

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
PRÓPOLIS DAS ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona orbignyi* E
Tetragonisca fiebrigi (HYMENOPTERA, APIDAE)**

Jaqueline Ferreira Campos

Dourados – MS
Janeiro – 2016

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Jaqueline Ferreira Campos

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
PRÓPOLIS DAS ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona orbignyi* E
Tetragonisca fiebrigi (HYMENOPTERA, APIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Entomologia e Conservação da Biodiversidade. Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Dourados – MS
Janeiro – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C186c	Campos, Jaqueline Ferreira. Composição química e atividades biológicas da própolis das abelhas sem ferrão <i>Melipona orbignyi</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (HYMENOPTERA, APIDAE). / Jaqueline Ferreira Campos. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 79f. Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos. Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Bioprospecção. 2. Estresse oxidativo. 3. Enzima hialuronidase. 4. Necrose. 5. <i>Caenorhabditis elegans</i>. I. Título. CDD – 638.1
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

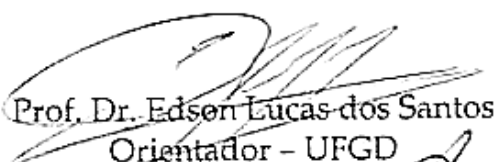
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

**“COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS
DAS ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona orbignyi* E *Tetragonisca fiebrigi*
(HYMENOPTERA, APIDAE)”**

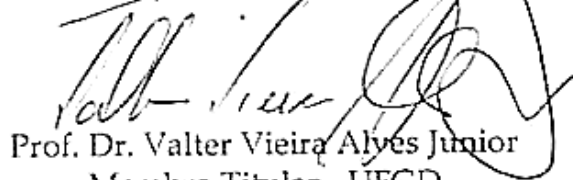
Por

JAQUELINE FERREIRA CAMPOS

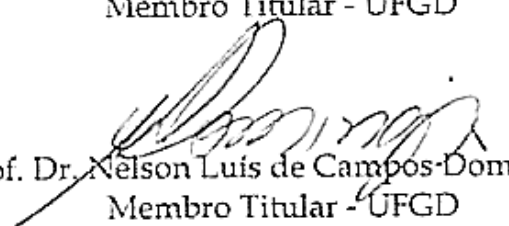
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos
Orientador - UFGD



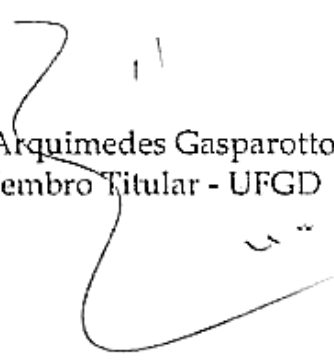
Prof. Dr. Valter Vieira Alves Junior
Membro Titular - UFGD



Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues
Membro Titular - UFGD



Profa. Dra. Silvia Aparecida Oesterreich
Membro Titular - UFGD



Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior
Membro Titular - UFGD

Aprovada em: 21 de janeiro de 2016.

Biografia do Acadêmico

Jaqueline Ferreira Campos, nascida em Dourados, Mato Grosso do Sul, em 03 de setembro de 1988, filha de Ivo Campos da Silva e Eunice Ferreira Carnaúba da Silva.

Cursou o ensino fundamental nas Escolas Municipais Franklin Luiz Azambuja e Loide Bonfim de Andrade e ensino médio na Escola Estadual Antônia da Silveira Capilé.

Realizou o curso de Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado e mestrado no Programa de Pós Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, na Faculdade de Ciências Biológica e Ambientais na Universidade Federal da Grande Dourados.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste estudo:

A Deus, meu porto seguro, por atender às minhas preces e cuidar de mim;

À minha família, em especial minha mãe Eunice Ferreira Carnauba da Silva, meu pai Ivo Campos da Silva e meu irmão Bruno Ferreira Campos, por me proporcionar esta família tão maravilhosa, que sempre me incentivou nos estudos e nos meus projetos de vida. Minha base sólida, alicerçada no amor;

Ao meu marido Elieu Damacena do Amaral, pelo companheirismo, incentivo, amor e por me apoiar em todos os obstáculos durante estes anos de estudos;

Ào meu orientador Edson Lucas dos Santos, pela confiança, pelos ensinamentos durante os anos de mestrado e doutorado, por proporcionar as condições para que este estudo fosse realizado;

À professora Kely de Picoli Souza pelo imenso conhecimento transmitido e por ser um exemplo de mulher e profissional;

Ao professor José Benedito Perrella Balestieri (Zézo), por fornecer as amostras de própolis;

À professora da UEMS Claudia Andrea Lima Cardoso pela realização de parte dos ensaios sobre composição química dos extratos de própolis;

Ao professor da UNIFESP Marcelo Mori por disponibilizar seu laboratório e possibilitar meu aprendizado com o modelo animal *Caenorhabditis elegans*;

Ao professor da UNIFESP Edgar Julian Paredes-Gamero por proporcionar a realização dos ensaios citotóxicos em seu laboratório;

À professora de Portugal Leticia Miranda Estevinho pela realização de parte do ensaio anti-inflamatório;

Aos membros do GEBBAM (Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo): Laura, Débora, Uilson, Thaliny, Janielle, Kátia, Priscilla, Márcio, Tamaeh, David, Jéssica, Laiandra, Cintia, Helder, Natasha, Bruna, Bianca, Alex, Rafael, Stefany, Aline e Daniel, pelo companheirismo, ajuda durante os experimentos, risadas e ensinamentos durante o ciclo de seminários do grupo. Agradeço em especial a Paola dos Santos da Rocha, que sem perceber nos tornamos grandes amigas e juntas aprendemos muito mais... Obrigada por tudo!

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade e aos professores, por proporcionarem a realização deste doutorado; Em especial ao secretário Marcelo Cardoso, pela ajuda e paciência nas questões burocráticas;

Aos colegas da turma de doutorado - 2012, em especial à Rosália Azambuja, amiga para todas as horas;

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) Lívia, Renata, Fabiana, Lucimara, Juliana, Tatiane, Marcus e Ediane pela atenção e auxílio durante os experimentos e estágio de docência. Alguns já eram amigos antes do doutorado e outros se tornaram durante;

À Universidade Federal da Grande Dourados, local onde realizei minha graduação, mestrado e agora o doutorado;

A todos os meus amigos, por não me deixarem esquecer a importância de se cultivar boas conversas acompanhadas de boas risadas;

Ao povo brasileiro, pelo financiamento dos meus estudos e da bolsa do projeto de pesquisa, representado pelas instituições Fundect, Capes e CNPq.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em avaliar minha tese e colaborar para melhoria da mesma.

Muito obrigada!!!

**Dedico esta tese à minha irmã Angela Ferreira
Campos, que ainda criança se tornou nosso
anjo da guarda!**

“Onde quer que eu vá...

Levo você, no olhar”

Lista de siglas e abreviaturas

A₀ – Absorbância do controle

A₁ – Absorbância da amostra

AAPH – 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride

ABL – Oncogene Abelson

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

A. mellifera – *Apis mellifera*

BCR – Gene breakpoint cluster region

BHT – butylated hydroxytoluene

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CAT – Catalase

C. elegans – *Caenorhabditis elegans*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CO₂ – Dióxido de carbono

DL₅₀ – Dose letal para 50 % dos indivíduos

EAG – Equivalente ao ácido gálico

E. coli – *Escherichia coli*

EEP – Extrato etanólico de própolis

EEP-M – Extrato etanólico de própolis de *M. orbigny*

EEP-T – Extrato etanólico de própolis de *T. fiebrigi*

EPM – Erro padrão da média

EQ – Equivalente à quercetina

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

g – Grama

GC-MS – Cromatografia gasosa-espectrometria de massa

GPx – Glutathione peroxidase

H – Átomo de hidrogênio

HOCl – Ácido hipocloroso

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HO₂[•] – Radical hidroperoxila

IC₅₀ – Concentração necessária para inibir 50 % dos radicais livres

Kg – Quilograma

K562 – Linhagem celular eritroleucêmica

LMC – Leucemia mieloide crônica

M – Molar

MDA – Malondialdeído

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

M. orbignyi – *Melipona orbignyi*

NaCl – Cloreto de sódio

NGM – Ágar Nematode Growth Medium

NO – Óxido nítrico

NO₂[•] – Dióxido de nitrogênio

nm – Nanômetros

nM – Nanomolar

O₂^{•-} – Radical ânion superóxido

[•]OH – Radical hidroxila

ONOO[•] – Peroxinitrito

PI – Iodeto de propídeo

RO₂• – Radical peroxila

RO• – Radical alcoxila

Rpm – Rotação por minuto

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SFB – Soro fetal bovino

SOD – Superóxido dismutase

T. angustula angustula – *Tetragonisca angustula angustula*

TBA – Ácido tiobarbitúrico

T. fiebrigi – *Tetragonisca fiebrigi*

µg – Micrograma

α – Alfa

β – Beta

Sumário

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS DAS ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona orbignyi* E *Tetragonisca fiebrigi* (HYMENOPTERA, APIDAE)

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
1. Introdução.....	2
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. Própolis.....	5
2.2. Composição química da própolis.....	6
2.3. Própolis das abelhas sem ferrão.....	8
2.4. <i>Melipona orbignyi</i>	10
2.5. <i>Tetragonisca fiebrigi</i>	11
2.6. Potencial terapêutico dos produtos apícolas.....	12
2.6.1. Potencial antioxidante.....	12
2.6.1.1. Radicais livres.....	12
2.6.1.2. Danos ao DNA.....	14
2.6.1.3. Danos a proteínas.....	14
2.6.1.4. Peroxidação lipídica.....	15
2.6.1.5. Antioxidantes endógenos: enzimáticos e não- enzimáticos.....	16
2.6.1.6. Antioxidantes exógenos naturais.....	17
2.6.2. Anti-inflamatório.....	19
2.6.2.1. Inflamação.....	19

2.6.2.2. Enzima hialuronidase e ácido hialurônico.....	21
2.6.3. Citotoxicidade.....	22
2.6.3.1. Câncer.....	22
2.6.3.2. Leucemia.....	23
2.6.3.3. Morte celular.....	24
2.6.4. Toxicidade.....	26
3. Objetivos.....	29
4. Material e métodos.....	31
4.1. Coleta e preparo dos extratos etanólicos de própolis (EEP).....	31
4.2. Determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides.....	31
4.3. Análise química.....	32
4.4. Atividade antioxidante.....	33
4.4.1. Ensaio de captura do radical ABTS.....	33
4.4.2. Inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos.....	34
4.4.2.1. Preparo de suspensão de eritrócitos.....	34
4.4.2.2. Atividade hemolítica e inibição de hemólise oxidativa.....	34
4.4.2.3. Dosagem de malondialdeído (MDA).....	35
4.5. Atividade anti-inflamatória: inibição da enzima hialuronidase.....	36
4.6. Atividade citotóxica e perfil de morte celular.....	37
4.7. Toxicidade <i>in vivo</i>	37
4.7.1. Criação e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
4.7.2. Avaliação de toxicidade.....	38
4.8. Análises estatísticas.....	38
5. Resultados.....	40

5.1. Composição química.....	40
5.2. Atividade antioxidante.....	42
5.2.1. Ensaio de captura do radical ABTS.....	42
5.2.2. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa.....	43
5.2.3. Dosagem de malondialdeído.....	43
5.3. Atividade anti-inflamatória	46
5.4. Atividade citotóxica e perfil de morte celular.....	47
5.5. Toxicidade <i>in vivo</i>	50
6. Discussão.....	52
7. Conclusões.....	57
Referências.....	59
Anexos.....	79

Resumo

Própolis de abelhas sem ferrão são conhecidas por suas propriedades biológicas; no entanto, poucos são os estudos descritos na literatura que demonstram estes efeitos. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a composição química e atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e toxicidade da própolis das abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* e *Tetragonisca fiebrigi*, encontradas no Mato Grosso do Sul, Brasil. Para isto, as composições químicas dos extratos etanólico de própolis de *M. orbignyi* (EEP-M) e *T. fiebrigi* (EEP-T) foram determinadas por GC-MS e ensaios colorimétricos. Foram identificados compostos fenólicos, álcoois e terpenos como principais classes de compostos, para ambos os extratos. Na avaliação do potencial antioxidante, os extratos de própolis atuaram na captura do radical livre ABTS e inibiram a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos incubados com agente oxidante. Os potenciais anti-inflamatórios dos EEP foram confirmados pela inibição da enzima hialuronidase. Para ambos os extratos, as atividades citotóxicas foram concentração dependente contra células eritroleucêmica K562, com predominância de morte por necrose. A ação tóxica dos extratos foi avaliada no modelo animal *Caenorhabditis elegans*, sendo que o EEP-T não apresentou toxicidade, mas EEP-M induziu a efeitos tóxicos, no modelo e concentrações avaliadas. Estes resultados indicam que a própolis de *M. orbignyi* e *T. fiebrigi* apresentam importantes atividades terapêuticas, sugerindo sua potencial aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia.

Palavras-chave: bioprospecção, estresse oxidativo, enzima hialuronidase, necrose, *Caenorhabditis elegans*

Abstract

Propolis from stingless bees are known for their biologic properties; however, there are few studies described in the literature that demonstrate these effects. Therefore, this study aimed to investigate the chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and toxicity activities of propolis from the stingless bee *Melipona orbignyi* and *Tetragonisca fiebrigi*, found in Mato Grosso do Sul, Brazil. For this, the chemical compositions of the ethanol extract of propolis from *M. orbignyi* (EEP-M) and *T. fiebrigi* (EEP-T) were determined by GC-MS and colorimetric assays. Was identified the presence of phenolic compounds, alcohol, and terpenes as its major class compounds. In evaluation the antioxidant potential, the propolis extracts acted in ABTS free radical scavenging and inhibiting lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with an oxidizing agent. The anti-inflammatory potentials of the EEP were confirmed by inhibition of the hyaluronidase enzyme, for both extracts. The cytotoxic activities were concentration-dependent against K562 erythroleukemia cells, with a predominance of death by necrosis. The toxic action of extracts was evaluated in animal model *Caenorhabditis elegans*, being that the EEP-T showed no toxicity, but EEP-M induced toxic effects, in the model and concentrations evaluated. These results show that propolis from *M. orbignyi* and *T. fiebrigi* has important therapeutic activities, suggesting its potential application in the pharmaceutical and/or food industry.

Keywords: bioprospecting, oxidative stress, hyaluronidase enzyme, necrosis, *Caenorhabditis elegans*

Introdução

1. Introdução

Própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas, resultante da adição de suas secreções mandibulares ao exsudado coletado em materiais vegetais (Bankova *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005). Esta resina é utilizada na construção e manutenção do ninho, além de manter a assepsia no interior do mesmo (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

Há registros que civilizações antigas, como incas, gregos, egípcios e romanos, utilizavam a própolis por suas propriedades terapêuticas, sendo descrita como antisséptica, cicatrizante e antipirética (Sforcin e Bankova, 2011). Adicionalmente, este produto natural tem sido utilizado no preparo de bebidas e alimentos para a nutrição humana, visando a melhoria da saúde e prevenção de doenças (Umthong *et al.*, 2009).

