



UNIVERSIDADE FEDERAL
DA GRANDE DOURADOS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO**

ISAMARA CARVALHO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN*
VITRO E TOXICIDADE *IN VIVO* DO CERUME DA ABELHA
SEM FERRÃO *Tetragonisca fiebrigi* (APIDAE, MELIPONINI)**

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL**

2021

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E
TOXICIDADE *IN VIVO* DO CERUME DA ABELHA SEM FERRÃO
Tetragonisca fiebrigi (APIDAE, MELIPONINI)**

ISAMARA CARVALHO FERREIRA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. JAQUELINE FERREIRA CAMPOS

COORIENTADOR: DANIEL FERREIRA LEITE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F382c Ferreira, Isamara Carvalho

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E TOXICIDADE IN VIVO DO CERUME DA ABELHA SEM FERRÃO *Tetragonisca fiebrigi* (APIDAE, MELIPONINI) [recurso eletrônico] / Isamara Carvalho Ferreira. -- 2021.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Jaqueline Ferreira Campos.

Coorientador: Daniel Ferreira Leite.

TCC (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Estresse oxidativo. 2. Meliponíneos. 3. Produtos apícolas. I. Campos, Jaqueline Ferreira. II. Leite, Daniel Ferreira. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

ISAMARA CARVALHO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E TOXICIDADE
IN VIVO DO CERUME DA ABELHA SEM FERRÃO *Tetragonisca fiebrigi*
(APIDAE, MELIPONINI)**

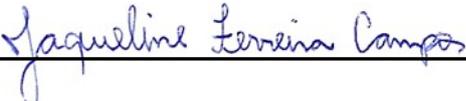
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Ferreira Campos.

Área de Concentração: Biologia Geral.

Aprovado em: 24 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



NOME COMPLETO
Presidente



NOME COMPLETO
Membro



NOME COMPLETO
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que sempre foram a base de tudo em minha vida. Em especial aos meus avós maternos, Geralda Alexandrina de Carvalho e Sebastião Martins de Carvalho Neto, que já partiram desta vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, por me permitir chegar até aqui, por me abençoar com saúde, sabedoria e por iluminar meus caminhos.

Agradeço à minha família, pelo grande apoio e incentivo aos meus estudos. Agradeço ao meu pai, Ademar Luiz Ferreira, por me ensinar que sempre devemos seguir em frente, independente das dificuldades. Agradeço a minha mãe, Maria Eliza de Carvalho Ferreira, por ser um modelo para mim e por cuidar tão bem de nossa família. Agradeço a minha irmã, Sabrina Carvalho Ferreira, por dividir tantos momentos comigo, por me apoiar em diferentes aspectos e por ser, muitas vezes, minha inspiração.

Agradeço ao meu namorado, Carlos Eduardo Aguiar Ceni, por estar ao meu lado, me consolando em momentos difíceis e comemorando cada pequena vitória, desde o cursinho e por todo período da graduação, por ser um grande companheiro, amigo, confidente e por sempre se esforçar para estar ao meu lado e me ver bem.

Agradeço às minhas amigas, Andreyana Cunha Cirelli e Sabrina Narcizo Estevo, por me acolher e me incluir em suas vidas quando cheguei ao Mato Grosso do Sul. Ambas foram muito importantes desde o primeiro dia em que nos conhecemos, obrigada por me proporcionar momentos incríveis, pela construção de tantas memórias boas e por toda confidencialidade e companheirismo. Desejo que nossa amizade seja eterna.

Agradeço aos meus amigos da graduação, em especial, ao meu quarteto, Bárbara Akemi Tersariol Nagamatsu, Éverton Gustavo Miguel Neves e Raíssa Darroz Corrêa, por dividirem o fardo dessa etapa desafiadora em minha vida. Obrigada pelo apoio nos momentos de angústia e pela felicidade compartilhada em muitas situações.

Agradeço à minha orientadora, Jaqueline Ferreira Campos, por toda paciência e dedicação desde 2019. Um exemplo de pessoa e profissional, que não mediu esforços para compartilhar seu conhecimento. Agradeço por contribuir com minha jornada acadêmica e pessoal.

Agradeço ao Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo – GEBBAM por possibilitar a realização deste trabalho, em especial ao professor Edson Lucas dos Santos e a professora Kely de Picoli Souza, pela construção e manutenção de um projeto espetacular que contribui grandemente com

a formação de tantos discentes. Agradeço também aos demais membros do grupo, por toda ajuda direta ou indireta, em especial ao meu co-orientador Daniel Ferreira Leite, pelo auxílio, paciência e dedicação na realização dos ensaios, e aos membros Wellington Henrique Botelho e Débora da Silva Baldivia, por todo apoio e amparo no laboratório.

Agradeço aos membros do GEBBAM, Débora da Silva Baldivia, Helder Freitas dos Santos e Kamila dos Santos Arteman, por aceitar fazer parte da banca da defesa deste trabalho de conclusão de curso, contribuindo com a melhoria do mesmo.

Agraço à Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, pela possibilidade de realização da minha graduação e pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Agraço aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT pelo apoio financeiro.

Agradeço também a todas pessoas que contribuíram, de alguma forma, com a minha graduação e para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Resumo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são normalmente produzidas em nosso organismo e, em baixas concentrações, desempenham importantes funções fisiológicas. Entretanto, seu excesso pode gerar danos a biomoléculas e contribuir com o desenvolvimento de doenças. Nosso organismo possui um sistema de defesa antioxidante endógeno capaz de combater essas espécies reativas. Além de atuar sinergicamente com fontes de antioxidantes exógenos oriundos, por exemplo, de produtos naturais, para inibir os danos oxidativos e manter a homeostase redox. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e toxicidade do cerume da abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*, popularmente conhecida como Jataí. Para determinar a capacidade antioxidante do extrato etanólico de cerume de *T. fiebrigi* (EECT) foram executados ensaios *in vitro*, utilizando os radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}). Também foram conduzidos ensaios para avaliar a capacidade do extrato em inibir a hemólise oxidativa e a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos. Para avaliar a toxicidade do EECT, foi utilizado o modelo animal *Caenorhabditis elegans*, linhagem selvagem N2. Como resultados, observamos que o EECT é capaz de neutralizar os radicais DPPH^{*} e ABTS^{•+} de forma concentração dependente, sendo que o EECT foi capaz de inibir 49,87 % dos radicais DPPH^{*}, na concentração de 3.000 µg/mL, e 78,45 % dos radicais ABTS^{•+}, na concentração de 2.000 µg/mL. Além disso, o extrato inibiu a hemólise de eritrócitos humanos e a peroxidação lipídica, induzidos por AAPH, sendo observado que o EECT foi capaz de inibir 47,33 % da hemólise oxidativa, na concentração de 125 µg/mL depois de 240 min de incubação, além de inibir 41,35 % da peroxidação lipídica, na concentração de 100 µg/mL depois de 120 min de incubação. Também foi possível observar que o extrato não demonstrou ser tóxico para o organismo *C. elegans* nas concentrações e tempo avaliados. Os resultados obtidos servem como base para o desenvolvimento de estudos mais aprofundados ou até mesmo de produtos contendo o cerume, o que contribui para a promoção do conhecimento e conservação da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*.

Palavras-chave: estresse oxidativo; meliponíneos; produtos apícolas.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) are normally produced in our body and, at low concentrations, play important physiological functions. However, its excess can damage biomolecules and contribute to the development of diseases. Our body has an endogenous antioxidant defense system capable of fighting these reactive species. In addition to acting synergistically with exogenous antioxidant sources, for example, from natural products, to inhibit oxidative damage and maintain redox homeostasis. In this context, the present study aimed to evaluate the antioxidant potential and toxicity of the cerumen of the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi*, popularly known as Jataí. To determine the antioxidant capacity of the ethanolic extract of *T. fiebrigi* cerumen (EECT), *in vitro* assays were performed, using the free radicals 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}). Tests were also carried out to evaluate the extract's ability to inhibit oxidative hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes. To assess the toxicity of EECT, the animal model *Caenorhabditis elegans*, wild line N2 was used. As a result, we observed that EECT is able to neutralize DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals in a concentration-dependent manner, the EECT was able to inhibit 49,87 % of DPPH[•] radicals, at a concentration of 3.000 µg/mL, and 78,45 % of ABTS^{•+} radicals, at a concentration of 2.000 µg/mL. In addition, the extract inhibited the oxidative hemolysis of human erythrocytes and lipid peroxidation, induced by AAPH, and it was observed that the EECT was able to inhibit 47,33 % of the hemolysis, at a concentration of 125 µg/mL after 240 min of incubation, in addition to inhibiting 41,35 % of lipid peroxidation, at a concentration of 100 µg/mL after 120 min of incubation. It was also possible to observe that the extract did not prove to be toxic to the *C. elegans* organism at the evaluated concentrations and time. The results obtained serve as a basis for the development of further studies or even of products containing the cerumen, which contributes to the promotion of knowledge and conservation of the stingless bee species *Tetragonisca fiebrigi*.

