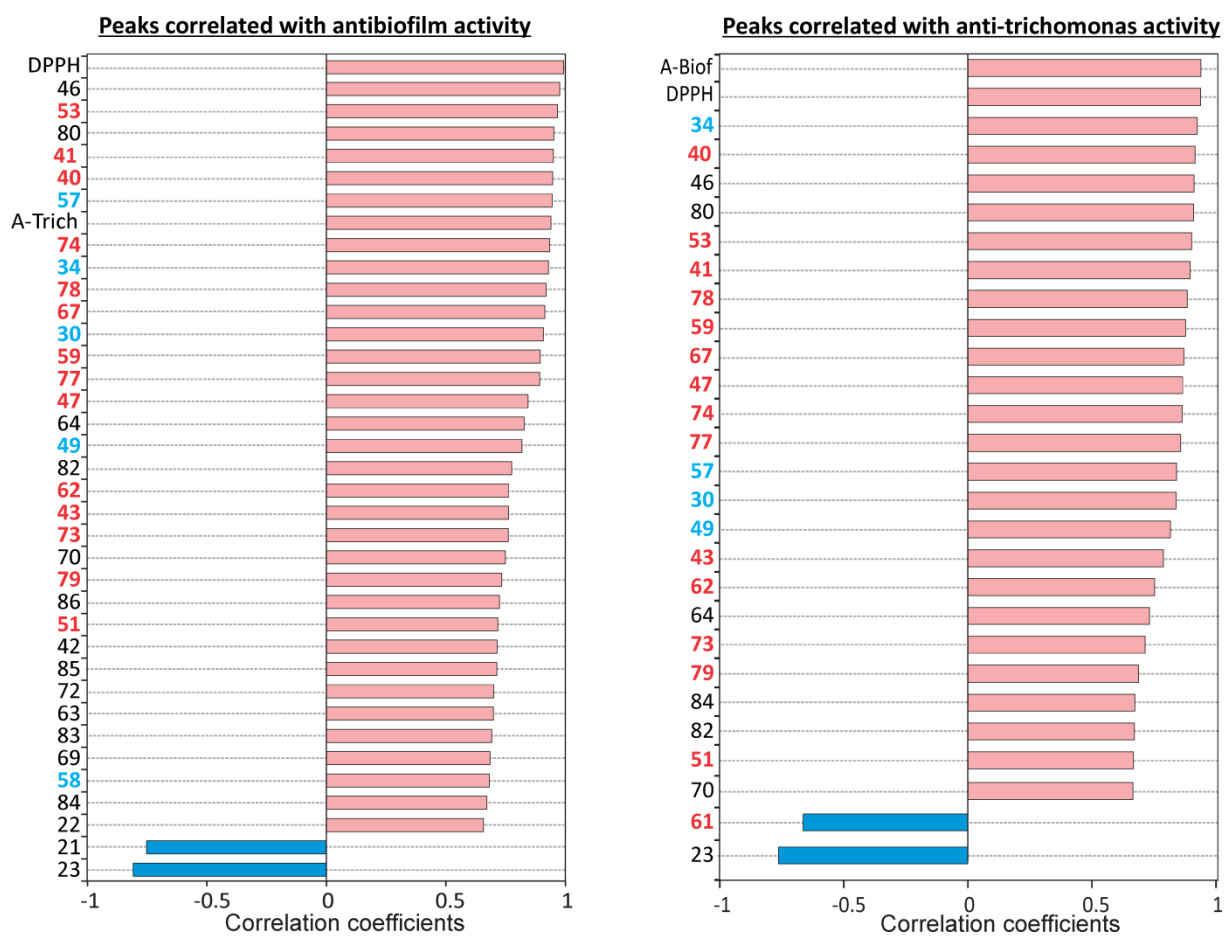


Figure 3. Compounds identified in Brazilian brown propolis (red: prenylated phenylpropanoic acids and blue: flavonoids) that correlated with antibiofilm (A-Biof) and anti-*Trichomonas* (A-Trich) activities. (DPPH: antioxidant capacity). Blue and pink bars are metabolites that showed negative and positive correlations with biological activities, respectively.