Estudos recentes ampliaram os conhecimentos sobre as aplicações terapêuticas da própolis a partir de diferentes espécies de abelhas sem ferrão, descrevendo suas propriedades antimicrobiana (Farnesi *et al.*, 2009; Choudhari *et al.*, 2012), antioxidante (Sawaya *et al.*, 2009), anti-inflamatória (Massaro *et al.*, 2011) e antitumoral (Umthong *et al.*, 2009; Choudhari *et al.*, 2013).

As propriedades medicinais que a própolis apresenta são diretamente relacionadas à sua composição química. Estudos realizados com a própolis de abelhas sem ferrão descrevem a presença de ácidos fenólicos, ácidos aromáticos, terpenos e carboidratos (Velikova *et al.*, 2000; Miorin *et al.*, 2003). A espécie de abelha e a fonte botânica onde elas coletam a resina estão entre os fatores responsáveis pelas características físicas, químicas e biológicas da própolis (Umthong *et al.*, 2009; Sawaya *et al.*, 2009).

No Brasil há mais de 200 espécies de abelhas sem ferrão descritas (Velikova *et al.*, 2000), mas os estudos sobre estas espécies e seus produtos ainda são escassos. Dentre estas estão *Melipona orbignyi* (Guérin, 1844) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938), que apesar de produzirem própolis muito apreciada popularmente, são poucos os relatos científicos que comprovam as propriedades terapêuticas atribuídas a resina destas espécies. A literatura apenas descreve alguns aspectos comportamentais de *M. orbignyi* (Brizola-Bonacina *et al.*, 2009) e as propriedades antibacteriana e antioxidante do mel produzido por *T. fiebrigi* (Vit *et al.*, 2009; Sgariglia *et al.*, 2010).

Portanto, este estudo descreve pela primeira vez a composição química e propriedades antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica da própolis das abelhas sem ferrão *M. orbignyi* e *T. fiebrigi*.

Revisão bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1. Própolis

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas a partir de materiais vegetais, como exsudatos de folhas, caule e flores, sendo adicionadas cera e enzimas salivares à sua composição (Teixeira *et al.*, 2005; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Este material é utilizado pelas abelhas para proteger a colmeia contra fatores físicos e biológicos. Sua finalidade explica a etimologia da palavra própolis, do grego *pro* “em frente de; em defesa” e *polis* “comunidade ou cidade” (Castaldo e Capasso, 2002).

As abelhas depositam esta resina na entrada do ninho e em rachaduras externas, para impedir a invasão por outros organismos; nas paredes do interior da colmeia, para manter a temperatura interna adequada; no local de postura dos ovos, para manter a assepsia; além de ser utilizada para embalsamar organismos mortos no interior do ninho, evitando a proliferação de micro-organismos (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

Há séculos o homem identificou a importância deste produto para as abelhas e correlacionou sua utilização em prol da saúde humana. Os egípcios o utilizavam por suas propriedades antiputrefativas para embalsamar os mortos; gregos e romanos utilizavam como agente antisséptico e cicatrizante; os incas usavam como antipirético e no século 17 a própolis foi listada como droga oficial na farmacopeia de Londres (Sforcin e Bankova, 2011, Toreti *et al.*, 2013).

Durante a Segunda Guerra Mundial (1939–1945), a própolis foi amplamente utilizada como cicatrizante, sendo prescrita pelos médicos aos soldados feridos (Lotfy, 2006). Este produto natural ganhou popularidade na

Europa entre os séculos 17 e 20, sendo aceito na medicina humana e veterinária em 1969 na União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (USSR), em várias aplicações, incluindo o tratamento da tuberculose (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Somente em 1985, no Japão, que a própolis foi considerada um produto promissor na farmacologia (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Atualmente, a população japonesa se destaca como apreciadora dos benefícios promovidos pelo uso deste apiterápico, inclusive sendo uma das maiores importadoras deste material produzido no Brasil (Toreti *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas houve um aumento expressivo nas publicações científicas referente as propriedades biológicas da própolis. Já foram descritas suas propriedades antimicrobianas (Miorin *et al.*, 2003; Choudhari *et al.*, 2012), antiviral (Kujumgiev *et al.*, 1999), antioxidante (Valente *et al.*, 2011; Kalogeropoulos *et al.*, 2009), antitumoral (Watanabe *et al.*, 2011; Franchi Jr. *et al.*, 2012), anti-inflamatória (Massaro *et al.*, 2011), antidiabética (Zhu *et al.*, 2011), dentre outras.

2.2. Composição química da própolis

O amplo espectro de atividades biológicas apresentado pela própolis está correlacionado à sua composição química, que varia de acordo com a vegetação local, sazonalidade e espécie de abelha que produz este material (Umthong *et al.*, 2009; Sawaya *et al.*, 2009).

Este conjunto de variáveis resulta em uma grande diversidade de tipos de própolis. Em geral, este material é composto por aproximadamente 50 % de resina, 30 % de cera, 10 % de óleos essenciais, 5 % de pólen e 5 % de outras substâncias, incluindo minerais e substâncias orgânicas como compostos

fenólicos, terpenos, aldeídos aromáticos, álcoois e ácidos graxos (Barlak *et al.*, 2011).

No Brasil, já foram descritos 13 tipos de própolis, encontradas nas regiões sul, sudeste e nordeste, que variam de acordo com a composição química e coloração, como amarelo, marrom claro, marrom escuro, marrom avermelhado, verde e vermelho (Park *et al.*, 2002; Toreti *et al.*, 2013). As mais conhecidas são a própolis verde, típica da região sudeste do Brasil, oriunda predominantemente da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (Salatino *et al.*, 2005) e vermelha, encontrada na região nordeste, produzida a partir de *Dalbergia ecastaphyllum* (Alencar *et al.*, 2007), ambas produzidas pela espécie de abelha *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758).

A própolis verde apresenta em sua composição química ácidos fenólicos, ácidos prenilados p-coumáricos, acetofenonas, ácidos diterpênicos, ácidos cafeolquínicos, kaempferide, isosakuranetina e kaempferol (Park *et al.*, 2002; Bankova, 2005). Já a própolis vermelha é composta por fenólicos simples, triterpenoides, isoflavonoides, benzofenonas e naftoquinonas (Trusheva *et al.*, 2006).

Outros tipos de própolis já foram descritos na literatura de acordo com a distribuição geográfica, como a própolis europeia (produzida predominantemente a partir da espécie vegetal *Populus nigra*), do Mediterrâneo, da Austrália, Ilhas Canárias e Venezuela (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Na Europa a própolis já foi descrita por apresentar compostos fenólicos em sua composição, sendo os flavonoides descritos como componente majoritário (Bankova *et al.*, 2000). Na Austrália, apesar da grande diversidade de fauna e flora, há poucos estudos que descrevem sobre a própolis produzida nesse país (Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Massaro *et al.*, 2015). Os principais constituintes

químicos já descritos são ácido gálico e ácidos diterpênicos, encontrados na própolis produzida pela abelha sem ferrão *Tetragonula carbonaria* (Massaro *et al.*, 2011).

2.3. Própolis das abelhas sem ferrão

Apesar da maioria dos estudos investigarem a composição química e propriedades biológicas da própolis de *A. mellifera*, espécie exótica no Brasil, outras espécies de abelhas também são produtoras desta resina, como as abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponíneos (Bankova e Popova, 2007), pertencentes à subfamília Meliponinae, da família Apidae, ordem Hymenoptera (Michener, 2007).

Nas regiões tropicais e subtropicais do mundo foram identificadas cerca de 600 espécies de meliponíneos (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006), aproximadamente 200 destas estão distribuídas no Brasil (Velikova *et al.*, 2000). Esta diversidade reflete na variabilidade morfológica e comportamental destes insetos.

Como apresentam o ferrão atrofiado, estas abelhas desenvolveram outros mecanismos de defesa, como a utilização da resina produzida a partir de materiais vegetais que é depositada na entrada do ninho, impedindo a invasão por outros insetos, como formigas e besouros (Nogueira-Neto, 1997). Além disso, esta resina também é depositada sobre o corpo do organismo invasor, que fica imobilizado devido a propriedade pegajosa deste material (Roubik, 2006).

Estudos sobre a própolis de meliponíneos descrevem a presença de ácidos fenólicos, ácidos aromáticos, flavonoides, terpenos e carboidratos (Velikova *et al.*, 2000; Miorin *et al.*, 2003; Popova e Bankova, 2007). Estes compostos provavelmente estão relacionados às atividades biológicas descritas para este produto natural.

Dentre as propriedades biológicas já descritas para a própolis de abelhas sem ferrão, a ação antimicrobiana se destaca como principal potencial, sendo descrita para a própolis das espécies *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836), *Scaptotrigona* sp. (Moure, 1942), *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), *Melipona scutellaris* (Latreille 1811), *Melipona marginata* (Lepeletier, 1836), *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836), *Plebeia remota* (Holmberg, 1903), *Plebeia droryana* (Frieese, 1900), *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) e *Lestrimellita* sp. (Frieese, 1903) (Velikova et al., 2000; Miorin et al., 2003; Farnesi et al., 2009).

Choudhari et al. (2012) descreveram que a própolis da abelha sem ferrão *Trigona* sp., encontrada na Índia, apresenta atividade contra bactérias gram-positiva, gram-negativa e fungos. A própolis proveniente da espécie *Tetragonula carbonaria*, endêmica da Austrália, foi descrita por apresentar ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, mas foi menos efetiva contra a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (Massaro et al., 2015).

A própolis das abelhas *Melipona compressipes* (Fabricius, 1804) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier, 1836), obtidas da região sul do Brasil, foram descritas por apresentar relevante ação contra a bactéria *S. aureus*, a levedura *Candida albicans* e o vírus da gripe aviária (Kujumgiev et al., 1999).

Estudos sobre a atividade antioxidante deste produto apícola ainda são escassos. Sawaya et al. (2009) relataram sobre a ação antiradicalar da própolis de três espécies do gênero *Scaptotrigona*, encontradas nas regiões sudeste e nordeste do Brasil. Em relação à ação anti-inflamatória da própolis de meliponíneos, somente Massaro et al. (2011) descreveram este potencial na própolis australiana de *T. carbonaria*.

Dentre as poucas investigações sobre as atividades biológicas da própolis de abelhas sem ferrão, está seu potencial citotóxico contra linhagens tumorais. Umthong *et al.* (2011) descreveram esta propriedade da própolis produzida pela espécie *Trigona laeviceps* (Smith, 1857), encontrada na Tailândia, como sendo efetiva contra cinco linhagens tumorais humanas: cólon (SW620), mama (BT474), hepática (Hep-G2), pulmonar (Chago) e gástrica (Kato-III).

2.4. *Melipona orbignyi*

Dentre os meliponíneos já descritos, a espécie *Melipona orbignyi* (Guérin, 1844), pertencente ao subgênero *Melipona*, é conhecida popularmente como mandurí-de-Mato-Grosso (Figura 1), e apresenta distribuição na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. No Brasil, esta espécie é restrita aos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Camargo e Pedro, 2008).

Esta espécie é produtora de mel, própolis e geoprópolis (resina vegetal enriquecida com barro e secreções mandibulares da abelha), assim como as demais espécies pertencentes ao gênero *Melipona* (Nogueira-Neto, 1997). Entretanto, não existem relatos científicos referentes às propriedades terapêuticas dos produtos naturais produzidos por esta espécie e somente alguns de seus aspectos comportamentais têm sido descritos (Brizola-Bonacina *et al.*, 2009).



Figura 1. Espécie de abelha sem ferrão *Melipona orbignyi* sobre a própolis. Fonte: Santos, E.L. (2013)

2.5. *Tetragonisca fiebrigi*

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão já descritas, a espécie *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz 1938), conhecida popularmente no Brasil como jataí ou abelhas-ouro (Figura 2 A e B), é encontrada em grande parte do território brasileiro, incluindo as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, bem como em outros países como Argentina, Bolívia e Paraguai (Oliveira *et al.*, 2004; Camargo e Pedro, 2013). Recentemente, a classificação taxonômica desta espécie tem sido revisada. Esta espécie foi previamente descrita como subespécie *Tetragonisca angustula fiebrigi*, juntamente com *T. angustula angustula*; entretanto, estudos com marcadores moleculares mostrou serem espécies distintas (Barth *et al.*, 2011; Stuchi *et al.*, 2012).

Entre as espécies de abelhas sem ferrão, *T. fiebrigi* é conhecida como boa produtora de mel e própolis, que são altamente apreciados na medicina popular por suas propriedades nutricionais ou terapêuticas. Apesar do uso popular destes produtos, somente as propriedades antibacteriana e antioxidante do mel produzido por esta espécie tem sido descritas na literatura (Vit *et al.*, 2009; Sgariglia *et al.*, 2010), e não há registros científicos sobre as propriedades terapêuticas atribuídas a própolis produzida por estas abelhas.

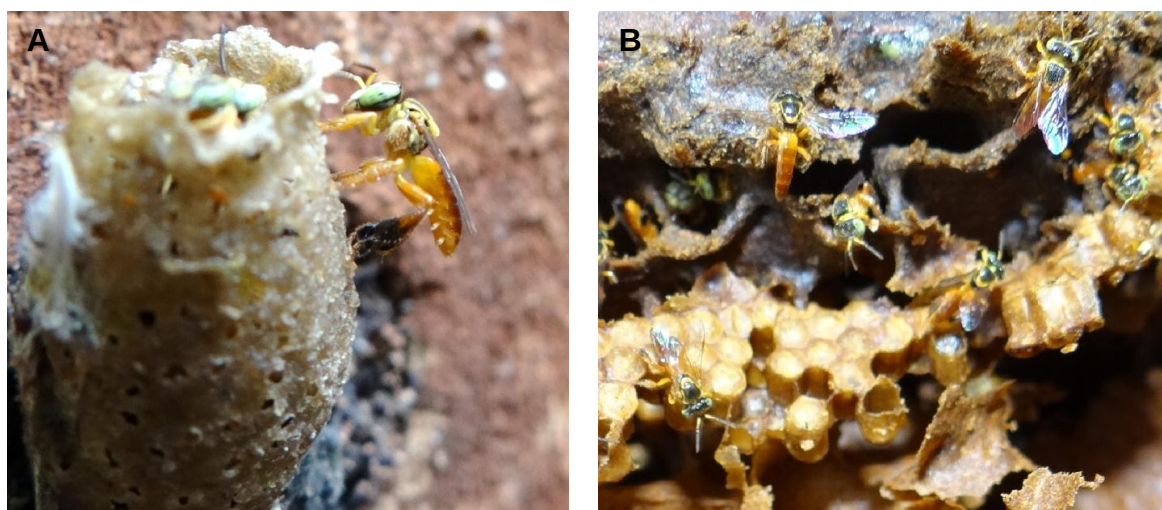


Figura 2. Espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*. **(A)** Entrada do ninho. **(B)** Abelhas no interior da colmeia. Fonte: Santos, E.L. (2014)

2.6. Potencial terapêutico dos produtos apícolas

Muitos medicamentos mundialmente conhecidos são derivados de produtos naturais. Entretanto, apesar da diversidade de fauna e flora encontrada no território brasileiro, ainda são escassos os estudos que investigam as propriedades químicas e potencial terapêutico de seus produtos naturais, como os produtos apícolas. Deste modo, é de extrema importância a realização de pesquisas sobre as propriedades terapêuticas como antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, além da avaliação da toxicidade destas substâncias.