Key words: oxidative stress; meliponini; bee products.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1: Formação das principais EROs e ERNs no organismo.....	07
Figura 2: Relação entre a geração de EROs e ERNs, a defesa antioxidante, o estresse oxidativo e seus efeitos no corpo humano	08
Figura 3: Principais antioxidantes endógenos e exógenos	10
Figura 4: Formas de interação entre antioxidantes endógenos e exógenos em nosso organismo.....	15
Figura 5: (A) <i>Nannotrigona testaceicornis</i> ; (B) <i>Tetragonisca angustula</i> ; (C) <i>Scaptotrigona</i> sp.; (D) <i>Melipona rufiventris</i> ; (E) <i>Melipona quadrifasciata</i> . (A) e (B) pertencem a tribo Trigonini, enquanto (C), (D) e (E) pertencem a tribo Meliponini ...	16
Figura 6: Arquitetura interna do ninho de meliponíneos.....	17
Figura 7: Exemplar da espécie <i>Tetragonisca fiebrigi</i>	19
Figura 8: (A) representação dos principais produtos apícolas; (B) atividades biológicas relacionadas aos produtos apícolas	20
Figura 9: O cerume é utilizado para construção de potes de mel e pólen, células de cria e do invólucro, apontados na imagem	22
Figura 10: Ciclo de vida do nematoide <i>C. elegans</i>	24
Figura 11: Efeito das diferentes concentrações (1 – 3.000 µg/mL) do EECT e dos padrões ácido ascórbico (AA) e BHT na inibição dos radicais DPPH [•] , expresso como porcentagem de inibição do DPPH [•] . Os valores são expressos como a média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em duplicata.....	36
Figura 12: Efeito das diferentes concentrações (1 – 2.000 µg/mL) do EECT e dos padrões ácido ascórbico (AA) e BHT na inibição dos radicais ABTS ^{•+} , expresso como porcentagem de inibição do ABTS ^{•+} . Os valores são expressos como a média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em duplicata	37
Figura 13: Efeito das diferentes concentrações (50 – 125 µg/mL) do EECT e ácido ascórbico (antioxidante padrão) contra a hemólise induzida por AAPH (50 mM) aos 240 min de incubação. Os valores são expressos como a média ± EPM de dois	

experimentos independentes, realizados em duplicata. * Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$) quando os grupos tratados com EECT ou ácido ascórbico foram comparados ao grupo controle AAPH (eritrócitos incubados apenas com agente oxidante) 38

Figura 14: Efeito das diferentes concentrações (50 – 125 $\mu\text{g/mL}$) do EECT e ácido ascórbico (antioxidante padrão) em eritrócitos humanos, sem adição do agente indutor de hemólise AAPH (50 mM) aos 240 min de incubação. Os valores são expressos como a média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. Os tratamentos com EECT e ácido ascórbico foram comparados ao grupo controle salina (eritrócitos incubados apenas com solução NaCl 0,9 %). 39

Figura 15: Efeito das diferentes concentrações (50 – 125 $\mu\text{g/mL}$) do EECT e ácido ascórbico (antioxidante padrão) na peroxidação lipídica induzida por AAPH (50 mM) aos 120 min de incubação. O controle salina representa eritrócitos incubados apenas com solução NaCl 0,9 %. Os valores são expressos como a média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. * Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$) quando o controle AAPH (eritrócitos incubados apenas com agente oxidante) é comparado com o controle salina (eritrócitos incubados apenas com solução NaCl 0,9 %). # Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$) quando o grupo tratado com EECT e ácido ascórbico foram comparados ao grupo controle AAPH..... 40

Figura 16: Porcentagem de viabilidade dos nematoides *C. elegans* expostos a diferentes concentrações de EECT, além do controle M9 (C. M9) e controle solvente (C. Solvente) em (a) 24 h e (b) 48 h de incubação. Os valores são expressos como a média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata 41

Tabela 1: Parâmetros para análise da toxicidade de produtos naturais no modelo *C. elegans*..... 25

LISTA DE SIGLAS

μg – micrograma

μL – microlitro

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete

5-LOX – 5-lipoxigenase

AA – ácido ascórbico

AAPH – dicloridrato de azobis- (2-amidinopropano)

Abs – absorvância

ABTS^{•+} – 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AlCl_3 – cloreto de alumínio

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – cloreto de alumínio hexahidratado

As – arsênio

ATP – adenosina trifosfato

AU – ácido úrico

B.O.D. – Biochemical Oxygen Demand (demanda bioquímica de oxigênio)

BHT – hidroxitolueno butilado

BIL – bilirrubina

CAT – catalase

Cd – cádmio

CO_3^{2-} – carbonato

CoQ – coenzima Q

CoQH₂ – ubiquinol

Cu^{2+} – cobre

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DNA – ácido desoxirribonucleico

EAG – equivalente de ácido gálico

EECT – extrato etanólico de cerume de *Tetragonisca fiebrigi*

EPM – erro padrão da média

EQ – equivalente de quercetina

ERNS – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

Fe – ferro

Fe ⁺³ – íon férrico
Fe ²⁺ – íon ferroso
g – grama
GPx – glutaciona peroxidase
GRx – glutaciona redutase
GSH – glutaciona reduzida
GSSG – glutaciona oxidada
H – hidrogênio
h – hora
H₂O – água
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
Hg – mercúrio
HNO₂ – ácido nitroso
HOCl – ácido hipocloroso
IC₅₀ – concentração inibitória
Juglone – 5-hidroxi-1,4-naftoquinona
L[•] – radical alquila
LO[•] – alcoxila
LOO[•] – peroxila
LOOH – hidroperóxido lipídico
LTB₄ – leucotrieno B₄
M – molar
MDA – malondialdeído
mg – miligrama
min – minutos
mL – mililitro
mM – milimolar
Mn – manganês
N₂O₃ – trióxido de dinitrogênio
Na₂CO₃ – carbonato de sódio
NaCl – cloreto de sódio
NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaOH – hidróxido de sódio

NGM – Nematode Growth Medium (meio de crescimento de nematoides)

nm – nanômetros

nmol – nanomol

NO[•] – óxido nítrico

NO₂[•] – dióxido de nitrogênio

O₂ – oxigênio

O₂^{-•} – ânion superóxido

O₃ – ozônio

OH⁻ – ânion hidroxila

OH[•] – radical hidroxila

ONOO⁻ – peroxinitrito

ONOOCO₂⁻ – nitrosoperoxicarbonato

Pb – chumbo

RO[•] – radical alcoxila

ROO[•] – radical peroxil

ROOH – hidroperóxido

rpm – rotação por minuto

Se – selênio

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

UV – ultravioleta

XO – xantina oxidase

Zn – zinco

Sumário

	Página
1. Introdução	01
2. Revisão bibliográfica.....	03
2.1. Espécies reativas	03
2.2. Estresse oxidativo.....	07
2.3. Antioxidantes.....	08
2.3.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos.....	10
2.3.2. Antioxidantes endógenos não enzimáticos	11
2.3.3. Antioxidantes exógenos.....	13
2.4. Abelhas sem ferrão	15
2.5. <i>Tetragonisca fiebrigi</i>	18
2.6. Produtos apícolas	19
2.6.1. Cerume.....	21
2.7. Organismo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
3. Objetivos	27
4. Justificativa	28
5. Material e métodos	29
5.1. Identificação das colmeias e obtenção do cerume.....	29
5.2. Preparo do Extrato Etanólico de Cerume de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (EECT)	29
5.3. Ensaio de determinação de compostos fenólicos	29
5.4. Ensaio de determinação do teor de flavonoides	29
5.5. Captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH [•]).....	30
5.6. Captura do radical livre 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS ^{•+}	30
5.7. Ensaio antioxidante utilizando modelo de eritrócito humano.....	31
5.7.1. Preparo da suspensão de eritrócitos	31
5.7.2. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa	31
5.7.3. Ensaio de eficiência inibitória contra a peroxidação lipídica	32
5.8. Linhagens e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	33
5.9. Ensaio de toxicidade aguda	34
5.10. Análises estatísticas	34

6.	Resultados	35
6.1.	Ensaio de determinação de compostos fenólicos	35
6.2.	Ensaio de determinação de flavonoides	35
6.3.	Ensaio de eliminação de radicais livres DPPH'	35
6.4.	Ensaio de eliminação de radicais livres ABTS ^{•+}	36
6.5.	Ensaio de inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH	37
6.6.	Ensaio de inibição da peroxidação lipídica induzida por AAPH	39
6.7.	Ensaio de toxicidade aguda no modelo <i>C. elegans</i>	40
7.	Discussão.....	42
8.	Conclusões	46
	Referências bibliográficas.....	47
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	56

1. Introdução

Os organismos aeróbicos utilizam o oxigênio para geração de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). Como consequência desse processo, as espécies reativas são geradas. As espécies reativas podem ser classificadas como radicais livres, moléculas instáveis que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, ou espécies não radicalares (Pham Huy; He; Pham Huy, 2008).

Normalmente, os produtos da diminuição biológica do oxigênio molecular, gerados durante a cadeia respiratória mitocondrial e nas reações metabólicas endógenas, são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) (Arulselvan, 2016). As EROs podem ser classificadas como radicais livres, incluindo o radical hidroxila (OH^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e peroxila lipídica (LOO^{\bullet}), ou como espécies não radicalares, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e hidroperóxido lipídico (LOOH) (Pham-Huy; He; Pham Huy, 2008).

Em situação de hipóxia, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são formadas. As ERNs são capazes de gerar outras espécies reativas que podem induzir a peroxidação lipídica excessiva (Arulselvan, 2016). As ERNs também podem ser classificadas como radicais livres, incluindo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), ou como espécies não radicalares, incluindo o ácido nitroso (HNO_2), peroxinitrito (ONOO^-) e trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) (ERNs) (Pham Huy; He; Pham Huy, 2008).

As espécies reativas podem desempenhar importantes funções em nosso organismo, quando se encontram em concentrações baixas a moderadas, uma vez que participam de processos relacionados ao sistema imunológico e agem sobre as cascatas de sinalização intracelular, que regulam várias funções fisiológicas, como síntese de insulina, proliferação, diferenciação e migração celular, entre outros (Weidinger; Kozlov, 2015).