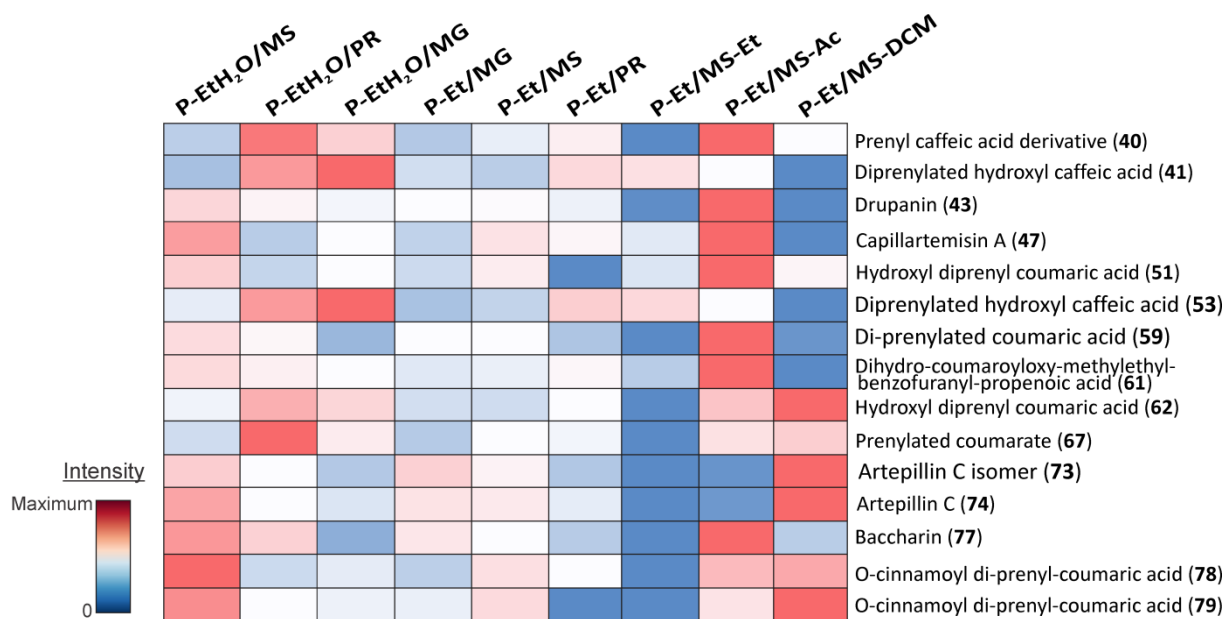


Figure 4. Ion intensity of chromatographic peaks relative to prenylated phenylpropanoic acid derivatives from extracts (ethanolic: P-Et/MS, P-Et/MG, P-Et/PR; hydroethanolic: P-EtH₂O/MS, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/PR) and fractions (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac, P-Et/MS-Et) that correlated with biological activities.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*

Djaceli Sampaio de Oliveira Dembogurski¹, Danielle da Silva Trentin^{2,3}, Graziela Vargas Rigo⁴, Rodrigo Campos², Tiana Tasca⁴, Alexandre José Macedo², Carlos Alexandre Carollo¹, Denise Brentan Silva^{1*}

¹*Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil.*

²*Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana (LaBDiM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brazil.*

³*Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre (RS), Brazil*

⁴*Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

*Corresponding author. Tel.: +55 67 33457366. E-mail address: denise.brentan@ufms.br