2.6.1. Potencial antioxidante

Nas últimas décadas, os produtos conhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes ganharam muita popularidade, pois resultam em benefícios à saúde humana. Diversas doenças, como câncer, diabetes, aterosclerose, doenças inflamatórias, desordens neurológicas como Alzheimer, Parkinson e distrofia muscular, doenças cardiovasculares, além do envelhecimento precoce, estão relacionadas ao processo de estresse oxidativo (Sultan, 2014). Este processo é decorrente do desequilíbrio entre a produção excessiva de radicais livres e a neutralização destes pelos agentes antioxidantes (Fang *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007).

2.6.1.1. Radicais livres

Nosso organismo produz radicais livres constantemente, que são espécies químicas altamente reativas que possuem um elétron desemparelhado na órbita externa da molécula (Porth e Matfin, 2010). Este elétron não pareado é responsável pela alta instabilidade e reatividade dos radicais livres, resultando na

reação de forma inespecífica com moléculas vizinhas e consequentemente na formação de novos radicais livres (Lobo *et al.*, 2010).

Os radicais livres são gerados a partir de processos metabólicos comuns, em condições fisiológicas normais do organismo, como durante a respiração celular, fagocitose, inflamação, agregação plaquetária e angiogênese ou por agentes externos, como fumaça de cigarro, poluentes ambientais, radiação ultravioleta, pesticidas, solventes industriais, dentre outros (Sultan, 2014). Portanto, as espécies formadas como subprodutos do processo redox celular podem desempenhar tanto função benéfica quanto tóxica no organismo.

Durante o processo de respiração normal, o oxigênio molecular é reduzido nas mitocôndrias através da transferência de quatro elétrons para gerar duas moléculas de água (Valko *et al.*, 2006). Essa conversão é catalisada por enzimas oxidativas, sendo geradas pequenas quantidades de espécies intermediárias reativas, como $O_2^{\cdot-}$, $HO_2^{\cdot}$, H_2O_2 e íon $^{\cdot}OH$ (Ferreira e Matsubara, 1997). Tal reação é restritamente controlada pela enzima citocromo C oxidase, e somente uma pequena porcentagem de elétrons pode se perder no processo (Halliwell, 1994).

Dentre as espécies mais comumente formadas estão as espécies reativas de oxigênio (ERO): radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($^{\cdot}OH$), peroxila ($RO_2^{\cdot}$), alcóxila ($RO^{\cdot}$) e hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$); e espécies reativas de nitrogênio (ERN): óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) e dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot}$) (Fang *et al.*, 2002; Sultan, 2014). Estes podem ser convertidos em espécies reativas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) que embora não contenham um elétron desemparelhado, são altamente reativos (Ferreira e Matsubara, 1997).

O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz $^{\cdot}OH$, a espécie mais reativa nos sistemas biológicos, sendo

capaz de produzir danos nas moléculas de DNA (Valko *et al.*, 2006). O H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas lipídicas celulares, sendo altamente tóxico para as células (Halliwell, 1994).

Estes radicais, quando em excesso no organismo, podem atacar biomoléculas importantes ao funcionamento das células, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, acarretando em danos celulares e teciduais (Lobo *et al.*, 2010).

2.6.1.2. Danos ao DNA

O excesso de radicais livres no organismo é capaz de promover danos oxidativos no material genético, resultando nas primeiras etapas envolvidas na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (Frei, 1994; Valko *et al.*, 2007; Robbins e Cotran, 2010).

Dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical $\cdot OH$ é capaz de reagir com todas as moléculas do DNA, danificando as bases purínicas e pirimidínicas (Valko *et al.*, 2006). Este radical reage com o DNA ao ser adicionado às suas fitas duplas ou pode sequestrar átomos de hidrogênio a partir do grupo metil de timina e das ligações C-H da desoxirribose, resultando na quebra da cadeia de DNA (Cooke *et al.*, 2003).

Os danos gerados ao DNA podem estimular vias que estão associadas com a carcinogênese, como a parada ou indução da transcrição, indução da via de transdução de sinal, erro na replicação e instabilidade genômica (Valko *et al.*, 2006).

2.6.1.3. Danos a proteínas

As proteínas são um dos principais alvos dos danos gerados pelas ERO e ERN, pois são encontradas abundantemente nos sistemas biológicos e são

responsáveis por grande parte dos processos funcionais celulares (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Estas espécies reativas podem promover a oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos, induzir a formação de ligações cruzadas entre proteínas ou clivar ligações peptídicas (Robbins e Cotran, 2010).

O radical $\cdot\text{OH}$ pode inativar várias proteínas, ao oxidar grupos sulfidrilas ou ligação dissulfeto (Ferreira e Matsubara, 1997). Este radical pode sequestrar um átomo de hidrogênio da estrutura de polipeptídeos de proteínas, para formar um radical centrado no carbono, que em condições aeróbias, reage com O_2 para formar radicais $\text{RO}_2\cdot$ (Valko *et al.*, 2006).

Em geral, os danos gerados nas proteínas podem comprometer sua estrutura e conseqüentemente sua função. A modificação desta biomolécula pode resultar na inibição das atividades enzimáticas, aumento da susceptibilidade à agregação e proteólise (Xiao *et al.*, 2014) e alteração no transporte de proteínas através das membranas celulares (Valko *et al.*, 2006).

Como consequência destas alterações protéicas, outras biomoléculas são prejudicadas, como a inativação da DNA polimerase e enzimas reparadoras do DNA, o que contribuirá para o processo de envelhecimento precoce, mutagenicidade, além de diversas outras doenças (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

2.6.1.4. Peroxidação lipídica

Outro tipo de dano acarretado pelo excesso de ERO e ERN no organismo é a peroxidação lipídica. Este processo é decorrente do ataque de espécies reativas, geralmente $\cdot\text{OH}$, que captura um átomo de $\text{H}\cdot$ de um grupo metileno alílico, entre uma ligação dupla do ácido graxo poli-insaturado, resultando em um radical lipídico centrado em carbono, altamente reativo, caracterizando a etapa de iniciação (Frei, 1994; Biesalski e Grimm, 2007).

Este radical geralmente é estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, que pode reagir com o O_2 , formando o radical $RO_2^\bullet$, que por sua vez pode abstrair outro $H^\bullet$ da cadeia lateral de ácidos graxos poli-insaturados, propagando o processo oxidativo, sendo denominada etapa de propagação (Ferreira e Matsubara, 1997).

O radical $RO_2^\bullet$ também pode formar um peróxido cíclico, que se decompõe em seguida, formando uma série de produtos de degradação, como os aldeídos malondialdeído, 4-hidroxi-2-nonenal e 2-propenal (Dalle-Done *et al.*, 2006). Estes produtos apresentam fácil reatividade com várias biomoléculas, incluindo proteínas, DNA e fosfolipídios, gerando danos estruturais e funcionais, e consequentemente contribuindo para a patogênese de várias doenças (Frei, 1994; Turunen *et al.*, 2004). Tais aldeídos podem ser mensurados no plasma e urina como índice indireto de estresse oxidativo (Dalle-Done *et al.*, 2006).

Como resultado deste processo oxidativo, os lipídios presentes nas membranas plasmáticas e nas organelas sofrem mudanças físicas e químicas, alterando a fluidez e a permeabilidade celular, favorecendo a liberação do líquido intracelular, aumentando o risco de ruptura das membranas e, consequentemente, levando a morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997).

2.6.1.5. Antioxidantes endógenos: enzimáticos e não-enzimáticos

Os antioxidantes são moléculas naturais ou sintéticas que inibem a reação de espécies reativas com biomoléculas ou impedem a formação descontrolada destes radicais (Porth e Matfin, 2010).

Para inibir a ação danosa dos radicais livres no organismo, a própria célula desenvolve meios de se proteger, por meio da síntese de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre as enzimas que atuam na neutralização de

radicais livres estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) (Valko *et al.*, 2007).

A enzima SOD está presente em células aeróbicas e fluidos extracelulares e catalisa a dismutação do ânion $O_2^{\bullet}$ em O_2 e H_2O_2 (Frei, 1994). A enzima CAT está presente nos peroxissomos e atua na decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (Halliwell, 1994; Ferreira e Matsubara, 1997). A enzima GPx, pertencente ao sistema glutational, atua na quebra do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos, com a utilização de glutational como co-fator (Porth e Matfin, 2010).

Os mecanismos antioxidantes não enzimáticos envolvem a atuação da glutational, coenzima Q e do ácido úrico. A glutational é um tripeptídeo, que apresenta importantes funções nas células, como a ação antioxidante devido a presença do grupo tiol, além de ser um co-fator da família de enzimas GPx (Lobo *et al.*, 2010). A coenzima Q ou ubiquinona, é um lipídio que atua como antioxidante na cadeia respiratória mitocondrial, impede a peroxidação em membranas lipídicas ao inibir a formação de radicais $RO_2^{\bullet}$, além de atuar na regeneração da vitamina E, outro importante agente antioxidante (Turunen *et al.*, 2004; Deichmann *et al.*, 2010). Além destes, o ácido úrico, derivado do metabolismo das purinas, atua como potente inibidor da peroxidação lipídica (Ames *et al.*, 1981). Em condições fisiológicas no corpo humano o ácido úrico é dissociado a urato, que tem a capacidade de quelar metais de transição e impedir que radicais $RO_2^{\bullet}$ penetrem a membrana celular (Vasconcelos *et al.*, 2007).

2.6.1.6. Antioxidantes exógenos naturais

Além de produzir antioxidantes necessários para sua proteção, o organismo também pode utilizar compostos antioxidantes provenientes da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-

vitamina A), compostos fenólicos e alguns terpenos. Estas substâncias são amplamente encontradas em fontes vegetais.

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é um poderoso antioxidante que atua em ambientes aquosos no corpo, capturando ERO pela rápida transferência de elétrons, inibindo a peroxidação lipídica (Flora, 2009). Também atua na proteção contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, reduzindo a progressão da aterosclerose (Frei, 1994). Em sistemas biológicos, o ácido ascórbico se encontra na forma de ascorbato, que é a forma que age como antioxidante (Vasconcelos *et al.*, 2007). Apesar da ampla gama de benefícios, em altas concentrações o ácido ascórbico atua como pró-oxidante, levando à peroxidação lipídica (Halliwell, 1994; Ferreira e Matsubara, 1997).

O α -tocoferol, também conhecido como vitamina E, é o mais importante antioxidante de membranas e lipoproteínas, pois inibe a peroxidação lipídica ao capturar radicais $RO_2^{\bullet}$ (Frei, 1994). Durante este processo, o α -tocoferol doa um átomo de hidrogênio para estabilizar o radical $RO_2^{\bullet}$, deste modo ele interrompe a reação e é estabilizado por ressonância (Biesalki e Grimm, 2007). Adicionalmente, protege proteínas e DNA contra as espécies reativas (Fang *et al.*, 2002).

Carotenoides, como o β -caroteno, apresenta ação antioxidante ao reagir com o radical $RO_2^{\bullet}$ para formar um radical centrado em carbono, assim inibindo a propagação de ERO (Fang *et al.*, 2002).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, que possuem em sua estrutura pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupo hidroxila (Michalak, 2006; Carocho e Ferreira, 2013). Estes compostos desempenham poderosa atividade antioxidante, e quanto maior o número de hidroxilas livres na molécula, maior este potencial (Kurek-Górecka *et al.*, 2014). Após atuarem na captura do radical livre, os compostos fenólicos conseguem se

estabilizar devido a propriedade de ressonância do anel aromático, o que permite reter o elétron desemparelhado sem promover danos às estruturas das células (Dai e Mumper, 2010).

Dentre os principais grupos de compostos fenólicos estão os ácidos fenólicos, taninos, ligninas e flavonoides (Carocho e Ferreira, 2013). Os flavonoides compõem o maior grupo dos compostos fenólicos, totalizando aproximadamente 6.500 compostos (Biesalki e Grimm, 2007), e se destaca como importante inibidor de radicais RO_2^* , devido sua capacidade de doar átomo de hidrogênio, que está associada com a presença do anel B dihidroxilado (Valko *et al.*, 2006).

2.6.2. Anti-inflamatório

2.6.2.1. Inflamação

Ao se deparar com agentes nocivos como infecções microbianas, necrose tecidual ou corpos estranhos, nosso organismo ativa diferentes mecanismos para combater estes agentes. Esta resposta protetora é denominada inflamação, que pode ser aguda ou crônica, dependendo do tipo de estímulo e da efetividade da reação inicial em eliminar o agente responsável pelo dano (Robbins e Cotran, 2010).

A inflamação aguda inicia rapidamente e apresenta curta duração, podendo levar poucos minutos a alguns dias (Porth e Matfin, 2010). Tem como finalidade direcionar leucócitos e proteínas do plasma, como anticorpos, até o local lesionado ou que contém agentes invasores (Robbins e Cotran, 2010). Durante este processo, ocorre um aumento no fluxo sanguíneo, decorrente de alterações no calibre vascular (Montenegro e Franco, 2004). Em seguida, ocorre a emigração

dos leucócitos da microcirculação, sendo direcionados ao foco da injúria, onde é ativado para eliminar o agente nocivo (Filho, 2013). Quando este processo é bem sucedido na eliminação deste agente, a reação é cessada. Porém, se a resposta falha em neutralizar o agente invasor, a reação progride para uma inflamação crônica, que pode suceder a inflamação aguda ou ser intensa no início do controle do dano (Robbins e Cotran, 2010).

A inflamação crônica geralmente é de longa duração e está associada ao recrutamento de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual (Montenegro e Franco, 2004). O processo inflamatório é finalizado quando o agente agressor é eliminado, consequentemente os leucócitos são dissipados e os mecanismos anti-inflamatórios são ativados, sendo responsáveis pelo controle deste processo, além de prevenir o dano excessivo gerado ao organismo hospedeiro (Dinarelli, 2010).

O processo inflamatório é descrito por possuir cinco sinais cardinais, que são vermelhidão (rubor), inchaço ou edema (tumor), calor, dor e perda da função (Montenegro e Franco, 2004; Porth e Matfin, 2010). Este último sinal é decorrente da ação prejudicial da inflamação ao organismo, onde, em alguns casos, os tecidos normais podem ser lesionados. Quando a inflamação é inapropriadamente direcionada contra os tecidos normais ou não é adequadamente controlada, ela se torna responsável por processos que resultam em diversas doenças (Filho, 2013).

As reações inflamatórias podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças crônicas comuns, como artrite reumatoide, aterosclerose, fibrose pulmonar, reações alérgicas, diabetes tipo 2, desordens degenerativas e câncer (Dinarelli, 2010).

Deste modo, medicamentos anti-inflamatórios são utilizados para controlar os danos promovidos pela ação do processo inflamatório, como os glicocorticoides

e anti-inflamatórios não esteroidais (Dinarello, 2010; Filho, 2013). Apesar dos benefícios promovidos por estes fármacos, em geral, estes apresentam importantes efeitos colaterais, como complicações gastroduodenais e cardiovasculares (Coutinho *et al.*, 2009). Desta maneira, é necessária a busca por novas moléculas, que apresentem eficiência ao inibir a inflamação e demonstrem efeitos colaterais mínimos.