No entanto, quando se encontram em altas concentrações, as espécies reativas podem causar danos ao organismo (Singh; Sharad; Kapur, 2004). Isso porque, em alguns momentos, o sistema de defesa antioxidante pode se encontrar sobrecarregado, acarretando no desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, conhecido como estresse oxidativo (Birben *et al.*, 2012).

Estudos buscam compreender os mecanismos relacionados ao estresse oxidativos e suas consequências para saúde humana, sugerindo que o baixo consumo de alimentos ricos em antioxidantes contribui para o agravamento das doenças (Arulseivan, 2016). Por isso, o consumo de produtos naturais que contenham agentes antioxidantes vem sendo considerado uma forma de prevenção ao estresse oxidativo (Lorenzo *et al.*, 2018).

Dentre esses produtos naturais com potencial antioxidante, podemos destacar os produtos apícolas, como mel, própolis, geoprópolis, cera, cerume e geleia real, que são amplamente utilizados desde os primórdios da humanidade para prevenir ou curar feridas, doenças reumáticas, condições imunológicas e neurológicas, distúrbios do trato alimentar, entre outros (Martinello; Mutinelli, 2021).

O cerume é produzido pelas abelhas através da mistura de própolis e cera (Al-Hatamleh *et al.*, 2020). Alguns países, como o Brasil, utilizam esse produto apícola na medicina popular (Popova; Trusheva; Bankova, 2019). Além disso, estudos anteriores já descreveram atividades biológicas, como atividade antioxidante (Hamilton *et al.*, 2017) e atividade anticâncer *in vitro* (Nugitrangson *et al.*, 2016), relacionadas ao cerume de diferentes espécies de abelhas.

Diante desse contexto, o presente estudo buscou avaliar a atividade antioxidante, por meio de ensaios *in vitro* e no modelo de eritrócitos humanos, e a toxicidade, no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*, do cerume da abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*, popularmente conhecida como Jataí. Os resultados obtidos abrem perspectivas para o desenvolvimento de produtos e medicamentos de grande importância para o homem, além da propagação do conhecimento e conservação dessa espécie de meliponíneo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Espécies reativas

As espécies reativas são descritas como sendo pequenos íons/moléculas altamente reativos e instáveis, cujo seu tamanho facilita a entrada por meio de membranas celulares (Jensen, 2003). Essas moléculas podem ser divididas em dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs são formadas como subprodutos do metabolismo aeróbico na mitocôndria (Jensen, 2003). Enquanto as ERNs são formadas como dos processos inflamatórios (Birben *et al.*, 2012).

As EROs e ERNs podem ser classificadas como radicais livres, incluindo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}), que se caracterizam como moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados, ou como espécies não radicalares, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), peroxitrato ($ONOO^-$) que são formados a partir do compartilhamento de elétrons por dois radicais livres (Birben *et al.*, 2012)

A produção das espécies reativas pode ser estimulada por fontes endógenas ou exógenas. Fatores endógenos que induzem a produção dessas moléculas incluem ativação de células imunes, inflamação, isquemia, infecções, processo de envelhecimento e fosforilação oxidativa mitocondrial (Kabel, 2014). Já a poluição do ar e da água, fumaça de cigarro, álcool, metais pesados ou de transição, como cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), ferro (Fe) e arsênio (As), certas drogas, como ciclosporina, tacrolimus, gentamicina e bleomicina, solventes industriais e radiação são considerados fatores exógenos que induzem a produção de radicais livres, capazes de penetrar no organismo por diferentes vias, onde são metabolizados (Pham-Huy; He; Pham-Huy, 2008).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), é produzido na membrana interna da mitocôndria como parte do mecanismo que reduz o oxigênio a água (Jensen, 2003). O ânion superóxido pode existir como hidroperoxila, capaz de penetrar as membranas biológicas, além disso, é considerado um radical primário, uma vez que é capaz de produzir EROs secundárias de forma direta, através da interação com outras moléculas, ou de forma indireta, por meio de enzimas ou reações catalisadas por enzimas (Ifeanyi, 2018). O ânion superóxido pode ser convertido em outras espécies

reativas, como radical hidroxila (OH^{\bullet}) e ânions hidroxila (OH^{-}) por meio da reação de Haber-Weiss (Neha *et al.*, 2019).

O peróxido de hidrogênio é considerado uma espécie reativa de oxigênio devido a sua capacidade de reagir com biomoléculas e causar danos a células (Ifeanyi, 2018). Essa espécie reativa apresenta alta solubilidade em soluções aquosas, o que faz com que penetrem facilmente em membranas biológicas (Ifeanyi, 2018). Além disso é produzido durante a hipóxia, além de ser produzido e consumido pelos peroxissomos nas células (Ifeanyi, 2018).

O peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição, como ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}), se decompõe no radical hidroxila por meio de uma sucessão de reações chamadas reações de Haber-Weiss e Fenton. Além disso, produz ácido hipocloroso (HOCl), por oxidação enzimática de íons cloreto (Jensen, 2003).

O ácido hipocloroso, é considerado um forte agente oxidante para diferentes biomoléculas. É capaz de atravessar membranas e causar danos a proteínas e lipídios de membrana ou de moléculas intracelulares (Durackova, 2014). No meio extracelular, essa espécie reativa é capaz de inibir enzimas proteolíticas, como a elastase, além de reagir com outros compostos, como tiois e ascorbato, e causar fragmentação de proteínas por diferentes mecanismos (Durackova, 2014). O ácido hipocloroso também é capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio para formar o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Durackova, 2014).

O radical hidroxila ocorre como forma neutra do íon hidróxido, apresentando alta reatividade, o sendo extremamente deletério. É considerado um radical com meia vida curta, capaz de reagir com moléculas próximas que apresentam afinidade (Ifeanyi, 2018). Também é capaz de iniciar a peroxidação lipídica por abstração de hidrogênio de um ácido graxo insaturado, além de causar hidroxilação, oxidação e clivagem de proteínas e ácidos nucleicos (Jensen, 2003).

O oxigênio singlete é produzido a partir do oxigênio molecular por meio de transferência de elétrons, principalmente durante processos inflamatórios e de fotossensibilização (Ifeanyi, 2018). Essa espécie reativa é capaz de causar efeitos deletérios ao DNA (Ifeanyi, 2018), além de poder reagir com um ácido graxo e dar origem ao hidroperóxido lipídico (LOOH), que é considerado o principal produto da peroxidação lipídica (Pospíšil; Yamamoto, 2017).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia de radical livre que compreende três etapas principais: iniciação, propagação e término. Os radicais livres podem atacar os ácidos graxos poliinsaturados, fazendo com que um átomo de hidrogênio seja removido do grupo metileno dando início as reações de peroxidação lipídica em cadeia (Pospíšil; Yamamoto, 2017).

Quando o átomo de hidrogênio é removido, apenas um elétron permanece no carbono do ácido graxo. Então, para eliminar o enfraquecimento da ligação carbono-hidrogênio no átomo de carbono adjacente à ligação dupla, o radical centrado no carbono forma o dieno conjugado. O dieno conjugado reage com o oxigênio, formando o radical peroxila (LOO^{\bullet}), que inicia uma reação em cadeia removendo o átomo de hidrogênio de outro ácido graxo (Yaman; Ayhanci, 2021). Os radicais peroxila são capazes de reagir entre si, atacar as proteínas da membrana ou quebrar os átomos de hidrogênio das cadeias de ácidos graxos vizinhas, levando à progressão da reação em cadeia da peroxidação lipídica. Na última etapa da peroxidação lipídica, os radicais peroxila se autodestroem, passando a formar produtos não radicalares, como o malondialdeído (MDA), que podem causar danos a biomoléculas, reagindo com proteínas de membrana vizinhas ou se difundindo com moléculas distantes, como o DNA (Yaman; Ayhanci, 2021).

Os radicais alcóxila (LO^{\bullet}) e peróxil (ROO^{\bullet}) são relacionados à peroxidação de ácidos graxos em lipídios. O radical peróxil é formado a partir de radicais centrados em carbono na presença de oxigênio (Durackova, 2014). Tanto o radical alcóxila, quanto o peróxil podem ser formados durante a decomposição de hidroperóxidos (ROOH) por aquecimento e radiação UV e na presença de íons de metal de transição. Esses radicais são antioxidantes com alto potencial eletroquímico, podendo ser decompostos através do superóxido protonado em radical peróxil e peróxido de hidrogênio. Ambos podem abstrair o átomo de hidrogênio de outras moléculas, levando à ramificação da lipoperoxidação (Durackova, 2014).

As espécies reativas de nitrogênio possuem alta capacidade de oxidação e, portanto, são importantes no processo de estresse oxidativo (Ifeanyi, 2018). Essas espécies reativas são derivadas de um radical produzido biologicamente, conhecido como óxido nítrico (NO^{\bullet}) (López-Alarcón; Denicola, 2013). O óxido nítrico é produzido pela enzima óxido nítrico sintase, sendo considerado um radical livre altamente reativo, capaz de promover danos a carboidratos, lipídios, proteínas e nucleotídeos,

tendo como consequência inflamação e danos aos tecidos (Mathew; Tiwari; Jatawa, 2011).

O óxido nítrico é um radical solúvel em meios aquosos e lipídicos, permitindo a difusão no citoplasma por meio de membranas biológicas. Tem meia vida de poucos segundos em meio aquoso, sendo mais estável na presença de menores concentrações de oxigênio (Ifeanyi, 2018). Durante o processo inflamatório, as células imunes produzem óxido nítrico e superóxido por meio de explosão oxidativa. Nessas condições, o óxido nítrico e o ânion superóxido podem reagir e produzir quantidades significativas de ânion peroxinitrito (ONOO^-), considerado um potente agente oxidante capaz de promover fragmentação do DNA e oxidação de lipídios (Ifeanyi, 2018).