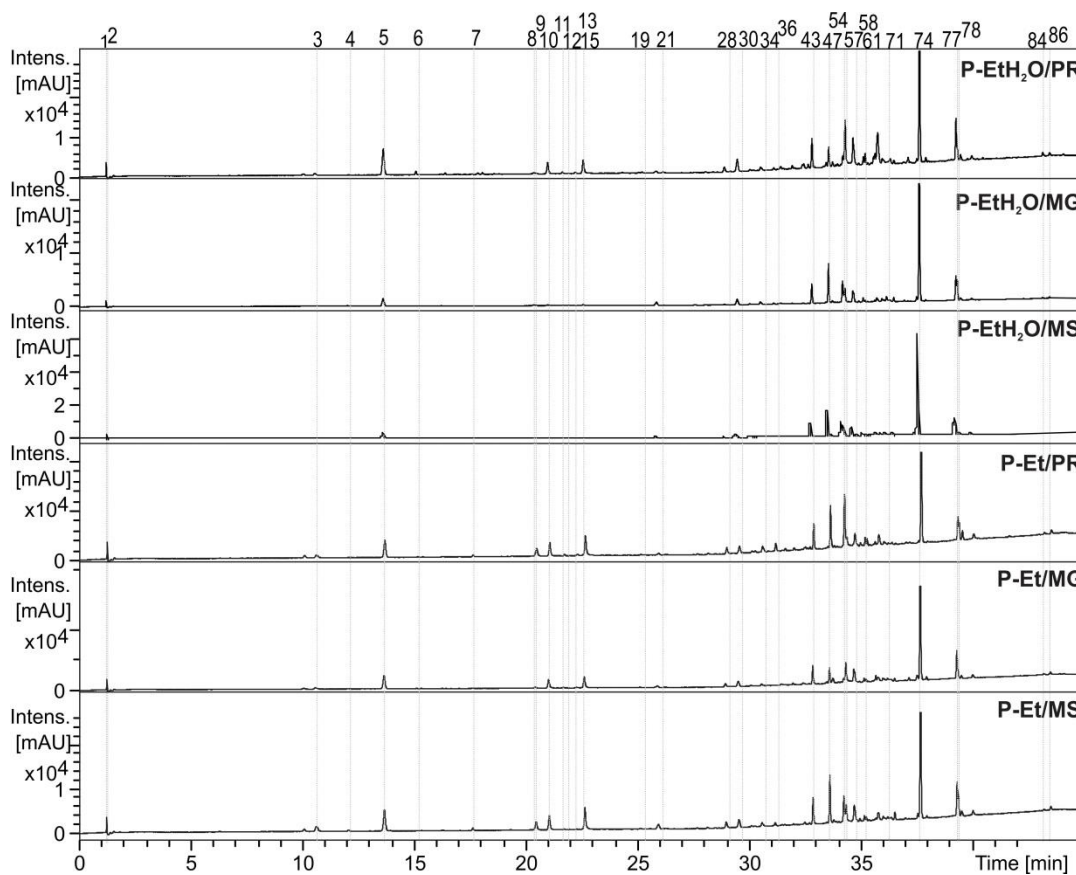


Figure S1. Chromatograms at the wavelength 230-350 nm of the hydroethanolic (P-EtH₂O/MS, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/PR) and ethanolic extracts (P-Et/MS, P-Et/MG, P-Et/PR).

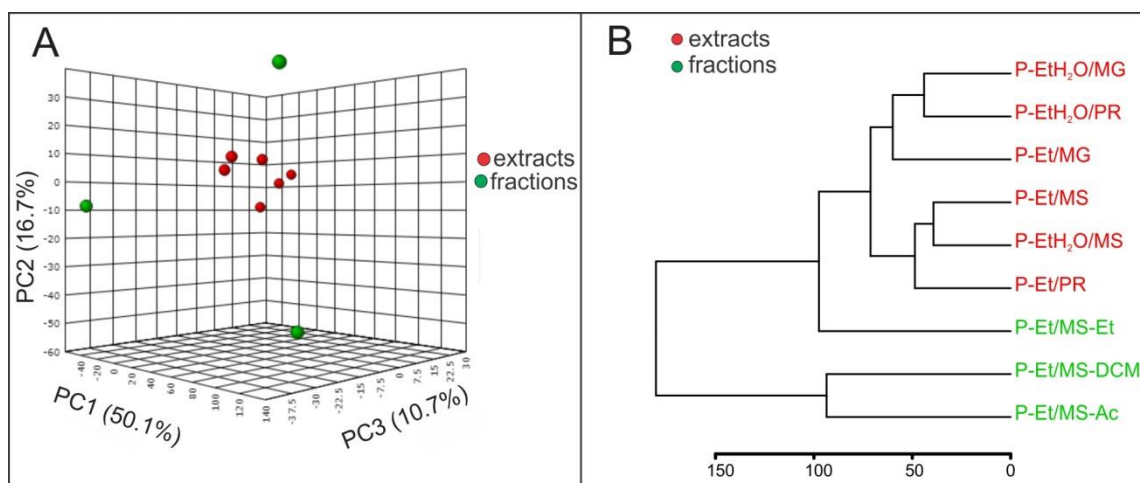


Figure S2. Principal component analysis (PCA) (A) and dendrogram resulting from hierarchal cluster (ward method) (B) of the extracts and fractions from Brazilian brown propolis.