2.6.2.2. Enzima hialuronidase e ácido hialurônico

Uma das enzimas envolvidas no processo inflamatório é a hialuronidase, que degrada substratos como o ácido hialurônico, e está envolvida na permeabilidade vascular (El-Safory *et al.*, 2010). Portanto, substâncias que promovam a inibição da atividade desta enzima pode indicar seu efeito anti-inflamatório (Zeng *et al.*, 2015), como já foi evidenciado em diversos estudos com produtos naturais (Bralley *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012; Bazylo *et al.*, 2013).

As hialuronidases são classes de glicosidases amplamente distribuídas no reino animal (Girish e Kemparaju, 2007). Dentre as funções desempenhadas por estas enzimas, está a degradação do ácido hialurônico, também conhecido como hialuronan ou hialuronato, além da decomposição de condroitina e sulfatos de condroitina (Schulze *et al.*, 2008).

Estas enzimas são classificadas em três tipos, de acordo com as análises bioquímicas e seu produto de reação (El-Safory *et al.*, 2010):

(1) Hialuronato 4-glicanohidrolases hialuronidases (hialuronidase de mamíferos) (E.C. 3.2.1.35), que cliva ligações glicosídicas β -1-4 no ácido hialurônico, condroitina e sulfato de condroitina, resultando em moléculas de tetrassacarídeo como produto final. Estão presentes em testículos, lisossomos e veneno de abelhas.

(2) Hialuronato-3-glicanohidrolases (E.C. 3.2.1.36), presentes nas glândulas salivares de sanguessugas e nematoides parasitas, que degradam ácido hialurônico pela clivagem de ligações glicosídicas β -1-3, resultando em ácido glicurônico como produto final;

(3) Hialuronidases microbianas (E.C. 4.2.2.1) clivam ligações glicosídicas β 1-4 do ácido hialurônico para produzir dissacarídeo como produto final. Enzimas desta classe estão presentes em vários micro-organismos, incluindo cepas de *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Streptomyces*.

O ácido hialurônico, um dos substratos utilizados pela hialuronidase, é um polissacarídeo de alto peso molecular, encontrado na matriz extracelular, especialmente em tecidos conjuntivos, sendo responsável pela propriedade viscoelástica de fluidos teciduais e como componente de estabilização e hidratação de tecido conjuntivo mole (El-Safory *et al.*, 2010).

Este polímero desempenha importante função em muitos processos biológicos, incluindo fertilização, desenvolvimento embriológico, migração e diferenciação celular, crescimento e metástase de células tumorais e inflamação (Girish e Kemparaju, 2007).

2.6.3. Citotoxicidade

2.6.3.1. Câncer

Em um organismo normal, as células do corpo crescem, se dividem para dar origem a novas células e morrem de forma ordenada. Quando a célula apresenta proliferação rápida e anormal, perda de diferenciação com consequente alteração de suas características e propriedades originais, é denominada cancerígena (Porth e Matfin, 2010). Além destas características, estas células tem

poder de invasão e metástase, que é a disseminação para outras cavidades corporais através de vias sanguíneas ou linfáticas (Rang *et al.*, 1999).

O câncer é caracterizado pelo distúrbio da proliferação e diferenciação de células cancerígenas, e pode ter causas diversas e complexas. A patogenia molecular da maioria dos cânceres é atribuída a lesões ou mutações genéticas, resultando em alterações fisiológicas da célula (Hanahan e Weinberg, 2000).

A etiologia do câncer é multifatorial, podendo ser predisposição genética, fatores ambientais e/ou decorrente do estilo de vida, como tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, exposição a radiações ionizantes e agentes infecciosos específicos (Robbins e Cotran, 2010).

2.6.3.2. Leucemia

Leucemias são tipos de cânceres que acometem as células sanguíneas brancas (Yan *et al.*, 2014), responsáveis pela ativação do sistema imunológico. Podem ser classificadas de acordo com a origem celular, sendo linfóide ou mieloide, e quanto à evolução da doença, podendo ser aguda, quando as células alteradas se encontram em fase muito imatura, ou crônica, quando são mais maduras (American Cancer Society, 2013).

Leucemia mieloide crônica (LMC) é caracterizada como desordem mieloproliferativa que se desenvolve principalmente em adultos, com predominância em indivíduos do sexo masculino (Cortes, 2004). Aproximadamente 95 % dos casos diagnosticados de LMC são decorrentes de alteração genética, que acontece devido a translocação entre genes dos cromossomos 9 e 22, resultando no cromossomo denominado Philadelphia (Ph) (Faderl *et al.*, 1999). Esta translocação envolve a fusão do oncogene Abelson (ABL) do cromossomo 9 com o gene *breakpoint cluster region* (BCR) do

cromossomo 22, que juntos resultam na formação do oncogene BCR-ABL que expressam a oncoproteína de mesmo nome, Bcr-Abl (Jabbour e Kantarjian, 2012; Moraes *et al.*, 2013). Esta proteína promove alteração de adesão celular, ativação de sinalizadores mitogênicos e inibição da apoptose ao interagir com várias vias de sinalização, resultando no desenvolvimento e manutenção da LMC (An *et al.*, 2010).

Para controlar ou inibir a proliferação destas células alteradas em pacientes leucêmicos, são realizados diferentes tratamentos combinados, como terapias químicas, radiológicas e transplantes de células-tronco (Porth e Matfin, 2010). Recentemente, estudos fitoquímicos vêm sendo descritos, buscando novas alternativas que possam auxiliar na prevenção e ou tratamento do câncer, incluindo os diferentes tipos de leucemias (Asmaa *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, das 128 drogas anticâncer disponibilizadas no mercado, aproximadamente 10 % são de origem natural e 25 % derivadas de produtos naturais (Newman e Cragg, 2012), o que estimula a busca por novas fontes de compostos bioativos para a terapia do câncer.

Os compostos fenólicos são um dos principais responsáveis pela ação citotóxica de linhagens tumorais. Dentre seus principais mecanismos de ação estão supressão da angiogênese, inibição de oncogenes como BCR/ABL, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (enzima promotora da divisão celular e inibidora da apoptose), ativação de caspases, ativação de macrófagos e parada do ciclo celular (Ferreira e Carcho, 2013).

2.6.3.3. Morte celular

Em geral, os métodos empregados no tratamento do câncer visam a remoção das células tumorais ou a morte destas. A maioria dos agentes

antineoplásicos são antiproliferativos, os quais promovem danos no DNA e, portanto, desencadeiam o processo de apoptose (Rang *et al.*, 1999). Além desta via, a ação citotóxica também pode ser decorrente de necrose, ou da combinação destes dois tipos de morte (Krysko *et al.*, 2008; Kroemer *et al.*, 2009).

A apoptose é um processo responsável por vários processos fisiológicos, como na involução dos tecidos dependentes de hormônio, morte das células que já tenham cumprido sua função, como em processos inflamatórios ou do sistema imune, bem como na destruição programada das células durante o desenvolvimento embrionário ou que sofreram algum dano irreversível em seu material genético (Porth e Matfin, 2010). Neste último caso, a interferência deste processo acarreta um mecanismo que contribui para a carcinogênese.

Durante o processo da apoptose, ocorre a retração celular, condensação da cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos e, por último, ocorre a fagocitose destes corpos pelos macrófagos (Patel *et al.*, 2005).

A indução da apoptose é regulada por duas vias principais: a via extrínseca, que é dependente do receptor de morte, ativando receptores como do fator de necrose tumoral e do Fas ligante, e a via intrínseca, que é mediada pela mitocôndria, ou seja, requer a perda do potencial da membrana mitocondrial, e apresenta maior sensibilidade para indução de morte celular (Porth e Matfin, 2010).

Em ambas as vias, a fase de execução é realizada pelas caspases, que são uma família de cisteína proteases aspartato-específicas, que estão presentes no citoplasma celular na forma inativa, sendo denominada procaspase, e são ativadas pela autoproteólise induzida pela interação com proteínas adaptadoras (domínios efetores de morte ou domínios de recrutamento de caspase) ou pela clivagem de outras proteases (Krysko *et al.*, 2008).

A caspase 3 é a enzima responsável, parcial ou totalmente, pela clivagem proteolítica de proteínas importantes, como a poli(ADP-ribose)polimerase, uma enzima reparadora de DNA (Cohen, 1997) e é responsável pelas etapas finais de execução da apoptose (Sakulnarmrat *et al.*, 2013).

A morte celular induzida por necrose é caracterizada pelo aumento no volume celular (oncosis), inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e, conseqüentemente, ocorre a liberação do conteúdo intracelular (Kroemer *et al.*, 2009).

Outro processo de morte celular é a apoptose tardia, também conhecido como pós-apoptótico ou necrose secundária (Patel *et al.*, 2006). Neste tipo de morte celular ocorrem eventos moleculares e bioquímicos típicos da apoptose e necrose. É caracterizado como um processo apoptótico que não ocorre fagocitose e que são ativados mecanismos semelhantes aos da necrose (Krysko *et al.*, 2008).

A apoptose tardia é iniciada por fragmentação nuclear, intensa condensação da cromatina e liberação da caspase-3 ativada, características típicas da apoptose, e finalizando o processo apresentando inchaço citoplasmático e permeabilização da membrana celular, o que resulta na perda da integridade de membrana, processos que caracterizam a morte celular por necrose (Silva, 2010).

Drogas que promovem a morte de células cancerígenas por diferentes mecanismos são de extrema importância, especialmente em linhagens celulares que apresentam resistência a determinados tipos de morte celular.

2.6.4. Toxicidade

A busca por novas moléculas que tenham potencial terapêutico vem crescendo nas últimas décadas, especialmente as provenientes de produtos naturais. Apesar do grande benefício encontrado nestes produtos, é fundamental a

investigação de seus possíveis efeitos tóxicos ao organismo. Diversos modelos biológicos são utilizados antes de iniciar os ensaios clínicos, que irão comprovar as potencialidades destes possíveis medicamentos.

Um dos modelos animais que vem sendo amplamente utilizado em estudos farmacológicos e toxicológicos é o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Vários estudos têm avaliado as atividades biológicas de extratos de produtos naturais ou compostos isolados em *C. elegans*, inclusive demonstrando seu mecanismo de ação (Kampkötter *et al.*, 2008; Bonomo *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014).

Este indivíduo apresenta várias características que o torna uma excelente ferramenta de estudo (Altun e Hall, 2009). Pode ser cultivado facilmente em laboratório, em ágar ou meio líquido contendo bactéria *Escherichia coli* OP-50, que é a fonte de alimento para *C. elegans* (Stiernagle, 2006). Apresenta pequeno tamanho, em torno de 1 mm de comprimento na fase adulta, ciclo de vida curto, aproximadamente 21 dias. Possui grande capacidade de reprodução, pois a maioria dos indivíduos é hermafrodita, no qual um único indivíduo é capaz de produzir aproximadamente 300 ovos por autofecundação (Kaletta e Hengartner, 2006). O ovo de *C. elegans*, após eclosão passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até atingir a fase adulta (Altun e Hall, 2009).

Seu genoma já foi completamente mapeado, sendo identificada homologia em cerca de 80 % do genoma humano, o que contribui para que um grande número de doenças seja investigado utilizando estes indivíduos (Kaletta e Hengartner, 2006).

Objetivos

3. Objetivos

Investigar a composição química e atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e toxicidade da própolis das abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* e *Tetragonisca fiebrigi*.

Material e métodos

4. Material e métodos

4.1. Coleta e preparo dos extratos etanólicos de própolis (EEP)

Amostras de própolis das abelhas *M. orbignyi* e *T. fiebrigi* foram coletadas em Dourados (22° 13' 12" S - 54° 49' 2" O), Mato Grosso do Sul, na região Centro-Oeste do Brasil. Para obtenção da própolis da espécie *M. orbignyi* foram realizadas quatro coletas a partir de uma colônia, resultando 15,2 g. Quanto à espécie *T. fiebrigi*, três colônias foram identificadas e seis amostras de própolis foram coletadas, totalizando 12,8 g. Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram preparados de acordo com Alencar *et al.* (2007), na proporção de 4,5 mL de etanol 80 % para cada grama de própolis. Estes foram mantidos em banho-maria a 70 °C em recipiente fechado até total dissolução e em seguida foram filtrados para obter o EEP-T (*T. fiebrigi*) e EEP-M (*M. orbignyi*).

4.2. Determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides

A concentração de compostos fenólicos nos EEP foi determinada de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Meda *et al.*, 2005). Para isto, 0,5 mL de EEP-M ou EEP-T (100 µg/mL) foi misturado com 2,5 mL do reagente Folin–Ciocalteu e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 14 %. A absorbância foi lida a 760 nm após 2 h de incubação à temperatura ambiente, no escuro. Ácido gálico (0,4 – 11 µg/mL) foi utilizado como padrão para produzir a curva de calibração. A média de três leituras foi utilizada para determinação do conteúdo de compostos fenólicos, expresso em mg equivalente ao ácido gálico (EAG)/100 g de própolis.

O teor de flavonoides nos EEP foi determinado de acordo com o método descrito por Liberio *et al.* (2011), com pequenas modificações. Para isto, 0,5 mL de EEP-M ou EEP-T (100 µg/mL) foi misturado com 4,5 mL de cloreto de alumínio hexahidratado 2 % ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em metanol. A absorbância foi lida a 415 nm após 30 min de incubação à temperatura ambiente, no escuro. Quercetina (0,4 – 11 µg/mL) foi utilizada como padrão para produzir a curva de calibração. A média de três leituras foi utilizada para determinação do conteúdo de flavonoides, que foi expresso em mg equivalente à quercetina (EQ)/100 g de própolis.

4.3. Análise química

Um miligrama dos extratos foi misturado a 50 µL de piridina, 100 µL de bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) em tubo de vidro fechado, por 30 min a 100 °C, para preparar a amostra para cromatografia gasosa (Greenaway *et al.*, 1988). O procedimento foi realizado em triplicata. Amostras foram injetadas e analisadas por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS). A análise de GC-MS foi realizada em cromatógrafo gasoso (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com detector espectrômetro de massa (QP 5050a), usando DB-5 (J&W, 5% fenil-dimetilpolisiloxano), coluna de capilaridade de sílica fundida (30 m de comprimento × 0,25 mm de largura e 0,25 µm de espessura da película), nas seguintes condições: gás carregador hélio (99,999 % e fluxo de 1,0 mL/min), volume de injeção de 1 µL, relação (1:10), conjunto de temperatura inicial de 85 °C e aquecimento de 85 para 315 °C a 4 °C/min. A temperatura do injetor foi 280 °C, e a temperatura do detector quadrupolo foi 315 °C. Os parâmetros scan MS incluiu um ionizador de impacto de elétron de voltagem 70 eV, intervalo de massa de 45–600 m/z, e intervalo de verificação de 0,5 s. Índice de temperatura programada (Zhao *et al.*, 2005) foi calculado

utilizando misturas de alceno linear (C8–C30) como referência externa. A identificação foi completada pela comparação de espectro de massa obtida na biblioteca QP5050. Em alguns casos, quando o espectro identificado não foi encontrado, somente o tipo estrutural do componente correspondente foi proposto sobre a base da fragmentação do espectro de massa. Quando possível, compostos de referência foram co-cromatografados para confirmar os tempos de retenção CG.