Na ausência de gás carbônico, o peroxinitrito se decompõe em radical hidroxila e em dióxido de nitrogênio (NO_2^*). Porém, na presença de gás carbônico, é capaz de formar nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), que quando hemolisado libera carbonato (CO_3^-) e dióxido de nitrogênio (Reiter, 2006).

Em altas concentrações, o óxido nítrico pode ser oxidado por moléculas de oxigênio, gerando trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), considerado um potente agente nitrosante dominante em pH fisiológico (Reiter, 2006). A geração do trióxido de dinitrogênio ocorre em duas etapas: primeiro o óxido nítrico reage com o oxigênio (O_2) para gerar dióxido de nitrogênio, posteriormente ocorre a reação do dióxido de nitrogênio com uma segunda molécula de óxido nítrico, produzindo o trióxido de dinitrogênio, que não é considerado um antioxidante potente, mas é capaz de nitrosar aminas secundárias e reduzir grupos tiol (Reiter, 2006).

Na **Figura 1** é possível observar um esquema que ilustra a formação de EROs e ERNs em nosso organismo.

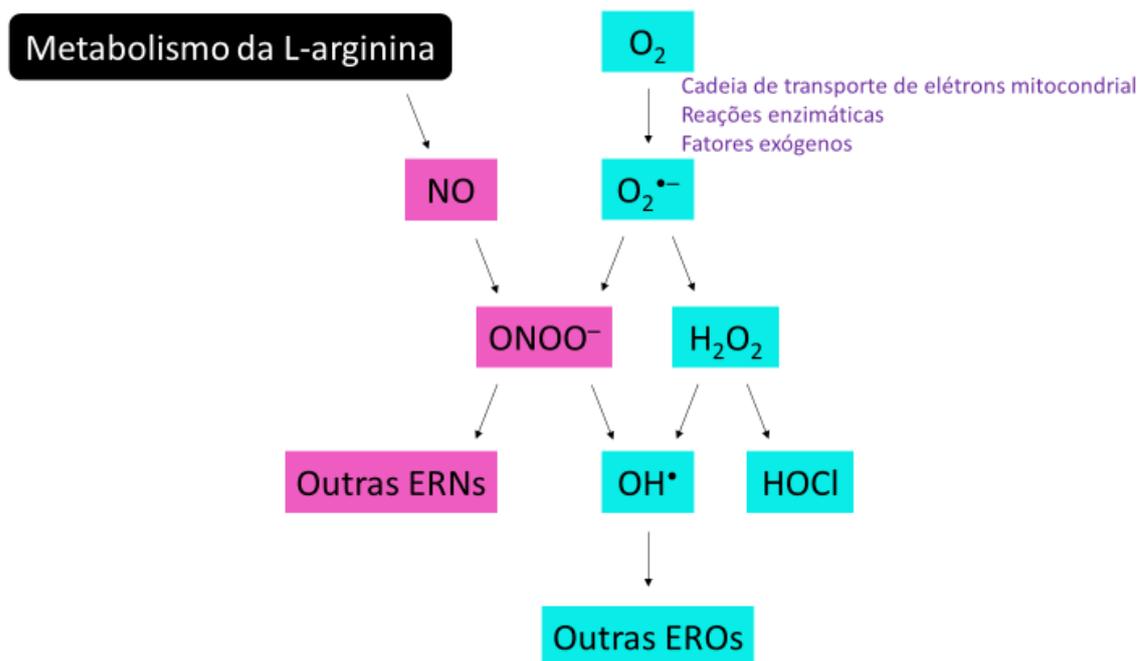


Figura 1: Formação das principais EROs e ERNs no organismo. **Adaptado de:** Vo *et al.* (2020).

As EROs e ERNs, quando se encontram em condições baixas ou moderadas, podem desempenhar importantes funções em nosso organismo. Por exemplo, o óxido nítrico (NO^*) é importante na regulação da pressão arterial, além de atuar como mensageiro neural, já o ácido hipocloroso (HOCl) age combatendo infecções microbianas (Jensen, 2003). Além disso, existem sistemas antioxidantes que agem eliminando as EROs e ERNs, contribuindo para a prevenção de possíveis danos (Yoshikawa; Naito, 2002). No entanto, quando há o aumento da produção de espécies reativas ou a dificuldade do sistema antioxidante em neutralizar o dano oxidativo em alvos biológicos, um estado de desequilíbrio, conhecido como estresse oxidativo, é estabelecido (López-Alarcón; Denicola, 2013).

2.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante, em favor do primeiro (Sies, 2018). Esse estado de desequilíbrio pode ser classificado de acordo com a intensidade, podendo ocorrer como um estresse oxidativo fisiológico, denominado eustress oxidativo, ou como uma carga oxidativa tóxica, capaz de danificar as biomoléculas, denominado estresse oxidativo (Sies, 2018).

As consequências do estresse oxidativo em nosso organismo incluem, por exemplo, danos a membranas biológicas e tecidos (Yoshikawa; Naito, 2002). Além disso, várias doenças, como câncer, distúrbios neurológicos, aterosclerose, hipertensão, isquemia/perfusão, diabetes, síndrome do desconforto respiratório agudo, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma estão sendo associadas a esse estado de desequilíbrio oxidativo (Birben *et al.*, 2012). A **Figura 2** demonstra a relação entre a geração de espécies reativas, o estresse oxidativo e os danos causados ao organismo.

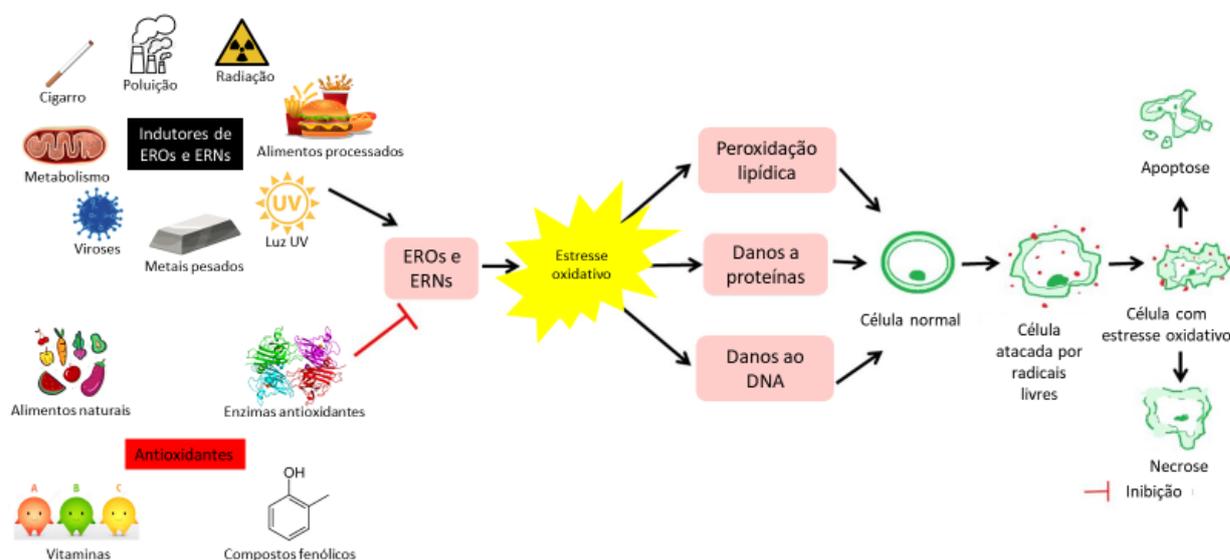


Figura 2: Relação entre a geração de EROs e ERNs, a defesa antioxidante, o estresse oxidativo e seus efeitos no corpo humano. **Adaptado de:** Sharifi-Rad *et al.* (2020).

No entanto, o corpo possui vários mecanismos de defesa para minimizar os danos e para proteger contra a produção excessiva de espécies reativas. Os antioxidantes, endógenos e exógenos, são os componentes desses mecanismos de defesa (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

2.3. Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas que agem combatendo, prevenindo ou reparando os danos causados por espécies reativas às células (Kabel, 2014). Nosso organismo conta com um sistema de defesa antioxidante endógeno que pode ser complementado por antioxidantes exógenos, obtidos de fontes naturais ou sintéticas.

Ambos trabalham juntos para proteger as células e neutralizar os radicais livres (Mathew; Tiwari; Jatawa, 2011).

Reações de oxidação normalmente ocorrem em nosso organismo e são consideradas essenciais para vida, porém, podem também gerar radicais livres, capazes de desencadear reações em cadeia que danificam biomoléculas e células (Kabel, 2014). Assim, o papel dos antioxidantes é evitar que essas reações em cadeia ocorram, através da remoção de radicais intermediários ou pela inibição de outras reações de oxidação (Kabel, 2014).

Os antioxidantes podem defender o organismo por três formas principais: através do sequestro de metais de transição, evitando a disponibilidade para reação com radicais livres, por meio da disponibilização de pequenas moléculas com capacidade de eliminar radicais livres ou por meio de mecanismos que corrigem os danos causados ao DNA por EROs e ERNs (Ifeanyi, 2018).

Os antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes endógenos, subdivididos em enzimáticos e não enzimáticos, ou antioxidantes exógenos, obtidos principalmente através da ingestão de produtos naturais (Neha *et al.*, 2019). A **Figura 3** demonstra, por meio de um esquema, os principais antioxidantes endógenos e exógenos que serão descritos neste trabalho.