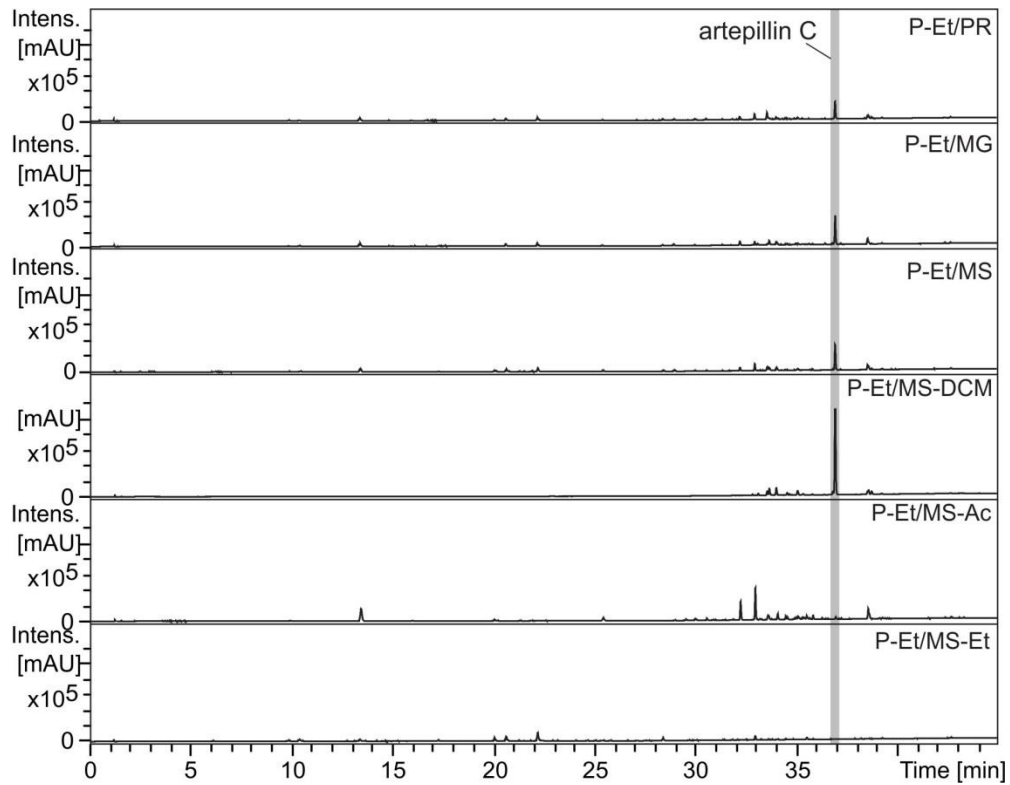


Figure S3. LC-DAD profile at wavelength 230-350 nm (at the same scale) of the extracts from Brazilian brown propolis (BBP) and the fractions (P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et) from P-Et/MS at concentrations of 1 mg/mL.

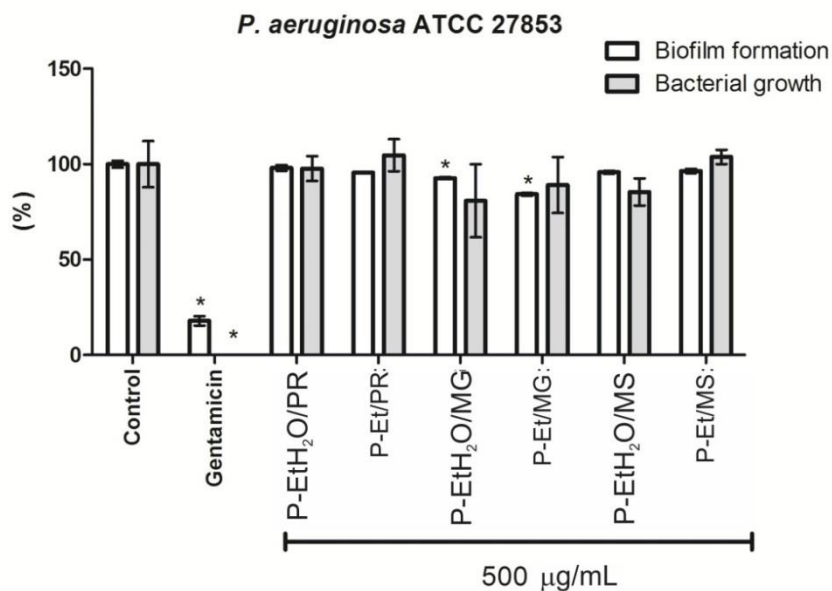


Figure S4. The effects of BBP extracts (ethanolic: P-Et/PR, P-Et/MG, P-Et/MS and hydroethanolic: P-EtH₂O/PR, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/MS) at concentration 500 µg/mL

on bacterial biofilm formation and growth in *Pseudomonas aeruginosa*. (* $p < 0.05$, Student's t-test).