4.4. Atividade antioxidante

4.4.1. Ensaio de captura do radical ABTS

A capacidade de captura de radicais livres pelo EEP-M e EEP-T foi avaliada conforme descrito por Re *et al.* (1999), por meio da avaliação da captura do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Para isto, foram preparadas as soluções estoque ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM, ambas em água destilada. O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi preparado pela mistura das duas soluções estoque (5 mL da solução ABTS e 88 μL da solução de persulfato de potássio) e mantidas por 12-16 h a temperatura ambiente, no escuro. A solução foi diluída ao misturar o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ com etanol absoluto até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm utilizando espectrofotômetro. Em seguida, 20 μL de cada EEP (0,1 – 500 $\mu\text{g/mL}$) foram misturados com 1980 μL do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ e a absorbância foi lida a 734 nm após 6 min da reação, utilizando espectrofotômetro. Ácido ascórbico e butylated hydroxytoluene (BHT) foram utilizados como controles positivo. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do ABTS} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

Onde A_0 é a absorbância do controle ABTS, sem amostra avaliada, e A_1 é a absorbância da amostra. A curva de inibição foi preparada e os valores de IC_{50} (concentração necessária para inibir 50 % dos radicais livres) foram calculados.

4.4.2. Inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos

4.4.2.1. Preparo de suspensão de eritrócitos

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Brasil (número do processo no CEP: 123/12), 10 mL de sangue periférico foi coletado de doadores saudáveis em tubos contendo citrato de sódio e posteriormente centrifugados a 1500 rpm durante 10 min. Após centrifugação, o plasma sanguíneo e camadas de leucócitos foram descartadas, e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina e centrifugados. Finalmente, uma suspensão de eritrócitos 10 % foi preparada em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9 %, para obter 2,5 % após os tratamentos.

4.4.2.2. Atividade hemolítica e inibição de hemólise oxidativa

O efeito protetor do extrato de própolis foi avaliado de acordo com o método descrito por Campos *et al.* (2014), com pequenas modificações. Os ensaios foram realizados com suspensão de eritrócitos. Os eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C por 30 min na presença de diferentes concentrações de EEP ou ácido ascórbico (25-125 µg/mL). Em seguida, 500 µL de NaCl 0,9 % ou de solução

de 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 50 mM foram adicionados, para avaliação da atividade hemolítica e inibição da hemólise oxidativa pelos extratos, respectivamente. Uma amostra de etanol 0,2 % foi utilizada como controle negativo e como controle de hemólise basal foram incubados eritrócitos somente com NaCl 0,9 %. Hemólise total foi induzida pela incubação de eritrócitos com água destilada. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 240 min, com agitação periódica. O teor de hemólise foi determinado a cada 60 min de incubação da amostra durante 240 min, onde alíquotas eram retiradas, diluídas em solução salina e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi lida espectrofotometricamente a 540 nm. A percentagem de hemólise foi medida utilizando a fórmula $A/B \times 100$, onde (A) é a absorbância da amostra e (B) é a hemólise total. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata.

4.4.2.3. Dosagem de malondialdeído (MDA)

O efeito protetor contra a peroxidação lipídica dos EEP foi avaliado de acordo com o método descrito por Campos *et al.* (2014), com pequenas modificações. Eritrócitos foram pré-incubados a 37 °C por 30 min com diferentes concentrações de EEP ou ácido ascórbico (25-125 µg/mL). Uma amostra de etanol 0,2 % foi utilizada como controle negativo. Em seguida, 500 µL de solução AAPH 50 mM foram adicionados e incubados a 37 °C com agitação periódica. A concentração de malondialdeído (MDA), um subproduto derivado da peroxidação lipídica, foi determinada a cada 60 min de incubação da amostra durante 240 min. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. Alíquotas (500 µL) do sobrenadante foram transferidas para tubos contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 10 nM. Como controle padrão, 500 µL da solução de MDA 20

mM foi adicionado a 1 mL de TBA. As amostras foram incubadas a 96 °C por 45 min. Após as amostras serem resfriadas, 4 mL de álcool n-butílico foi adicionado, então as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante da amostra foi removido e a absorbância lida a 532 nm em espectrofotômetro. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata. O nível de MDA das amostras foram expressos em nM/mL, obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{MDA} = \text{Absorbância}_{\text{amostra}} \times (20 \times 220,32 / \text{Absorbância}_{\text{padrão}})$$

4.5. Atividade anti-inflamatória: inibição da enzima hialuronidase

A inibição da atividade da enzima hialuronidase foi determinada utilizando o método descrito por Silva *et al.* (2012), com pequenas modificações. A mistura de reação foi constituída por 50 µL de EEP-M ou EEP-T (0,2 – 75 mg/mL) e 50 µL (350 unidades) da enzima hialuronidase (tipo IV-S: testículos bovinos), incubada a 37 °C por 20 min. Em seguida, foi adicionado cloreto de cálcio (CaCl₂) (1,2 µL, 2,5 × 10⁻³ M/L) para ativar a enzima. A mistura foi incubada a 37 °C por 20 min. Para iniciar a reação, 0,5 mL do sal de sódio do ácido hialurônico (0,1 M/L) foi adicionado. A mistura foi incubada a 37 °C por 40 min. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de tetraborato de potássio 0,8 M, sendo incubado em banho-maria a 100 °C por 3 min. A mistura foi resfriada a 10 °C. Em seguida, 3 mL de p-dimetilaminobenzaldeído foi adicionado e a solução foi incubada a 37 °C por 20 min. Por fim, a absorbância foi lida a 585 nm, utilizando água como controle. Foram realizados dois experimentos em duplicata. A porcentagem de inibição da enzima hialuronidase foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Inibição (\%)} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

Onde A₀ é a absorbância do controle incubado com água e A₁ é a absorbância da amostra.

4.6. Atividade citotóxica e perfil de morte celular

A linhagem celular eritroleucêmica K562 foi cultivada em suspensão em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementada com soro fetal bovino (SFB; Cultilab), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina em ambiente umidificado a 37 °C em 5 % CO₂. A atividade citotóxica e perfil de morte celular foram avaliados de acordo com o método descrito por Paredes-Gamero *et al.* (2012), com pequenas modificações. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (10⁵ células/mL) e mantidas em meio com 10 % de SFB na ausência ou presença de EEP (31 – 500 µg/mL) por 24 h. Após este período, células K562 foram lavadas com PBS e ressuspendidas em tampão de marcação anexina (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,14 M NaCl e 2,5 mM CaCl₂). As suspensões foram marcadas com anexina-FITC e iodeto de propídeo (PI) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Dez mil eventos foram coletados por amostra, e as análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) com o programa CellQuest (Becton Dickinson). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.7. Toxicidade *in vivo*

4.7.1. Criação e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para realização do ensaio de toxicidade *in vivo*, foi utilizado o nematoide *C. elegans*, linhagem selvagem N2. Os indivíduos foram incubados a 20 °C em placas de petri contendo ágar *Nematode Growth Medium* (NGM), sendo alimentados com bactérias *Escherichia coli* OP50-1. A sincronização da cultura

dos nematoides foi realizada com o tratamento com hipoclorito de sódio (2 %) e hidróxido de sódio (5 M) em hermafroditas grávidas.

4.7.2. Avaliação de toxicidade

O ensaio de toxicidade dos EEP foi realizado no modelo *in vivo* *C. elegans* em placas de 96 poços, de acordo com método realizado por Dengg e Meel, (2004). Foram utilizados indivíduos jovens adultos (fase L4), os quais foram incubados por 24 horas a 20 °C com EEP-M ou EEP-T em diferentes concentrações (31–500 µg/mL) em meio M9. Após este período, a viabilidade dos nematoides foi avaliada ao serem tocados repetidamente com uma microespátula. Para manipulação e análise dos nematoides, foi utilizado um estéreo microscópio Motic SMZ-140 & W10X/23. Os dados foram calculados a partir de três experimentos independentes, contendo aproximadamente 10 nematoides por poço, em duplicata. Para calcular a dose letal para 50 % dos indivíduos (DL50) foi realizada a equação da reta, em função da porcentagem de mortalidade dos animais e das concentrações avaliadas.

4.8. Análises estatísticas

Os dados são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados por diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, usando o teste *t* de *Student* ou por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, comparando os tratamentos com o controle, usando o programa GraphPad Prisma 5. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

5. Resultados

5.1. Composição química

As concentrações de compostos fenólicos presentes no EEP-M e EEP-T foram 211 e 12,3 mg EAG/100 g de própolis, respectivamente. O teor de flavonoides totais foi de 23 mg (EEP-M) e 6,6 mg (EEP-T) EQ/100 g de própolis.

A identificação dos componentes dos EEP baseou-se na interpretação de espectros de massa, índice de retenção e dados de base. Os principais componentes presentes no EEP-M e EEP-T foram terpenos, álcoois e ácidos aromáticos, em diferentes proporções. Os compostos minoritários foram açúcares e ácidos fenólicos (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do EEP-M e EEP-T (% de ICT: íon corrente total, CG-MS)*.

Compostos	% ICT	
	EEP-M	EEP-T
Ácidos aromáticos		
Ácidos benzoicos	11,6	9,2
Ácidos fenólicos		
Ácidos dihidrocinâmicos	1,5	1,9
Ácidos cinâmicos	3,2	3,6
Fenil, benzil, cafeatos de cadeia longa	2,9	3,1
Ácidos coumaricos C-prenilados	2,8	3,2
Álcool e terpenos		
Ácidos diterpênicos	24,4	27,3
Álcool triterpênico	10,7	12,4
Outros		
Açúcares	1,6	2,1

* A corrente de íon gerado depende das características dos compostos.

5.2. Atividade antioxidante

5.2.1. Ensaio de captura do radical ABTS

Considerando a presença de substâncias potencialmente antioxidantes, uma avaliação *in vitro* da atividade de captura do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ pelos EEP foi realizada. O IC_{50} e a atividade máxima de captura do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ pelos EEP e controles utilizados são apresentados na Tabela 2. O EEP-M apresentou IC_{50} semelhante ao antioxidante sintético BHT.

Tabela 2. IC_{50} e atividade máxima da captura do radical ABTS pelos antioxidantes padrão e EEP

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição máxima	
		%	$\mu\text{g/mL}$
Ácido ascórbico	$1,4 \pm 0,1$	$99,3 \pm 0,1$	5
BHT	$14,8 \pm 4,5$	$90,0 \pm 3,0$	50
EEP-M	$18,1 \pm 1,7$	$99,2 \pm 0,1$	100
EEP-T	$119,6 \pm 20,5$	$86,5 \pm 2,8$	500

Valores são representados pela média $\pm$ EPM

5.2.2. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa

Os EEP também foram avaliados por sua atividade hemolítica e capacidade de proteger os eritrócitos contra a hemólise induzida por AAPH. Quando os eritrócitos foram incubados somente com ácido ascórbico, EEP-M ou EEP-T, não foram observadas hemólises nos tempos e concentrações avaliadas (Figuras 3 A e 4 A), indicando que, nas condições avaliadas, EEP-M e EEP-T não são tóxicos para este modelo celular.

Posteriormente, a capacidade de proteção contra a lise celular induzida por AAPH em eritrócitos humanos foi avaliada. O EEP-M mostrou atividade antihemolítica até os 120 min de avaliação, de maneira concentração e tempo dependente, sendo observada uma redução de $37,55 \pm 7,8$ % de hemólise na maior concentração avaliada (Figura 3 B). O EEP-T inibiu a hemólise durante todo período experimental de maneira concentração e tempo dependente. Após 240 min de incubação dos eritrócitos com EEP-T, foi observada uma redução de $46 \pm 3,6$ % de hemólise na maior concentração avaliada (Figura 4 B).

5.2.3. Dosagem de malondialdeído

A capacidade dos EEP em proteger contra a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos induzidos por AAPH foi avaliada por meio da dosagem de MDA. O EEP-M apresentou redução nos níveis de MDA após 120 min de incubação, sendo observada redução de $83,86 \pm 1,3$ % de MDA na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3 C). O EEP-T apresentou redução nos níveis de MDA durante todo período experimental, de maneira concentração e tempo dependente. Após 240 min de incubação dos eritrócitos com EEP, foi observada redução de $39,5 \pm 2,4$ % de MDA na maior concentração avaliada (Figura 4 C).

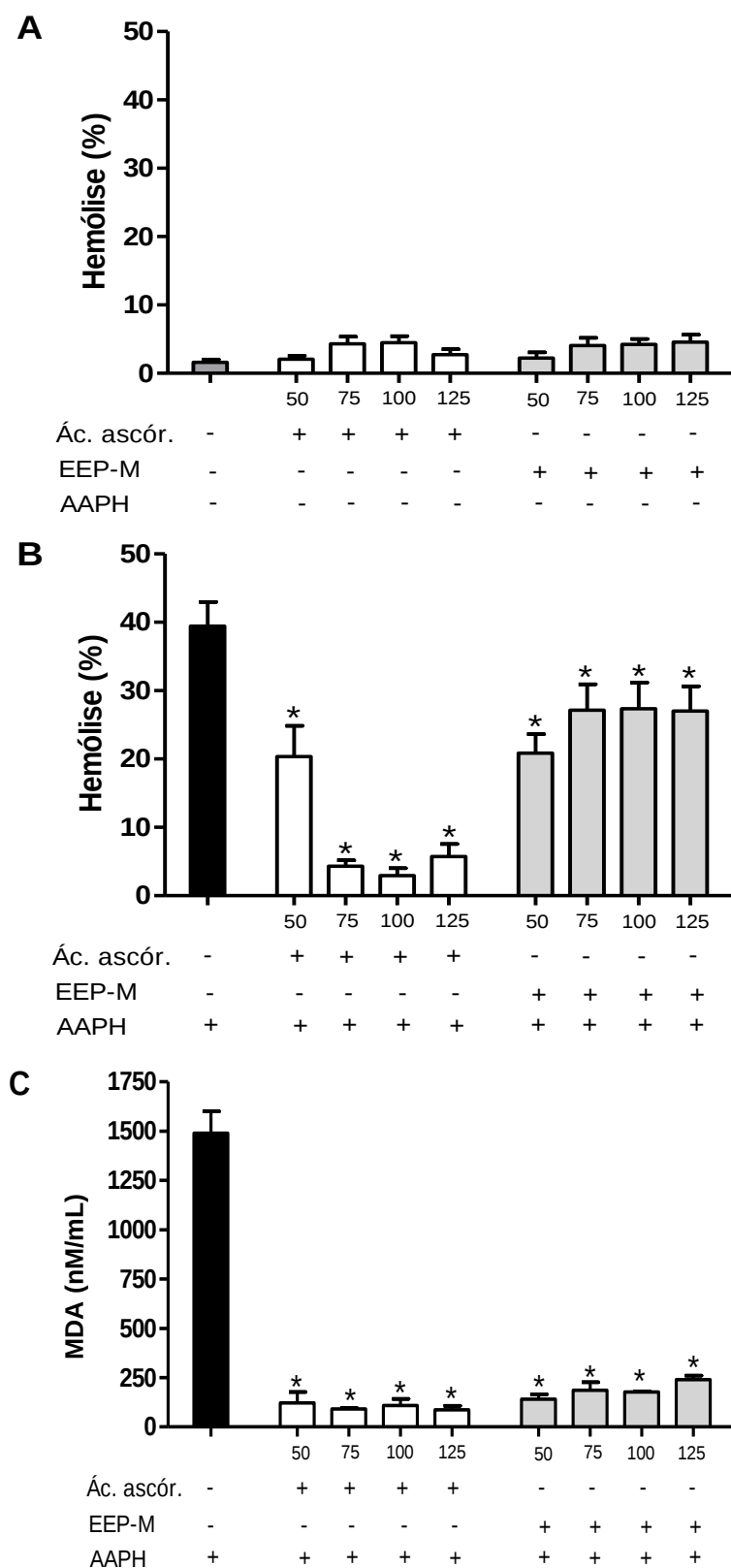


Figura 3. Eritrócitos humanos incubados aos 120 min com ácido ascórbico e EEP-M (50–125 µg/mL). **(A)** Atividade hemolítica dos tratamentos sem a presença de AAPH, e eritrócitos incubados somente com NaCl 0,9 % como controle. **(B)** Avaliação da hemólise após adição de AAPH em eritrócitos incubados com ácido ascórbico e EEP-M. **(C)** Concentração de malondialdeído (MDA) em nM/mL após adição do agente oxidante em eritrócitos incubados com diferentes concentrações dos tratamentos. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o controle AAPH (eritrócitos incubados somente com agente oxidante).