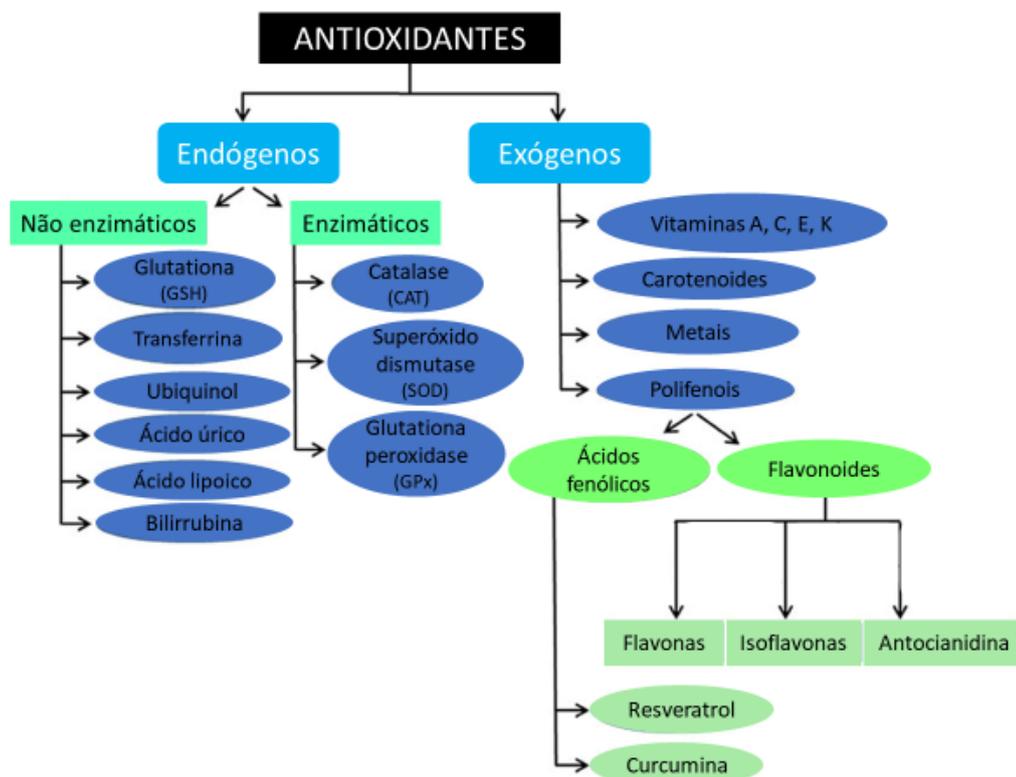


Figura 3: Principais antioxidantes endógenos e exógenos. **Adaptado de:** Simioni *et al.* (2018).

2.3.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos

Quando o organismo se encontra saudável, existe equilíbrio entre a formação de espécies reativas e mecanismos de defesa antioxidante endógenos (Arulselvan, 2016). Os antioxidantes endógenos podem ser subdivididos em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos (Pham-Huy; He; Pham-Huy, 2008). Os principais antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GRx) (Pham-Huy; He; Pham-Huy, 2008).

Superóxido dismutases (SODs) são uma classe de enzimas presentes em quase todas as células e nos fluídos extracelulares, que agem catalisando a quebra do ânion superóxido liberando oxigênio e peróxido de hidrogênio (Ifeanyi, 2018). Contém íons metálicos, como cobre, zinco, manganês e ferro em seus sítios ativos, sendo que Mn-SOD é encontrada na mitocôndria e peroxissomos, Fe-SOD é encontrada em peroxissomos e CuZn-SOD é encontrada em peroxissomos e no citosol (Kabel, 2014).

A enzima catalase (CAT) é predominante em células expostas ao oxigênio, também age na decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

Apresentam altas taxas de renovação e ocorrem em todos os órgãos, principalmente no fígado (Ifeanyi, 2018). Além disso, essa enzima ocorre principalmente nos peroxissomos das células (Durackova, 2014).

A função antioxidante do tripeptídeo glutatona (GSH) é realizada, em grande parte, pelas reações catalisadas pela enzima glutatona peroxidase (GPx), que age reduzindo o peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido lipídico à medida que a glutatona é transformada em glutatona oxidada (GSSG) (Lu, 2013). A glutatona é mantida nas células na forma reduzida pela ação da glutatona redutase (GR), que por sua vez é responsável por catalisar a redução da glutatona oxidada para glutatona, tendo como cofator o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) (Durackova, 2014).

2.3.2. Antioxidantes endógenos não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido lipoico, glutatona, L-arginina, coenzima Q, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metais, transferrina, dentre outros, que são produzidos pelo metabolismo e atuam principalmente como eliminadores nas reações em cadeia oxidativa (Pham-Huy; He; Pham-Huy, 2008).

O ácido lipoico é um importante antioxidante endógeno, classificado como “tiol” ou “biotiol”. Sua molécula contém enxofre, por isso está envolvida na reação que catalisa a descarboxilação oxidativa de alfa-cetoácidos, como piruvato e alfa-cetoglutarato, no Ciclo de Krebs. O ácido lipoico também pode exercer seu efeito antioxidante por quelação com metais pró-oxidantes (Yadav *et al.*, 2016).

A glutatona é um tripeptídeo sintetizado nas células da maioria dos organismos aeróbicos a partir dos aminoácidos glicina, glutamato e cisteína. Sua atividade antioxidante se deve ao grupo tiol na cisteína que é caracterizado como um agente redutor, que pode ser reversivelmente oxidado e reduzido (Kabel, 2014). A glutatona é considerada um importante antioxidante solúvel em água, extinguindo diretamente os radicais livres e desempenhando um papel importante no metabolismo xenobiótico (Yadav *et al.*, 2016).

Proteínas como a transferrina, ferritina e lactoferrina são consideradas antioxidantes por sua capacidade de quelar íons férricos e outros metais de transição conferindo, assim, proteção contra espécies reativas geradas por ferro, principalmente

os radicais hidroxila gerados durante as reações de Fenton (Pisoschi *et al.*, 2021). Como resultado, ocorre a diminuição da peroxidação lipídica dependente de ferro (Pisoschi *et al.*, 2021).

A forma reduzida da coenzima Q (CoQ), o ubiquinol (CoQH₂), atua como antioxidante através da eliminação direta dos radicais livres ou através do aumento da disponibilidade de ascorbato (vitamina C na forma ionizada) e tocoferol (vitamina E) (Paunović *et al.*, 2017). O ubiquinol também é capaz de reagir diretamente com superóxido, com o radical lipídico e com o radical peroxil (Durackova, 2014).

Outro importante agente antioxidante é a melatonina, capaz de atravessar facilmente as membranas celulares. Uma vez que esse antioxidante é oxidado, não pode ser novamente reduzido ao estado anterior, porque forma produtos estáveis quando reage com radicais livres. Por isso, é conhecido como antioxidante terminal ou suicida (Ifeanyi, 2018).

A bilirrubina (BIL) é formada a partir da degradação da hemoglobina e de outras proteínas heme pelo sistema fagocitário mononuclear. Muitos efeitos benéficos foram associados a concentrações moderadas de bilirrubina, incluindo atividade anti-inflamatória, anti-aterosclerótica, anti-adiposidade e atividade antioxidante contra os radicais peroxil em meios polares, como bicamadas lipídicas (Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018).

O ácido úrico (AU) é gerado durante o metabolismo das purinas. Esse composto é considerado um eliminador de radicais livres ativo, responsável por dois cerca de 60 % da capacidade de eliminação de radicais livres do plasma sanguíneo (Pisoschi *et al.*, 2021). O ácido úrico também contribui na proteção de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, sendo capaz de modular a atividade dessas enzimas, adiando a inativação das mesmas pela ação do peróxido de hidrogênio (Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018). O potencial antioxidante desse composto está relacionado ao fato de que os radicais urato, formados na reação entre ácido úrico e peróxido de hidrogênio, apresentam menor potencial oxidativo do que outros radicais de oxigênio, além de poder reagir com o ácido ascórbico e regenerar o ácido úrico (Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018).

2.3.3. Antioxidantes exógenos

O sistema antioxidante do corpo humano pode ser enriquecido com antioxidantes exógenos provenientes de fontes naturais ou sintéticas, que contribuem na prevenção e tratamento de doenças promovidas pelo estresse oxidativo (Sen *et al.*, 2010). Os antioxidantes exógenos incluem vitamina E, vitamina C, carotenoides, metais (selênio (Se), manganês (Mn), zinco (Zn)), compostos fenólicos (incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), ácidos graxos (ômega-3 e ômega-6), entre outros (Pham-Huy; He; Pham-Huy, 2008).

Os antioxidantes exógenos são essenciais para o processo de restauração e manutenção do equilíbrio em nosso organismo, uma vez que contribuem com a ação dos antioxidantes endógenos para neutralizar o excesso de radicais livres, proteger as células contra seus efeitos tóxicos e auxiliam na prevenção de doenças (Pham-Huy; He; Pham-Huy, 2008). Por isso, vem sendo sugerido que a ingestão de uma dieta rica em antioxidantes está inversamente associada ao risco do desenvolvimento de algumas doenças (López-Alarcón; Denicola, 2013).

O ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C, é considerado o mais importante antioxidante solúvel em água. Sua ação envolve a neutralização de espécies reativas na fase aquosa, antes de ocorrer a peroxidação lipídica (Singh; Sharad; Kapur, 2004). A vitamina C é capaz de aumentar a resposta imunológica, além de prevenir a formação de nitrosaminas. As nitrosaminas são uma classe de compostos formado pela ligação de um grupo nitroso a uma amina, considerados potentes agentes genotóxicos e carcinógenos (Ifeanyi, 2018).

A vitamina C apresenta outra importante função, a de regenerar o tocoferol, popularmente conhecido como vitamina E (Yadav *et al.*, 2016). A vitamina E é um importante antioxidante primário, solúvel em lipídios, que apresenta atividade antioxidante dentro da membrana celular, protegendo os ácidos graxos da peroxidação lipídica (Yadav *et al.*, 2016).