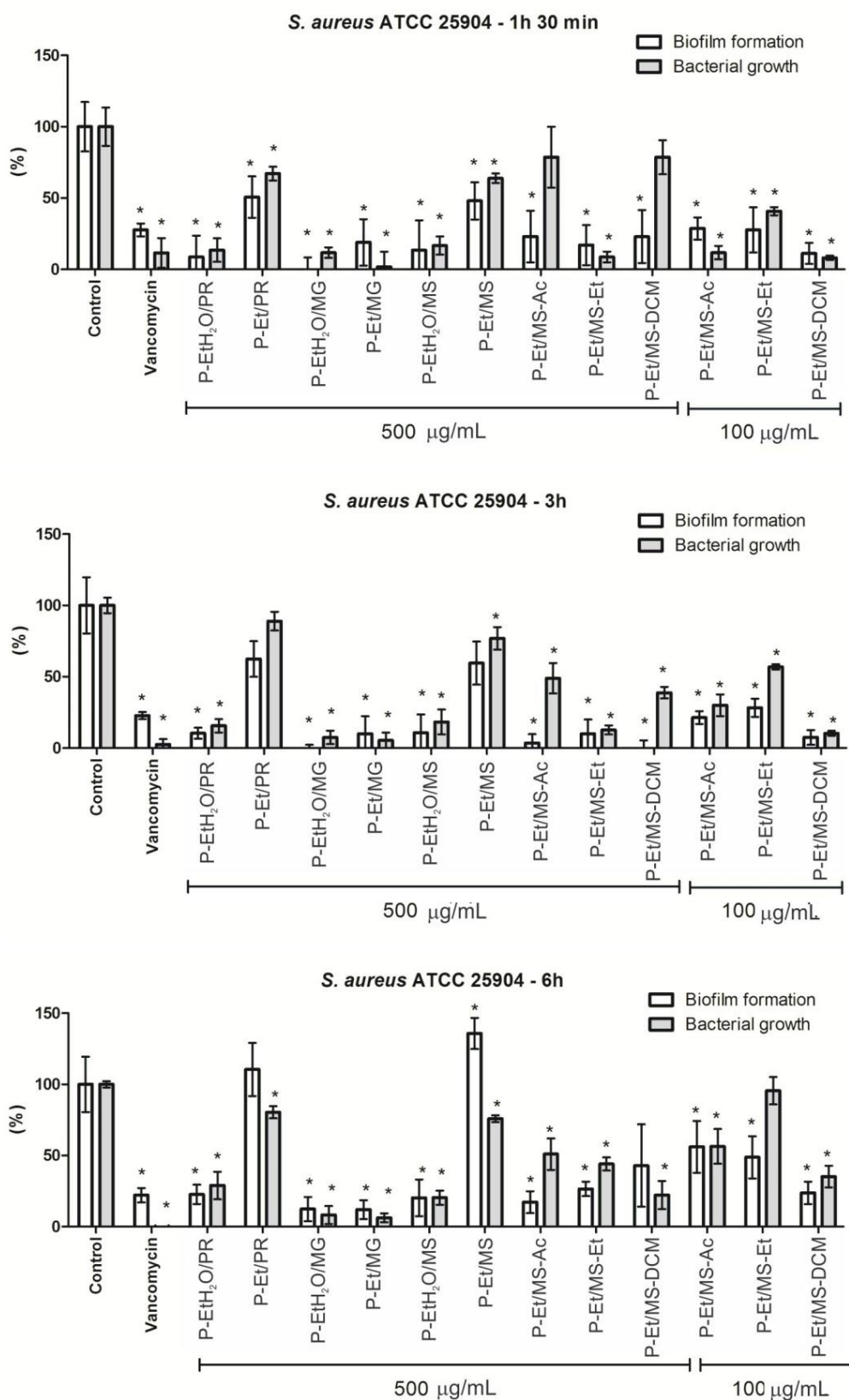


Figure S5. The effects of BBP extracts (ethanolic: P-Et/PR, P-Et/MG, P-Et/MS and hydroethanolic: P-EtH₂O/PR, P-EtH₂O/MG, P-EtH₂O/MS) and fractions (P-Et/MS-

DCM, P-Et/MS-Ac, P-Et/MS-Et) at concentration 500 and 100 $\mu\text{g/mL}$ on bacterial biofilm formation and growth of *S. aureus* after 1.5, 3 and 6h. (* $p < 0.05$, Student's t-test).