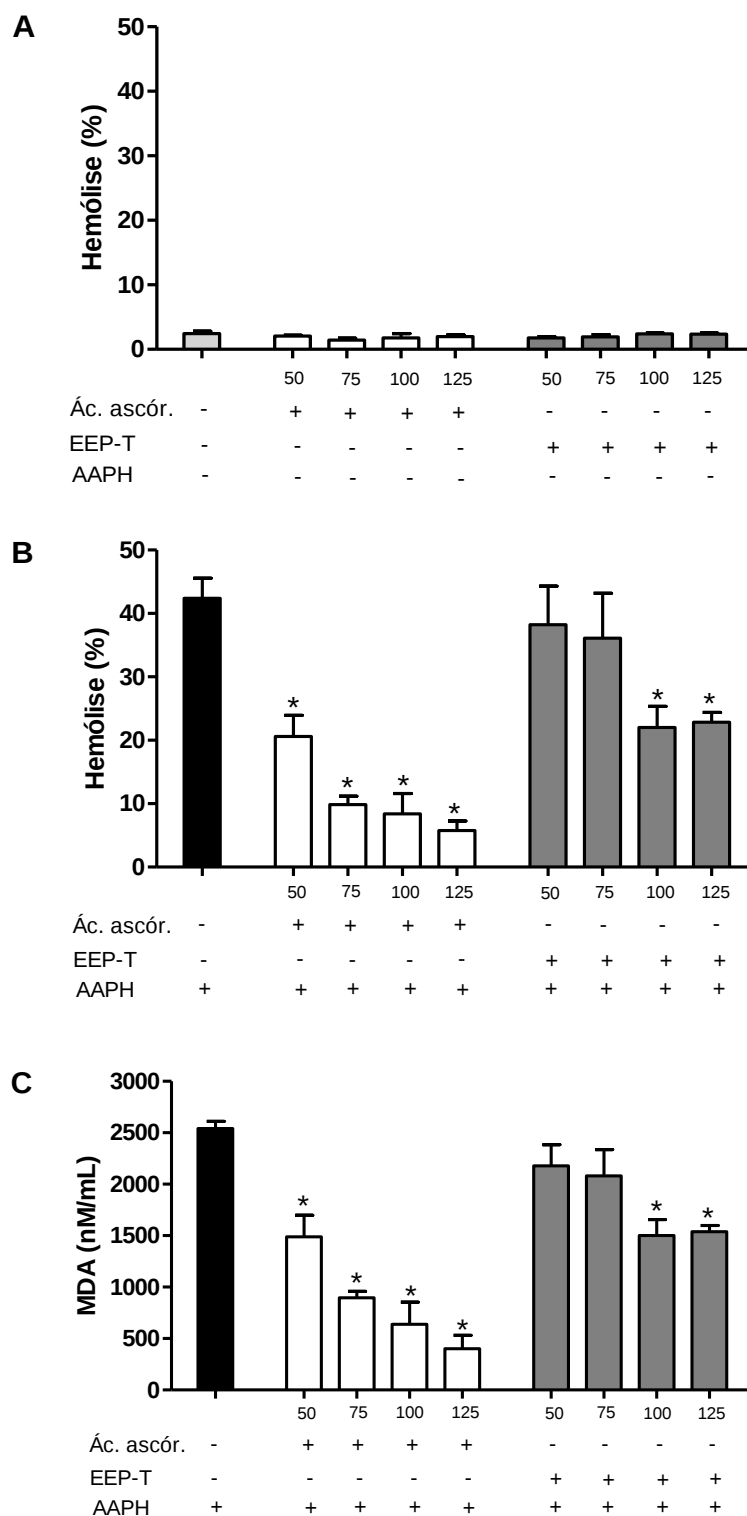


Figura 4. Eritrócitos humanos incubados aos 240 min com ácido ascórbico e EEP-T (25–125 µg/mL). **(A)** Atividade hemolítica dos tratamentos sem a presença de AAPH, e eritrócitos incubados somente com NaCl 0,9% como controle. **(B)** Avaliação da hemólise após adição de AAPH em eritrócitos incubados com ácido ascórbico e EEP-T. **(C)** Concentração de malondialdeído (MDA) em nM/mL após adição do agente oxidante em eritrócitos incubados com diferentes concentrações dos tratamentos. * Representa resultados estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando o grupo tratado foi comparado com o controle AAPH (eritrócitos incubados somente com agente oxidante).

5.3. Atividade anti-inflamatória

Ambos os extratos apresentaram ação anti-inflamatória, pois foram capazes de inibir a atividade da enzima hialuronidase, de maneira concentração dependente. O EEP-M apresentou atividade máxima na concentração de 3,75 mg/mL, sendo capaz de inibir $87,3 \pm 3,3$ % da atividade enzimática (Figura 5 A). A maior concentração avaliada do EEP-T (75 mg/mL) foi capaz de inibir $43,06 \pm 3,06$ % da atividade da enzima hialuronidase (Figura 5 B).

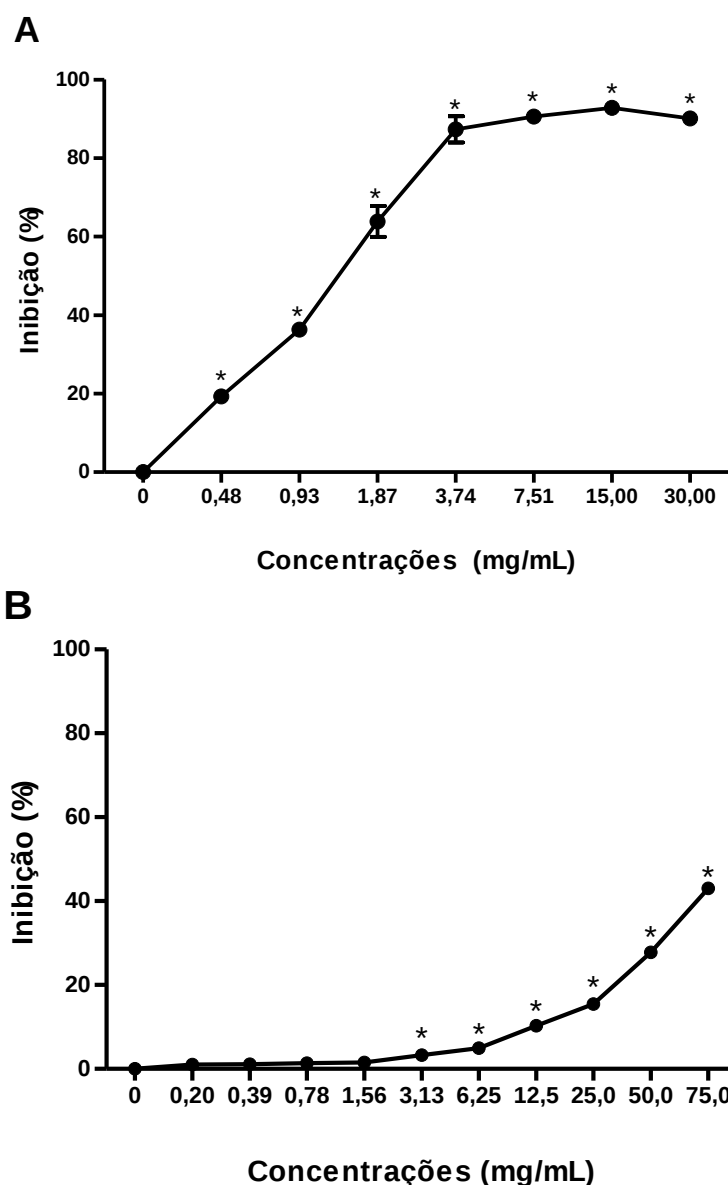


Figura 5. Inibição da atividade da enzima hialuronidase por diferentes concentrações de **(A)** EEP-M e **(B)** EEP-T.

5.4. Atividade citotóxica e perfil de morte celular

Células eritroleucêmicas K562 tratadas com diferentes concentrações de EEP-M e EEP-T foram marcadas com anexina V-FITC/PI para verificar o perfil de morte celular. Os EEP apresentaram citotoxicidade concentração dependente. Na maior concentração avaliada (500 µg/mL), houve uma redução de $83 \pm 0,4$ e $67 \pm 2,5$ % de células viáveis após tratamento com EEP-M (Figura 6 A) e EEP-T (Figura 7 A), respectivamente. Nesta concentração, 63 ± 2 e $56 \pm 1,4$ % das células morreram por necrose após tratamento de 24 h com EEP-M e EEP-T, respectivamente. Os extratos também promoveram a morte por necrose secundária em 21 ± 3 % (EEP-M) e $13 \pm 0,8$ % (EEP-T) das células K562 (Figuras 6 B e 7 B).

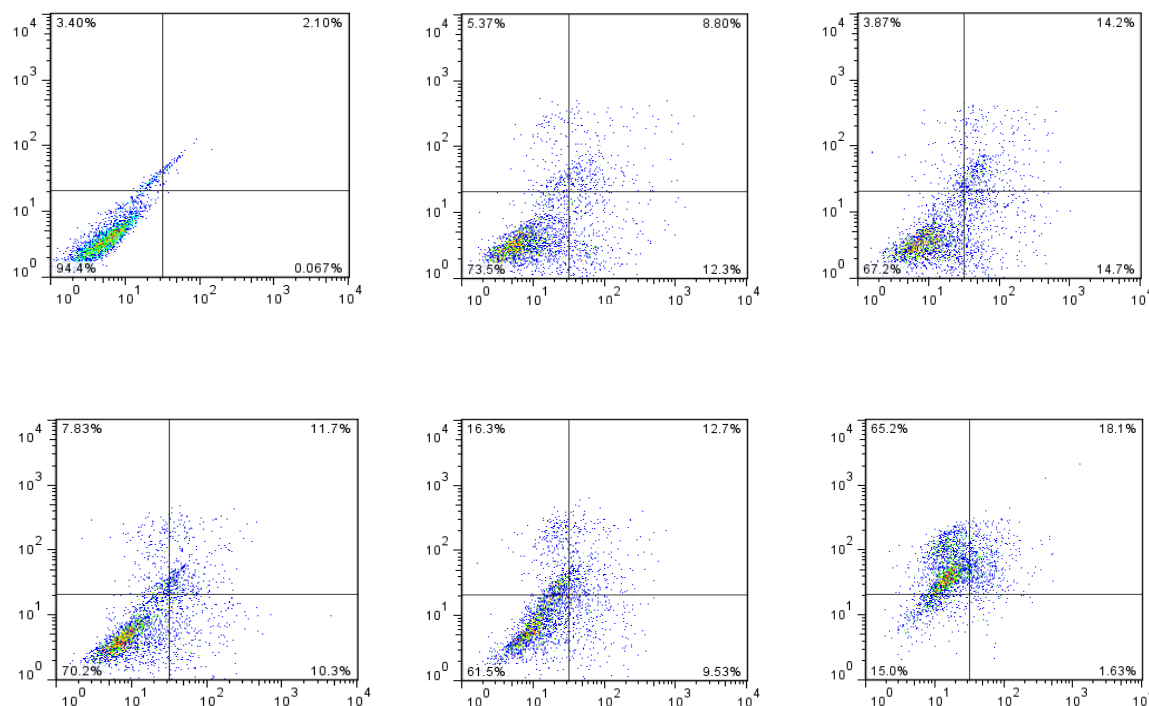
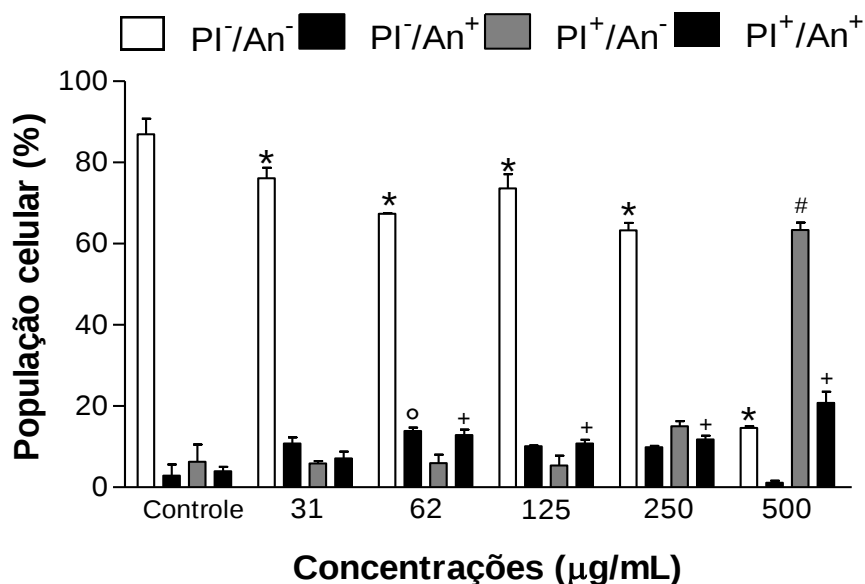
A**B**

Figura 6. Ação citotóxica de EEP-M contra a linhagem celular eritroleucêmica K562. **(A)** Diagramas representativos obtidos por citometria de fluxo de células marcadas com anexina V-FITC/PI: quadrante inferior esquerdo (PI-/An-) representa células viáveis; quadrante inferior direito (PI-/An+) representa células apoptóticas; quadrante superior esquerdo (PI+/An-) representa células em necrose; e quadrante superior direito (PI+/An+) representa células em necrose secundária. **(B)** Frequência de morte celular, obtida a partir dos diagramas correspondentes das concentrações avaliadas.* P < 0,05 grupo tratado versus células controle viáveis. # P < 0,05 grupo tratado versus controle necrose.