Os carotenoides são compostos pigmentados, sintetizados por plantas e microrganismos, sendo encontrados em frutas e vegetais que constituem as principais fontes desses compostos (Kaur, 2013). O betacaroteno e outros carotenoides também atuam protegendo os tecidos ricos em lipídios contra agentes oxidantes (Singh; Sharad; Kapur, 2004).

Os compostos fenólicos são formados a partir do metabolismo secundário de plantas, sendo responsáveis pela pigmentação, adstringência e proteção contra a luz ultravioleta, parasitas e insetos (Albuquerque *et al.*, 2021). Essas substâncias apresentam diferentes benefícios a saúde, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e antioxidante, sendo a última associada a capacidade de doação de um átomo de hidrogênio e/ou um elétron aos radicais livres, causando a quebra da reação de oxidação em cadeia (Albuquerque *et al.*, 2021).

A estrutura química dos compostos fenólicos é formada por hidroxilas ligadas a um, ou mais, anéis benzênicos. Essa estrutura pode variar sendo que, de acordo com o número e os elementos estruturais dos grupos fenólicos, esses compostos podem ser classificados em: flavonoides, estilbenos, lignanas e ácidos fenólicos (Ge *et al.*, 2021).

Os flavonoides são encontrados em folhas, flores, frutas, sementes, nozes, grãos, especiarias, diferentes plantas medicinais e bebidas como vinho, chá e cerveja (Singh; Sharad; Kapur, 2004). Além de apresentar potente atividade antioxidante, apresentam atividade antitumoral, anti-isquêmica, antialérgica, anti-hepatotóxicas, antiulcerativas e anti-inflamatória (Singh; Sharad; Kapur, 2004).

A **Figura 4** ilustra a interação entre os antioxidantes endógenos e exógenos em nosso organismo.

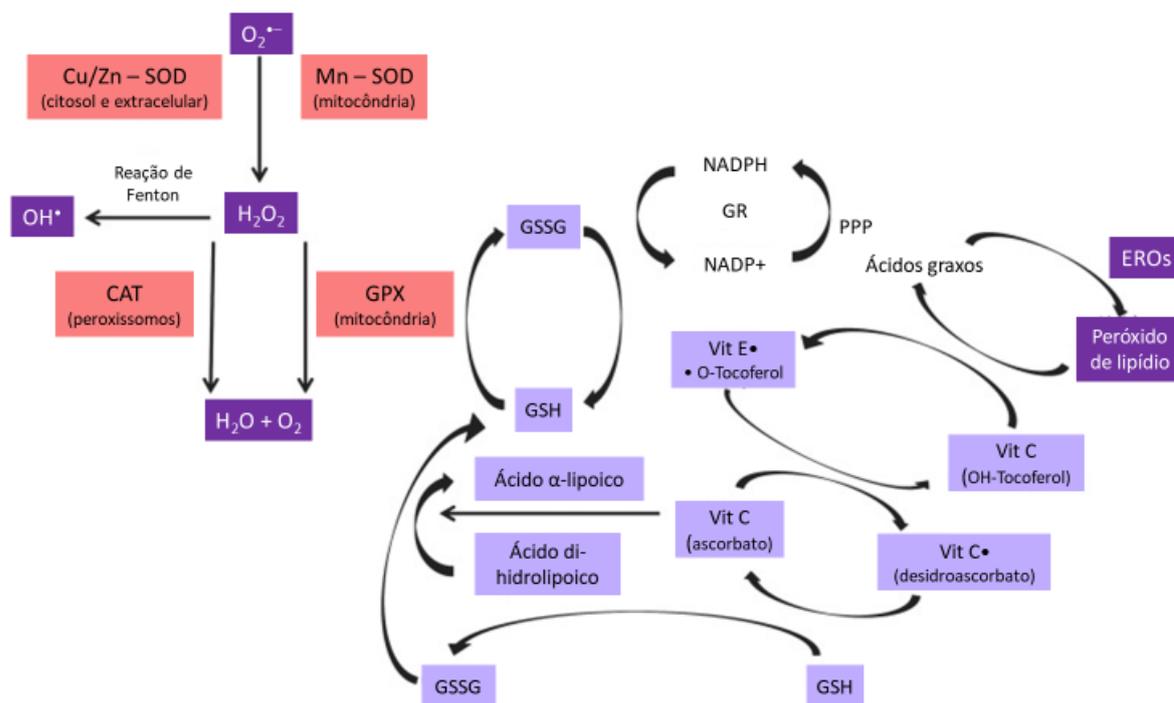


Figura 4: Formas de interação entre antioxidantes endógenos e exógenos em nosso organismo.

Adaptado de: Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018.

2.4. Abelhas sem ferrão

Antes das abelhas *Apis mellifera* serem introduzidas no continente americano, as abelhas sem ferrão eram a principal fonte de mel e cera para as populações locais (Flores, Hilgert; Lupo, 2018). As abelhas sem ferrão pertencem a subfamília Meliponinae (*Hymenoptera*, Apidae), dividida em duas tribos: Meliponini e Trigonini, que juntas somam cerca de 61 gêneros e mais de 550 espécies (Pimentel *et al.*, 2021).

As espécies da tribo Meliponini estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na Austrália, sudeste da Ásia, África e América Latina. Já as espécies da tribo Trigonini ocorrem em todas as regiões tropicais do mundo (Pimentel *et al.*, 2021). No Brasil já foram descritas mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão, sendo 244 espécies nativas do país (Domingues *et al.*, 2020), incluindo a espécie *Tetragonisca fiebrigi*, que faz parte da tribo Trigonini e é popularmente conhecida como Jataí ou abelha-ouro (Dorneles; Rosa; Blochtein, 2017). A **Figura 5** traz alguns exemplos de espécies de abelhas sem ferrão que ocorrem no Brasil.

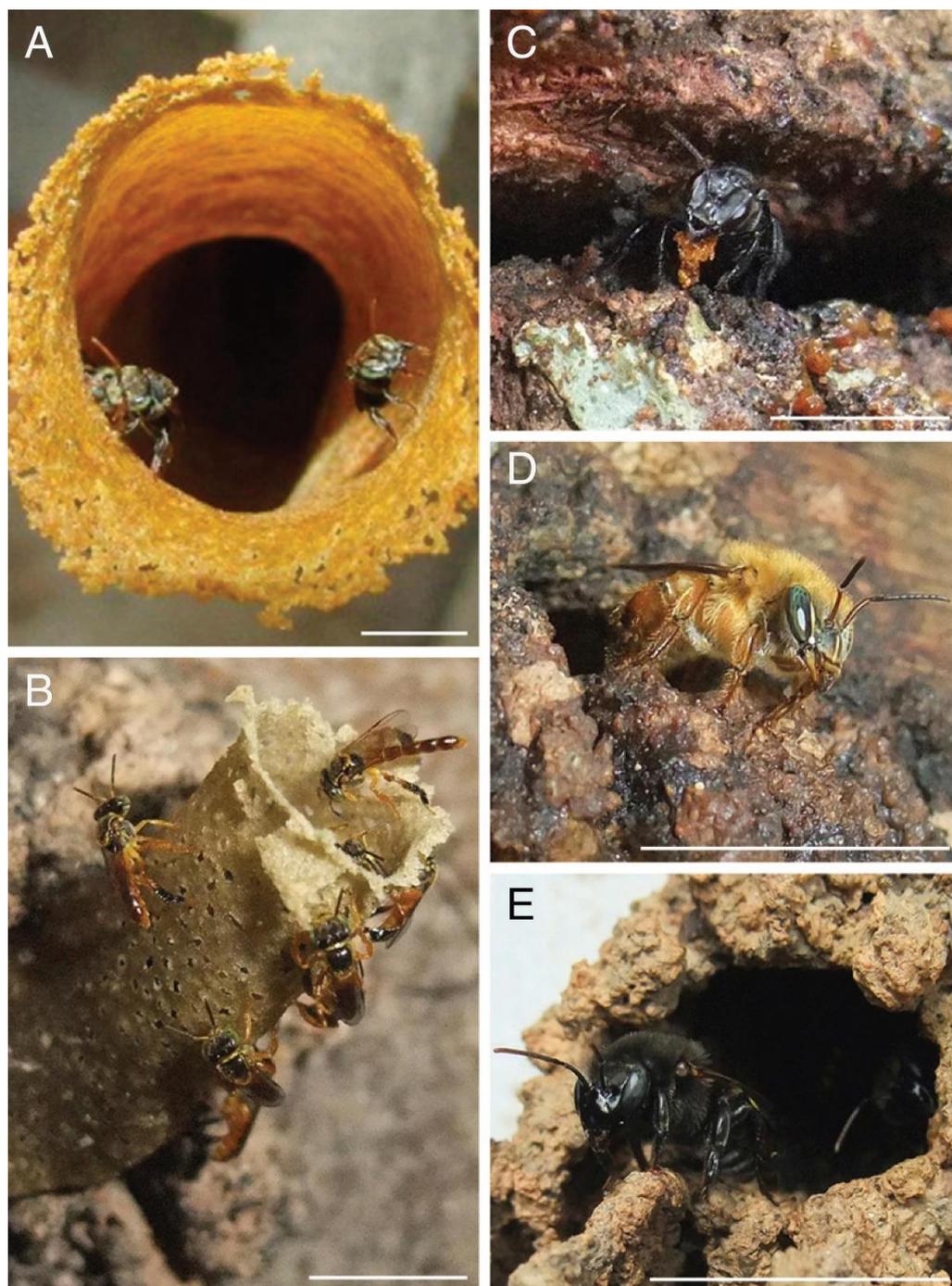


Figura 5: (A) *Nannotrigona testaceicornis*; (B) *Tetragonisca angustula*; (C) *Scaptotrigona* sp.; (D) *Melipona rufiventris*; (E) *Melipona quadrifasciata*. (A) e (B) pertencem a tribo Trigonini, enquanto (C), (D) e (E) pertencem a tribo Meliponini. **Fonte:** Lavinias *et al.* (2019).