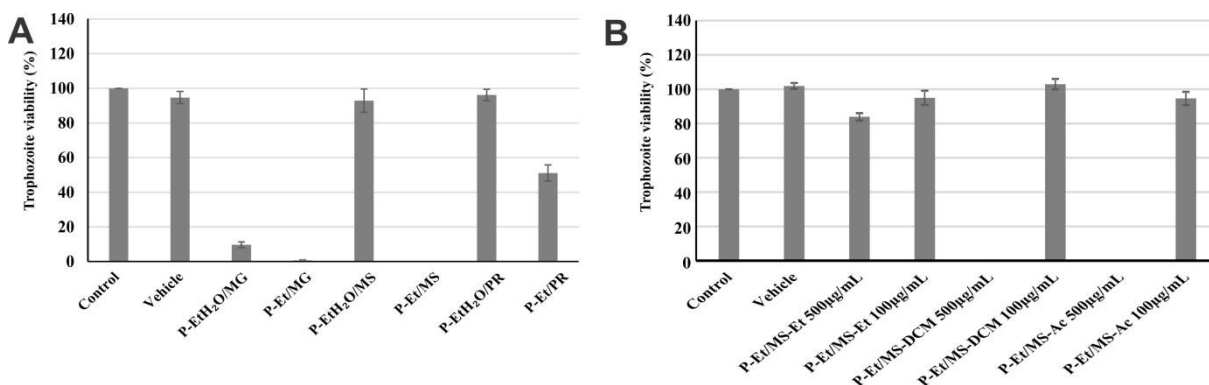


Figure S6. Activity against *Trichomonas vaginalis* of the hydroethanolic (P-EtH₂O/MS, P-EtH₂O/MG and P-EtH₂O/PR) and ethanolic (P-Et/MS, P-Et/MG and P-Et/PR) extracts at 500 $\mu\text{g/mL}$ (A) and fractions P-Et/MS-DCM, P-Et/MS-Ac and P-Et/MS-Et at 500 and 100 $\mu\text{g/mL}$ (B) from Brazilian brown propolis. (Control: non treated trophozoites; Vehicle: 0.6% DMSO). Metronidazole (100 μM) was used as positive control representing 0% of trophozoites viability). Mean \pm SD of three different experiments (parasite suspensions) was performed in triplicate (bars).

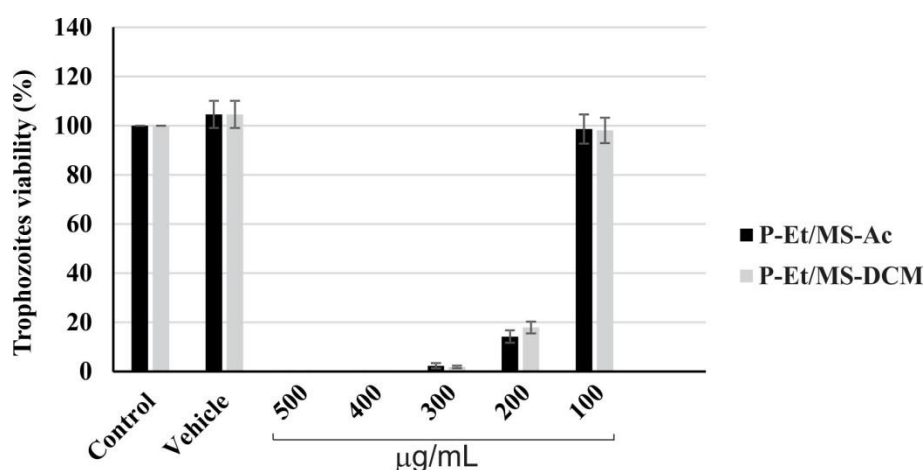


Figure S7. MIC determination of the fractions P-Et/MS-DCM and P-Et/MS-Ac against *Trichomonas vaginalis*. (Control: trophozoites non treated; Vehicle: added 0.6% of DMSO. Metronidazole (100 μM) was used as positive control representing 0% of

trophozoites viability). Mean \pm SD of three different experiments (parasite suspensions) was performed in triplicate (bars).