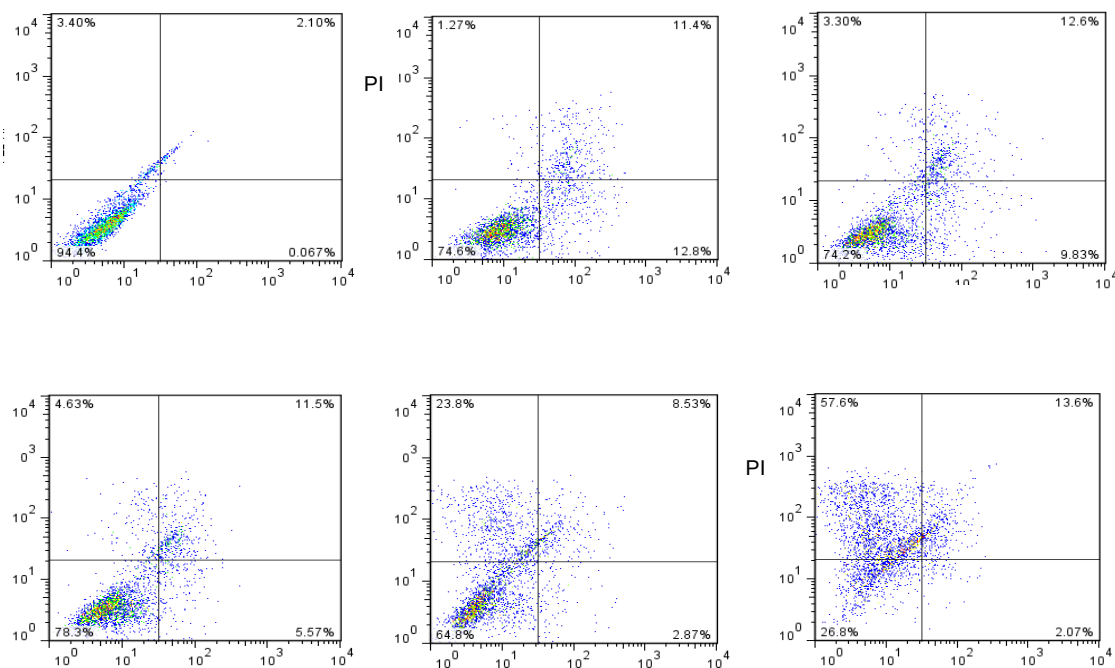
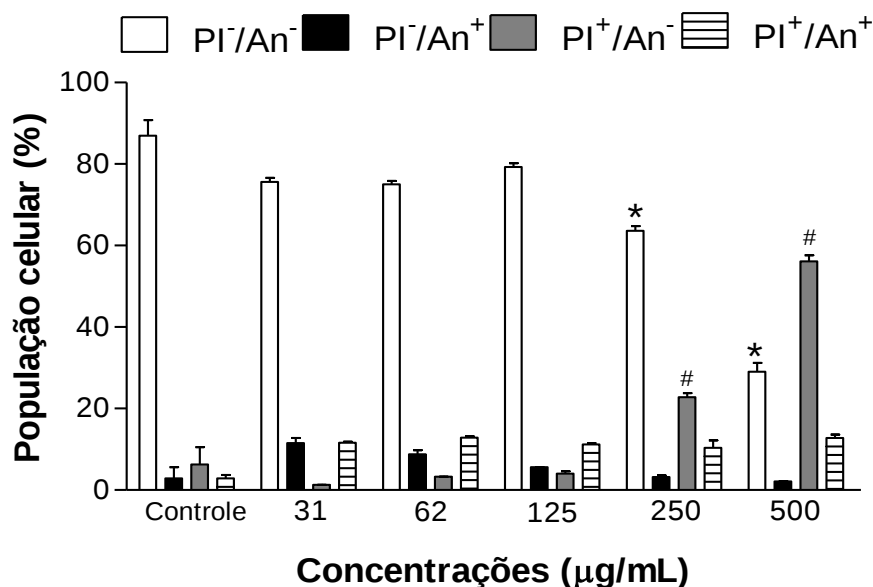
A**B**

Figura 7. Ação citotóxica de EEP-T contra a linhagem celular eritroleucêmica K562. **(A)** Diagramas representativos obtidos por citometria de fluxo de células marcadas com anexina V-FITC/PI: quadrante inferior esquerdo (PI-/An-) representa células viáveis; quadrante inferior direito (PI-/An+) representa células apoptóticas; quadrante superior esquerdo (PI+/An-) representa células em necrose; e quadrante superior direito (PI+/An+) representa células em necrose secundária. **(B)** Frequência de morte celular, obtida a partir dos diagramas correspondentes das concentrações avaliadas. * P < 0,05 grupo tratado versus células controle viáveis. # P < 0,05 grupo tratado versus controle necrose.

5.5. Toxicidade *in vivo*

Ao avaliar a ação tóxica dos extratos de própolis *in vivo*, utilizando o nematoide *C. elegans*, foi verificado que o EEP-M não apresenta toxicidade nas menores concentrações avaliadas (31 e 62 µg/mL). Entretanto, apresentou DL₅₀ (dose letal para 50 % dos indivíduos) de $491,8 \pm 65$ µg/mL (Figura 8 A). Já o EEP-T não reduziu a população de *C. elegans*, indicando que nas concentrações avaliadas este extrato não apresenta toxicidade neste modelo biológico (Figura 8 B).

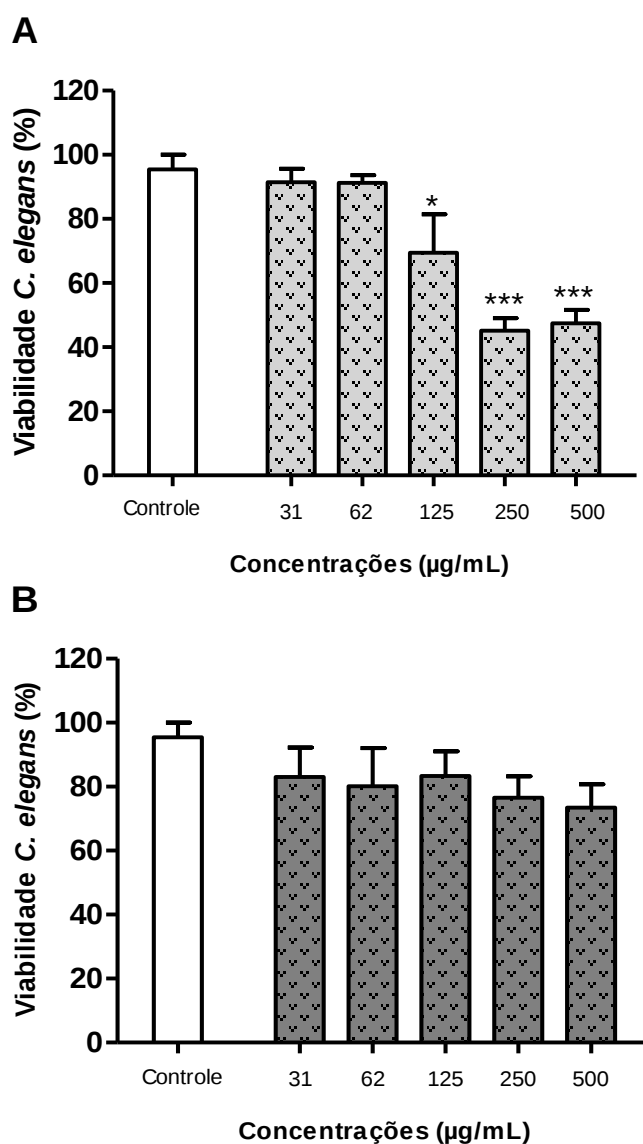


Figura 8. Toxicidade de (A) EEP-M e (B) EEP-T contra os nematoides *C. elegans*. * $P < 0,05$ grupo tratado versus grupo controle não tratado.

Discussão

6. Discussão

A própolis é um produto natural que apresenta composição química complexa. As substâncias presentes na composição da própolis são responsáveis por suas atividades biológicas e podem atuar sinergicamente e de maneira isolada. Neste estudo, compostos fenólicos, ácidos aromáticos, álcool, terpenos e açúcares foram observados nos EEP de *M. orbinyi* e *T. fiebrigi*, mas em proporções diferentes, fator que pode influenciar diretamente nas atividades biológicas. Estes compostos, já foram identificados em outros estudos de própolis de abelhas sem ferrão (Miorin *et al.*, 2003; Bankova e Popova, 2007).

Ao avaliar suas propriedades biológicas, ambos os extratos apresentaram importantes atividades antioxidantes. Estes resultados foram evidenciados pela captura direta de radicais livres e capacidade de inibir a lise de eritrócitos incubados com agente oxidante, o que foi confirmado pela menor geração de MDA, um dos marcadores bioquímicos de peroxidação lipídica.

As propriedades antioxidantes apresentadas pelos EEP avaliados provavelmente estão relacionadas à sua composição química, especialmente pela presença de compostos fenólicos como flavonoides, ácido benzoico, ácido cinâmico e ácido p-coumarico, já descritos na literatura por sua capacidade de capturar radicais livres (Gülçin *et al.*, 2010; Kurek-Górecka *et al.*, 2014). Outros estudos tem mostrado que estes compostos são responsáveis pela atividade antioxidante de plantas (Casagrande *et al.*, 2014; Raza *et al.*, 2015; Tirloni *et al.*, 2015) e própolis (Silva *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). De acordo com Valente *et al.* (2011), polifenóis presentes na própolis são capazes de capturar radicais $RO_2^{\cdot}$, gerados pelo agente oxidante AAPH, inibindo o processo de peroxidação lipídica,

o que resulta na proteção contra oxidação das biomoléculas presentes na membrana dos eritrócitos.

A própolis também tem sido relatada por possuir atividade anti-inflamatória tanto *in vitro* e como *in vivo*, modulando os principais mediadores inflamatórios, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando citocinas anti-inflamatórias e bloqueando a ativação do fator nuclear (NF) κ B (Wang *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012). Neste estudo, a atividade anti-inflamatória também foi observada na própolis de *M. orbigny* e *T. fiebrigi* pela determinação da enzima hialuronidase, uma maneira indireta de avaliar a atividade anti-inflamatória. Esta atividade é evidenciada pela inibição da atividade da enzima hialuronidase, quando em contato com o substrato ácido hialurônico.

O EEP-M apresentou melhor potencial de inibição desta enzima inflamatória, o que pode estar relacionado à maior concentração de flavonoides presentes em sua composição. Em estudo realizado por Zeng *et al.* (2015) mostra que os flavonoides reduzem a atividade da hialuronidase ao se ligar e mudar a estrutura desta enzima, por meio de forças eletrostáticas e ligações hidrofóbicas.

Além da ação anti-inflamatória, os extratos também apresentaram ação citotóxica contra a linhagem celular K562. A atividade citotóxica demonstrada pelos extratos pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos como ácido coumárico, ácido cinâmico e derivados. Estes compostos já foram descritos em amostras de própolis por sua ação citotóxica contra as linhagens celulares K562 (leucemia), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), e LNCaP (câncer de próstata humana) (Barbarić *et al.*, 2011; Franchi Jr. *et al.*, 2012; Szliszka *et al.*, 2013).

Investigando o potencial citotóxico da própolis de *T. fiebrigi* em células eritroleucêmicas K562, observamos a predominância de morte por necrose. Este

tipo de morte celular pode ser promovido pela abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial, levando à despolarização e consequente morte celular, devido a falta de ATP (Dorn, 2013). Por muitos anos, a necrose foi vista como um tipo de morte acidental descontrolada; no entanto, atualmente é descrita como uma morte programada que pode contribuir para o controle da proliferação de célula tumoral (Kroemer *et al.*, 2009), especialmente em linhagens celulares resistentes à quimioterapia convencional ou células que apresentam resistência à apoptose.

A linhagem de células eritroleucêmicas K562 é descrita por apresentar resistência à morte por apoptose (Galeano *et al.*, 2005); portanto, outras alternativas de morte celular, tais como necrose, são necessárias para inibir a proliferação destas células tumorais (Zong e Thompson, 2006). A necrose é causada por vários mecanismos bioquímicos e sinalizações moleculares, tais como aumentos nos níveis de cálcio no citoplasma da célula, maior interação com receptores da serina-treonina quinase e aumento de ERO, resultando em interrupção das organelas e morte celular (Festjens *et al.*, 2006).

Além do potencial terapêutico apresentado pela própolis, é necessária a investigação de seus efeitos colaterais, como a toxicidade em células ou indivíduos normais.

Estudos prévios demonstram que o nematoide *C. elegans* é um modelo experimental rápido e eficiente em estudos de toxicidade de compostos farmacológicos (Dengg e Meel, 2004; Leung *et al.*, 2008), pois é um organismo multicelular, com alta taxa de progênie e ciclo de vida curto, o que torna-o um excelente modelo *in vivo* para complementar sistemas baseados em cultura de células (Leung *et al.*, 2008).

Neste estudo, ao investigar os efeitos tóxicos dos EEP frente ao modelo *C. elegans*, não foi evidenciada toxicidade do EEP de *T. fiebrigi*. Entretanto, o EEP-M promoveu toxicidade, evidenciado pela morte de alguns indivíduos nas maiores concentrações.

Ao investigar a toxicidade de própolis de abelhas sem ferrão em *Artemia salina*, uma espécie de crustáceo, Velikova *et al.* (2000) observaram que estes apresentam efeitos tóxicos, com DL₅₀ que varia de $0,3 \pm 0,2$ a $> 1000 \mu\text{g/mL}$.

A toxicidade está entre os principais problemas dos fármacos disponibilizados comercialmente, desta forma, a busca por terapias com baixa toxicidade é incessante. No entanto, vale ressaltar que a maioria das drogas antineoplásicas além de promover a morte de células tumorais, apresenta toxicidade contra células normais. Estas drogas, mesmo sendo tóxicas, continuam sendo utilizadas na fármaco-terapia pela sua relação custo-benefício. Desta maneira, mais estudos devem ser realizados para avaliar os riscos e benefícios promovidos pelos produtos naturais e suas moléculas, visando a descoberta de potenciais novos fármacos.

Conclusões

7. Conclusões

Esses resultados mostram que a própolis das abelhas sem ferrão *M. orbignyi* e *T. fiebrigi* apresentam atividades biológicas importantes, incluindo antioxidante, anti-inflamatória e atividade citotóxica contra células eritroleucêmicas humana, sugerindo sua potencial aplicação na indústria farmacêutica e/ou alimentícia.

Referências

Referências

- 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., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278 – 283.
- Altun, Z.F. Hall, D.H., 2009. Introduction. *In* WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.1
- American Cancer Society, 2013. Leukemia-Chronic Myeloid (Myelogenous) Overview. 1 – 28.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochsteint, A.P., 1981. Biochemistry Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis (lipid peroxidation/ascorbic acid/primate evolution/erythrocyte aging). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 6858 – 6862.
- An, X., Tiwari, A.K., Sun, Y., Ding, P., Ashby Jr., C.R., Chen, Z., 2010. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leukemia Research*. 34, 1255 – 1268.
- Asmaa, M.J.S., Al-jamal, H.A.N., Ang, C.Y., Asan, J.M., Seeni, A., Johan, M.F., 2014. Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15, 475 – 481.