As abelhas sem ferrão são assim chamadas, pois nessas espécies o ferrão é altamente reduzido, não servindo como mecanismo de defesa (Popova; Trusheva; Bankova, 2019). Uma provável explicação para a perda do ferrão neste grupo está relacionada ao fato de que as colônias não ficam expostas quando as abelhas

enxameiam, além disso, geralmente os locais de nidificação são escondidos e bem protegidos (Stuchi *et al.*, 2014).

Os ninhos normalmente são construídos em troncos de árvores, em fendas de rochas, em buracos feitos por outros animais, entre outros locais. Os materiais utilizados na construção dos ninhos incluem cera, cerume e resinas vegetais, algumas espécies também utilizam solo nesse processo, para produção da geoprópolis, por exemplo (Roubik, 2006). A **Figura 6** demonstra como é a estrutura interna de um ninho de abelhas sem ferrão.

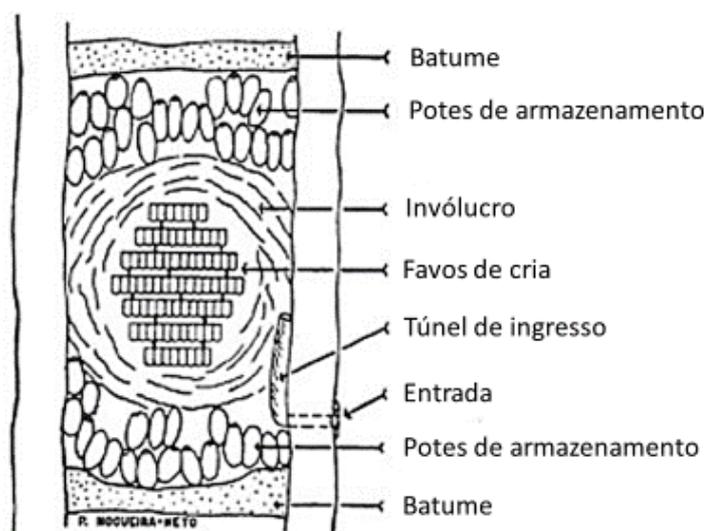


Figura 6: Arquitetura interna do ninho de meliponíneos. **Fonte:** Nogueira-Neto, 1997.

As abelhas sem ferrão formam um grupo de insetos diverso, apresentando alta variabilidade na fisiologia, morfologia e tamanho, variando de 0,2 mm no gênero *Trigonisca* a mais de 20 mm em algumas espécies de *Melipona* (Stuchi *et al.*, 2014). São consideradas insetos eussociais, uma vez que as colônias são formadas por uma rainha fértil e por dezenas a milhares de operárias (Popova; Trusheva; Bankova, 2019).

Essas abelhas são produtoras de mel, cera, própolis e outros produtos, que podem ser utilizados pelos humanos (Brodkiewicz; Reynoso; Vera, 2020). Além disso, possuem um papel crucial na polinização de plantas, sendo responsáveis por cerca de 40 – 90 % da polinização de espécies nativas ou cultivadas nos trópicos (Popova; Trusheva; Bankova, 2019).

2.5. *Tetragonisca fiebrigi*

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão já descritas, a espécie *Tetragonisca fiebrigi*, ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil, incluindo os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (Camargo; Pedro, 2013). Essa espécie apresenta grande importância ecológica devido a polinização de diversas culturas vegetais, além de importância econômica e alimentar, uma vez que reservas de mel e pólen de espécies de *Tetragonisca* foram relatadas como culturalmente importantes e apreciadas na culinária e medicina tradicional, desde os tempos antigos (Vossler; Fagúndez; Blettler, 2014).

As abelhas *T. fiebrigi* são popularmente conhecidas como Jataí. Essas abelhas são pequenas, sociais e vivem em colônias perenes (Martínez *et al.*, 2017). Além disso, produzem mel de ótima qualidade (Vossler; Fagúndez; Blettler, 2014). Por isso, desenvolvimento da meliponicultura utilizando essa espécie vem ganhando impulso, sendo esta atividade responsável pela geração de recursos econômicos e pela promoção da diversidade biológica, devido ao seu papel na polinização cruzada (Martínez *et al.*, 2017).

Estudos relacionados a espécie *T. fiebrigi* incluem a pesquisa de Campos *et al.* (2015), onde os autores apontam a presença de compostos fenólicos, álcoois e terpenos na composição do extrato etanólico da própolis produzida por esta espécie, além da atividade antimicrobiana, potencial anti-inflamatório, atividade citotóxica e antioxidante. Já Brodkiewicz; Reynoso; Vera (2020) relataram os efeitos anti-inflamatórios, antitússicos e expectorantes dos extratos alcoólicos de geoprópolis de *T. fiebrigi*.

Schvezov *et al.* (2020) fizeram uma análise das propriedades microbiológicas e físico-químicas do mel produzido pelas abelhas *T. fiebrigi*. Os resultados obtidos demonstraram que os parâmetros físico-químicos e biológicos do mel da jataí diferem dos valores padrões do mel de *Apis mellifera*, mas são semelhantes ao mel de outras abelhas sem ferrão. Os autores identificaram contaminação por *Escherichia coli*, sendo os tratamentos de preservação, pasteurização e desumidificação capazes de eliminar essa contaminação, além disso, os autores também observaram que há influência sazonal nos parâmetros microbiológicos, de acidez, pH, sacarose e atividade diástase do mel.

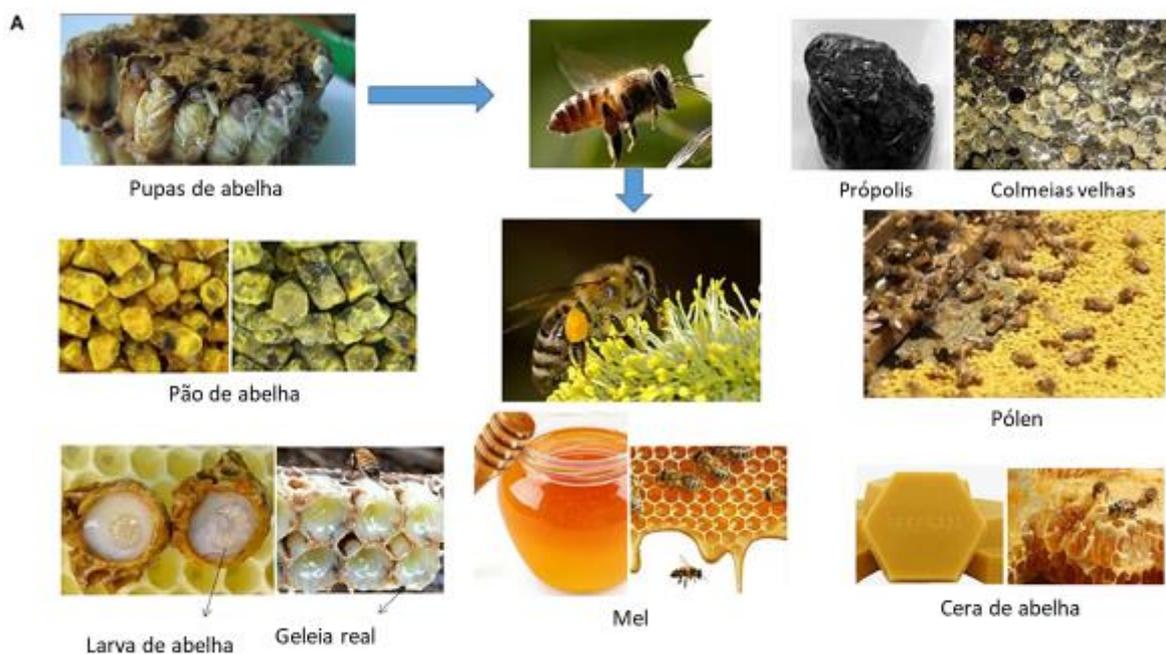
Na **Figura 7** é possível observar um exemplar da espécie *T. fiebrigi*.



Figura 7: Exemplar da espécie *Tetragonisca fiebrigi*. **Fonte:** Fototeca Cristiano Menezes, FCM.

2.6. Produtos apícolas

Produtos naturais como as plantas, por exemplo, apresentam muitos benefícios ao ser humano, incluindo atividade antioxidante (Maury *et al.*, 2020). Dentre estes, podemos destacar os produtos apícolas, que atualmente têm sido alvo de estudos científicos que comprovaram as atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral e muitas outras (Martinello; Mutinelli, 2021). A **Figura 8** apresenta alguns produtos apícolas, relacionando-os as suas atividades biológicas.