Bankova, V.S., Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 3, 3 – 15.

Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 114 – 117.

Bankova, V., Popova, M., 2007. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmacognosy Reviews*. 1, 97 – 101.

Barbarić, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M.B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Z., Medić-Šarić, M., 2011. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 135, 772 – 778.

Barlak, Y., Değer, O., Çolak, M., Karatayl, S.C., Bozday, A.M., Yücesan, F., 2011. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science*, 9, 1 – 11.

Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S.G., Costa, M.A., 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*. 34, 77 – 79.

Bazylko, A., Piwowarski, J.P., Filipek, A., Bonarewicz, J., Tomczyk, M., 2013. In vitro antioxidante and anti-inflammatory activities of extracts from *Potentilla recta*

and its main ellagitannin, agrimoniin. *Journal of Ethnopharmacology*. 149, 222–227.

Biesalki, H.K., Grimm, P., 2007. Nutrição – Texto e Atlas. *Editora Artmed*. 1 – 400.

Bonomo, L.F., Silva, D.N., Boasquivis, P.F., Paiva, F.A., da Costa Guerra, J.F., Martins, T.A.F., Torres, A.G.J., Paula, I.T.B.R., Caneschi, W.L. Jacolot, P., Grossin, N., Tessier, F.J., Boulanger, E., Silva, M.E., Pedrosa, M.L., Oliveira, R.P., 2014. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLoS ONE*. 9, 1 – 15.

Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J.L., Hartle, D.K., 2008. Inhibition of hyaluronidase activity by select sorghum brans. *Journal of Medicinal Food*. 11, 307 – 312.

Brizola-Bonacina, A.K., Alves-Junior, V.V., Chaud-Netto, J., 2009. Response of the Stingless bee “Manduri do Mato Grosso” (*Melipona favosa orbigny*, Hymenoptera, Apidae) to variable concentrations of sucrose in artificial feeding sources of different colors. *Sociobiology*. 53, 39 – 49.

Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2008. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R., (Orgs). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, URL <<http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34631>

Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R., (Orgs). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, URL <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34631>

Campos, J. F., dos Santos, U. P., Macorini, L. F. B., Mestriner, A. M., Balestieri, J. B. P., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A. L., de Picoli Souza, K., dos Santos, E. L., 2014. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*. 65, 374 – 380.

Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 13, 1236 – 1258.

Casagrande, J.C., Macorini, L.F., Antunes, K.A., Santos, U.P., Campos, J.F., Dias-Júnior, N.M., Sangalli, A., Lima Cardoso, C.A., do Carmo Vieira, M., Rabelo, L.A., Paredes-Gamero, E.J., Santos, E.L., de Picoli Souza, K., 2014. Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. *PLoS One*. 9, 1 – 8.

Castaldo, S., Capasso, F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73, S1 – S6.

Cheng, S., Li, W., Shi, Y., Yen, P., Lin, H., Liao, V.H., Chang, S., 2014. Antioxidant activity and delayed aging effects of hot water extract from *Chamaecyparis obtusa*

var. *formosana* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 4159 – 4165.

Choudhari, M.K., Punekar, S.A., Ranade, R.V., Paknikar, K.M., 2012. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 363 – 367.

Choudhari, M.K., Haghniaz, R., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., 2013. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, 1 – 10.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 17, 1195 – 1214.

Cortes, J., 2004. Natural history and staging of chronic myelogenous leucemia. *Hematology Oncology Clinics of North America*. 18, 569 – 584.

Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V. L. Roubik, D. W., Dollin, A., Heard, T., Aguilar, I., Venturieri, G. C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*. 37, 275 – 292.

Coutinho, M.A.S., Muzitano, M.F., Costa, S.S., 2009. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*. 1, 241 – 256.

Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15, 7313 – 7352.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52, 601-623.

Deichmann, R., Lavie, C., Andrews, S., 2010. Coenzyme Q10 and Statin-Induced Mitochondrial Dysfunction. *The Ochsner Journal*. 10, 16 – 21.

Dengg, M., Meel, J. C. A., 2004. *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 50, 209 – 214.

Dinareello, C.A., 2010. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*. 140, 935 – 950.

Dorn G.W., 2013. Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis. *Toxicologic Pathology*. 41, 227–234.

El-Safory, N.S., Fazary, A.E., Lee, C., 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. 81, 165 – 181.

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., 1999. The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 341, 164 – 172.

Fang, Y., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 18, 872 – 879.

Farnesi, A.P., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J.K., Soares, A.E.E., 2009. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*. 8, 635 – 640.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43, 61 – 68.

Festjens, N., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1757, 1371–1387.

Filho, B.G., 2013. Bogliolo, Patologia geral. *Editora Guanabara*. 5, 1 – 464.

Flora, S.J.S., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2, 191 – 206.

Franchi Jr., G.C., Moraes, C.S., Toreti, V.C., Dausch, A., Nowill, A.E., Park, Y.K.,

2012. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1 – 6.

Frei, B., 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*. 97, 5 – 13.

Galeano, E., Nieto, E., García-Pérez, A.I., Delgado, M.D., Pinilla, M., Sancho, P., 2005. Effects of the antitumoural dequalinium on NB4 and K562 human leukemia cell lines: Mitochondrial implication in cell death. *Leukemia Research*. 29, 1201–1211.

Girish, K.S., Kemparaju, K., 2007. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 80, 1921 – 1943.

Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., 1988. Composition of propolis in Oxfordshire, U.K. and its relation to poplar bud exudate. *Zeitschrift für Naturforschung*, 43c, 301 – 305.

Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M.H., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 2227 – 2238.

Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*. 52, 253 – 265.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 00, 57 – 70.

Jabbour, J., Kantarjian, H., 2012. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *American Journal of Hematology*. 87, 1037 – 1045.

Kaletta, T., Hengartner, M.O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5, 387 – 399.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V.T., 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 116, 452 – 461.

Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W., 2008. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149, 314 – 323.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G.,

Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*. 16, 3 – 11.

- Krysko, D.V., Berghe, T.V., D'Herde, K., Vandenabeele, P., 2008. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 44, 205 – 221.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64, 235 – 240.
- Kurek-Gorecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Gorecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Swierczek-Zieba, G., 2014. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 19, 78 – 101.
- Leung, M. C. K., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., Meze, J. N., 2008. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological sciences*. 106, 5 – 28.
- Liberio, S.A., Pereira, A.L.A., Dutra, R.P., Reis, A.S., Araújo, M.J.A.M., Mattar, N.S., Silva, L.A., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., Guerra, R.N.M., Monteiro-Neto, V., 2011. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11, 1 – 10.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 4, 118 – 126.

- Lotfy, M., 2006. biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 7, 22 – 31.
- Machado, J.L., Assunção, A.K., da Silva, M.C., Dos Reis, A.S., Costa, D.C., Arruda, D.S., Rocha, B.A., Vaz, M.M., Paes, A.M., Guerra, R.N., Berretta, A.A., Nascimento, F.R., 2012. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 2012, 1 – 10.
- Massaro, C.F., Brooks, P.R., Smyth, Wallace, H.M., Russell, F.D., 2011. Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties. *Naturwissenschaften*. 98, 329– 337.
- Massaro, C.F., Smyth, T.J., Franklin Smyth, W., Heard, T., Leonhardt, S.D., Katouli, M., Wallace, H.M., Brooks, P. 2015. Phloroglucinols from anti-microbial deposit-resins of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*). *Phytotherapy Research*. 29, 48 – 58.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 91, 571 – 577.
- Michener, C.D., 2007. The bees of the world. *The Johns Hopkins University Press, Baltimore*. 1 – 953.

- Miorin, P. L., Levy Jr., N. C., Custodio, A. R., Bretz, W. A., Marcucci, M. C., 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 913 – 920.
- Montenegro, M.R., Franco, M., 2004. Patologia: processos gerais. *Editora Atheneu*. 4, 1 – 320.
- Moraes, V.W.R., Caires, A.C.F., Paredes-Gamero, E.J. Rodrigues, T., 2013. Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death and Disease*. 4, 1 – 8.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 75, 311 – 335.
- Nogueira-Neto, P., 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. *Editora Nogueirapis*. 1 – 445.
- Oliveira, R.C, Nunes, F.M.F., Campos, A.P.S., Vasconcelos, S.M., Roubik, D., Goulart, L.R., Kerr, W.E., 2004. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd Markers. *Genetics and Molecular Biology*. 27, 181– 186.
- Paredes-Gamero, E.J., Martins, M.N.C., Cappabianco, F.A.M., Ide, J.S., Miranda, A., 2012. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides:

Regulated cell death or membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1820, 1062 – 1072.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2502 – 2506.

Patel, V.A., Longacre, A., Hsiao, K., Fan, H., Meng, F., Mitchell, J.E., Rauch, J., Ucker, D.S., Levine, J.S., 2006. Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 4663 – 4670.

Porth, C.M., Matfin, G., 2010. Fisiopatologia. Rio de Janeiro. *Editora Guanabara Koogan*. 1, 1 – 911.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1999. Farmacologia. *Editora Guanabara Koogan*. 4, 1 – 703.

Raza, M.A., Shahwar, D., Khan, T., 2015. Radical scavenging, proteases activities, and phenolics composition of bark extracts from 21 medicinal plants. *Journal of Chemistry*. 2015, 1 – 8.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26, 1231 – 1237.
- Robbins., Cotran, 2010. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. *Elsevier*. 8, 1 - 1458.
- Roubik, D.W., 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*. 37, 124 – 143.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2, 33 – 38.
- Sakulnarmrat, K., Fenech, M., Thomas, P., Konczak, I., 2013. Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. *Food Chemistry*. 136, 9 – 17.
- Sawaya, A.C.H.F., Calado, J.C.P., dos Santos, L.C., Marcucci, M.C., Akatsu, I.P., Soares, A.E.E., Abdelnur, P.V., Cunha, I.B.S., Eberlin, M.N., 2009. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1, 37 – 42.
- Schulze, C., Bittorf, T., Walzel, H., Kundt, G., Bader, R., Mittelmeier, W., 2008. experimental evaluation of hyaluronidase activity in combination with specific drugs applied in clinical techniques of interventional pain management and local anaesthesia. *Pain Physician*. 11, 877 – 883.

Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 133, 253 – 260.

Sgariglia, M.A., Vattuone, M.A., Vattuone, M.M.S., Soberon, J.R., Sampietro, D.A., 2010. Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. *Apidologie*. 41, 667 – 675.

Silva, M.T., 2010. Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters*. 584, 4491 – 4499.

Silva, V., Genta, G., Möller, M.N, Masner, M., Thomson, L., Romero, N., Radi, R., Fernandes, D.C., Laurindo, F.R., Heinzen, H., Fierro, W., Denicola, A., 2011. Antioxidant activity of uruguayan propolis. *In vitro* and cellular assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 6430–6437.

Silva, J. C. Rodrigues, S., Feas, X., Estevinho, L. M., 2012. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1790 – 1795.

Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., Almeida-Aguiar, C. 2015. Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015, 1 – 29.

Simone-Finstrom, M., Spivak, M., 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41, 295 – 311.

Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook. <http://www.wormbook.org>.

Stuchi, A.L.P.B., Toledo, V.A.A., Lopes, D.A., Cantagalli, L.B., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., 2012. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). *Sociobiology*. 59, 123 – 134.

Sultan, S., 2014. Reviewing the protective role of antioxidants in oxidative stress caused by free radicals. *Asian Pacific Journal of Health Science*. 1, 401 – 406.

Szliszka, E., Sokół-Letowska, A., Kucharska, A.Z., Jaworska, D., Czuba, Z.P., Król, W., 2013. Ethanolic extract of Polish propolis: chemical composition and TRAIL-R2 death receptor targeting apoptotic activity against prostate cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, 1 – 12.

Teixeira, É.W., Negri, G., Meira, R.M.S.A., Message, D., Salatino, A., 2005. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2, 85 – 92.

Tirloni, C.A.S., Macorini, L.F.B., dos Santos, U.P., Rocha, P.S., Barros, S.V., Mello, A.M.M.F., Vieira, M.C., de Picoli Souza, K., Santos, E.L., 2015. Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity from leaves of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. Cambess &) Hieron. ex Niederl. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 9, 353 – 362.

- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, 1 – 13.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., Pasin, F.R., Tsvetkova, I., 2006. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 3, 249 – 254.
- Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G., 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1660, 171 – 199.
- Umthong, S., Puthong, S., Chanchao, C., 2009. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *The American Journal of Chinese Medicine*. 37, 855 – 865.
- Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M., 2011. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 86 – 92.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160, 1 – 40.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39, 44 – 84.
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Manfredini, V., Benfato, M.S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*. 30, 1323 – 1338.
- Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 2000. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift fur Naturforschung—Section C*. 55, 785 – 789.
- Vit, P., Gutierrez, M.G., Rodriguez-Malaver, A.J., Aguilera, G., Fernandez-Diaz, C., Tricio, A.E., 2009. Comparison of honeys produced by the bee yatei (*Tetragonisca fiebrigi*) in Argentina and Paraguay. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 43, 219 – 226.
- Xiao, L, Li, H., Zhang, J., Yang, F., Huang, A., Deng, J., Liang, M., Ma, F., Hu, M., Huang, Z., 2014. Salidroside protects *Caenorhabditis elegans* neurons from polyglutamine-mediated toxicity by reducing oxidative stress. *Molecules*, 19, 7757 – 7769.
- Yan, H., Hu, W., Zhang, J., Wang, Y., Xia, K., Peng, M., Liu, J., 2014. Resveratrol induces human K562 cell apoptosis, erythroid differentiation, and autophagy. *Tumor Biology*. 35, 5381 – 5388.

- Wang, L.C., Lin, Y.L., Liang, Y.C., Yang, Y.H., Lee, J.H., Yu, H.H., Wu, W.M., Chiang, B.L., 2009. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. *BMC Immunology*. 10, 1 – 13.
- Zeng, H., Ma, J., Yang, R., Jing, Y., Qu, L., 2015. Molecular interactions of flavonoids to hyaluronidase: insights from spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Fluorescence*. 25, 941 – 959.
- Zhang, J., Cao, X., Ping, S., Wang, K., Shi, J., Zhang, C., Zheng, H., Hu, F., 2015. Comparisons of ethanol extracts of chinese propolis (poplar type) and poplar gums based on the antioxidante activities and molecular mechanism. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 2015, 1 – 15.
- Zhao, C.X., Liang, Y.Z., Fang, H.Z., Li, X.N., 2005. Temperature-programmed retention indices for gas chromatographymass spectroscopy analysis of plant essential oils. *Journal of Chromatography A*. 1096, 76 – 85.
- Zhu, W., Chen, M., Shou, Q., Li, Y., Hu, F., 2011. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, 1 – 8.
- Zong, W., Thompson, C.B., 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*. 20, 1 – 15.

Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J., Sforcin, J.M., 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 63, 1378 – 1386.

Anexos

Anexo I

Título do artigo: “Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)”

Revista: Food and Chemical Toxicology

Fator de Impacto: 2.610

Qualis do Periódico: B1

Anexo II

Título do artigo: “Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí)”

Revista: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Fator de Impacto: 1.880

Qualis do Periódico: B1

Anexo III

Parecer do comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Brasil (número do processo no CEP: 123/12)