B

Produtos apícolas	Principais compostos	Bioatividade	
Coleta de abelhas e produtos de fermentação	Pólen de abelha	Carboidratos, proteínas, lipídios, polifenóis e flavonoides	Antibiótico, antialérgico, antianêmico, antitussígeno, diurético, digestivo, cardioprotetor, hepatoprotetor, função renal imunomoduladora, cicatrização de úlcera, etc.
	Mel	Carboidratos e flavonoides	Antioxidante, antibacteriano, curativo de ferida, anti-inflamatório, antiúlcera, antitumoral, remédio para tosse, dor de garganta, dores de ouvido, etc.
Colmeias e corpos ecológicos de abelha	Própolis	Polifenóis e flavonoides	Antibacteriano, antioxidante, antiviral, anti-inflamatório, antitumoral, antiproliferativo, anti-hiperglicêmico, antifúngico, ação odontológica, antiprotzoário, etc.
	Larvas de abelha		
	Pupas de abelha	Proteínas, lipídios e açúcares	Antitumoral, anti-metástase, alivia a depressão, inibe o desenvolvimento de dermatites atópicas como lesões cutâneas etc.
Secreções de abelhas	Colmeias velhas		
	Veneno de abelha	Peptídeos e proteínas	Antimicrobiano, anti-inflamatório, antiapoptótico, indutor de apoptose, curador de feridas, estimula o crescimento de células de tímócitos, etc.
	Geleia real	Carboidratos, proteínas, lipídios, polifenóis e flavonoides	Antitumoral, antioxidante, anti-envelhecimento, neurotrópico, anti-inflamatório, etc.
Outros	Cera de abelha	Proteínas, lipídios, polifenóis, flavonoides e hidrocarbonetos	Antimicrobiano, antiúlcera, anti-inflamatório, etc.
	Pão de abelha	Carboidratos, proteínas, lipídios, polifenóis e flavonoides	Antioxidante, antimicrobiano, antitumoral, anti-hipertensivo, neuroprotetor, etc.

Figura 8: (A) representação dos principais produtos apícolas; (B) atividades biológicas relacionadas aos produtos apícolas. **Adaptado de:** Luo *et al.* (2021).

Os produtos apícolas como mel, pólen, geleia real, cerume, geoprópolis, própolis, cera, entre outros, apresentam grande valor econômico e/ou nutricional, além de diversos compostos bioativos em sua composição. Esses produtos são ricos em proteínas, açúcares simples, aminoácidos essenciais e ácidos graxos monoinsaturados (Yucel; Topal; Kosoglu, 2017).

Os compostos bioativos encontrados na composição de produtos apícolas incluem ácidos fenólicos, flavonoides e carotenoides, que apresentam atividade antioxidante e contribuem na ação contra doenças como câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, enfraquecimento do sistema imune, Parkinson, Alzheimer, artrite, entre outras (Yucel; Topal; Kosoglu, 2017).

A bioatividade e composição química dos produtos apícolas depende das fontes de resina utilizadas pelas abelhas sem ferrão, sendo assim dependente da flora da região onde as espécies ocorrem (Popova; Trusheva; Bankova, 2019).

2.6.1. Cerume

O cerume é produzido por meio da mistura de própolis e cera, sendo empregado exclusivamente por meliponíneos (Roubik, 2006). A própolis é um material resinoso, composto por folhas, cascas e botões de flores coletados de fontes vegetais, sendo posteriormente misturado com cera e enzimas salivares secretadas pelas abelhas (Salleh *et al.*, 2021) A cera é secretada por abelhas operárias, através de glândulas dorsais, sendo depois colocada em um depósito. Para produção do cerume, as operárias misturam a cera e a própolis em suas mandíbulas (Roubik, 2006).

Além de ser usado para construção de estruturas do ninho, como invólucro, pilares, potes de armazenamento, células de cria e entrada dos ninhos, o cerume pode ser usado para realização de reparos de emergência em danos causados por inimigos (Roubik, 2006). O cerume também contém substâncias que protegem a colmeia contra infecções bacterianas e potencialmente pode apresentar importantes atividades terapêuticas para o ser humano (Hamilton *et al.*, 2017). Na **Figura 9** podemos observar as estruturas construídas com cerume pelas abelhas.

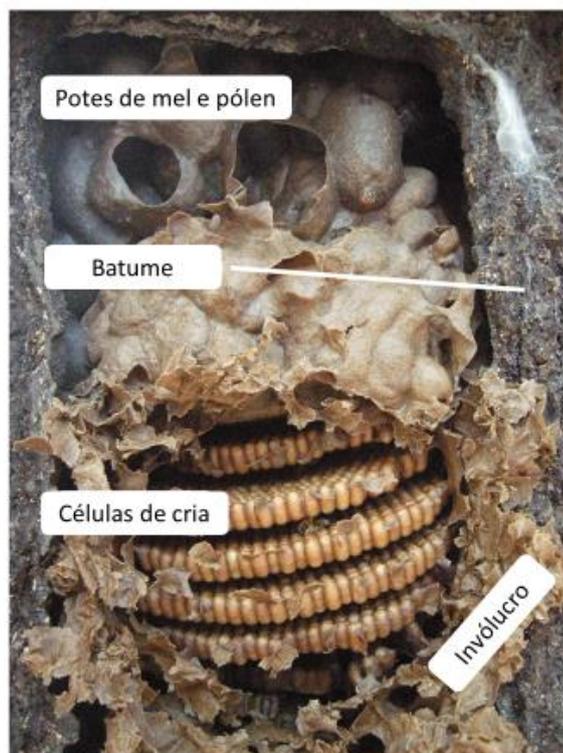


Figura 9: O cerume é utilizado para construção de potes de mel e pólen, células de cria e do invólucro, apontados na imagem. **Adaptado de:** Shanahan; Spivak, 2021.

As publicações relacionadas ao cerume incluem a pesquisa de Hamilton *et al.* (2017), onde os autores demonstram que o extrato metanólico de cerume da espécie *Tetragonula carbonaria* apresenta e identifica compostos como ácido gálico, amirinas, C- metil flavanonas e floroglucinois, entre outros, os quais são descritos na literatura como sendo capazes de eliminar radicais livres, inibir a oxidação da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) mediada pelo ácido linoleico e inibir a produção de leucotrieno B₄ (LTB₄) em neutrófilos humanos pelo. Já o estudo de Nugitrangson *et al.* (2016), constatou no cerume da abelha *Tetragonula laeviceps* a presença de α -mangostina, substância responsável por conferir uma potente atividade anticâncer *in vitro* em uma ampla gama de linhagens de células humanas derivadas do câncer.

2.7. Organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

Para determinar se produtos ou compostos oferecem benefícios à saúde humana, incluindo atividade antioxidante, é preciso desenvolver uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, existem limites práticos e éticos em relação à aplicação de ensaios experimentais em humanos, por isso é preciso analisar e buscar um

organismo modelo que permita a realização de estudos e experimentações para compreensão e novas descobertas acerca da fisiologia do organismo humano e as doenças que o afetam (Apfeld; Alper, 2018).

O nematoide *Caenorhabditis elegans* é um exemplo de organismo modelo que pode ser utilizado na avaliação dos efeitos antioxidantes e tóxicos de diferentes produtos naturais. Esses nematoides apresentam muitos órgãos e tecidos, incluindo músculos, hipoderme, glândulas, intestino, sistema secretor-excretor e sistema nervoso (Liao, 2018). Com relação ao sistema nervoso, os nematoides hermafroditas possuem 302 neurônios, enquanto os machos têm 385. Muitos dos neurônios adicionais dos machos estão conectados à cauda e são usados para acasalamento (Loxterkamp *et al.*, 2021).

O *C. elegans* é um organismo diploide cujo genoma contém seis cromossomos: cinco autossomos e um cromossomo sexual. Podem ser hermafroditas XX ou apresentar apenas o sexo masculino XO (Apfeld; Alper, 2018). Possuem um milímetro de comprimento, apresentando 959 células somáticas e ciclo reprodutivo curto, levando cerca de três dias para chegar ao estágio de adulto fértil (Zwirchmayr *et al.*, 2020). Apresentam também uma cutícula resistente e transparente, que permite a visualização de estruturas internas sem a necessidade de dissecação, facilitando o rastreamento de corantes organelares e expressões de genes específicos (Hunt, 2017).

No laboratório, a manutenção do *C. elegans* é feita em placas de Petri, contendo ágar NGM (Nematode Growth Medium), e bactérias *Escherichia coli* OP50, como fonte de alimento (Liao, 2018). Além disso, os nematoides hermafroditas são auto férteis, capazes de produzir centenas de descendentes, o que possibilita a manutenção e geração de grandes estoques de nematoides (Apfel; Alper, 2018).

O período de embriogênese desses nematoides leva aproximadamente 16 h a 20 °C. Os ovos ficam retidos dentro do nematoide hermafrodita até o estágio de 24 células, quando são então depositados (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). O embrião hermafrodita eclode e se torna uma larva de primeiro estágio (L1). Posteriormente, a larva passa a se alimentar e a se desenvolver durante quatro estágios larvais (L1 – L4). A larva permanece no estágio L1 por aproximadamente 16 h, já os estágios de L2 a L4 levam cerca de 12 h cada (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

Ao final de cada estágio a larva passa por um período de inatividade, denominado letargo. Durante esse período, uma nova cutícula é produzida. A

inatividade termina com a muda da cutícula velha (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). Cerca de 12 h após a muda do estágio L4, os hermafroditas adultos passam a produzir ovos por um período de 2 a 3 dias, até que tenham utilizado todos os espermatozoides autoproduzidos (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

Sob condições estressantes como aglomeração, suprimento limitado de alimento ou estresse térmico, os nematoides podem mudar durante o estágio L1 para uma rota alternativa de desenvolvimento, passando para um estágio denominado L2d, que é seguido por um estágio de diapausa sem alimentação chamado dauer (estágio L3 alternativo) (Frézal; Félix, 2015). Os nematoides em dauer são resistentes a condições de estresse e podem sobreviver por vários meses sem comida. Quando as condições voltam a ser favoráveis, as larvas voltam a se alimentar e retomam o seu desenvolvimento (Frézal; Félix, 2015).

Na **Figura 10** é possível visualizar todas as etapas do ciclo de vida do *C. elegans*, incluindo o estágio de dauer.

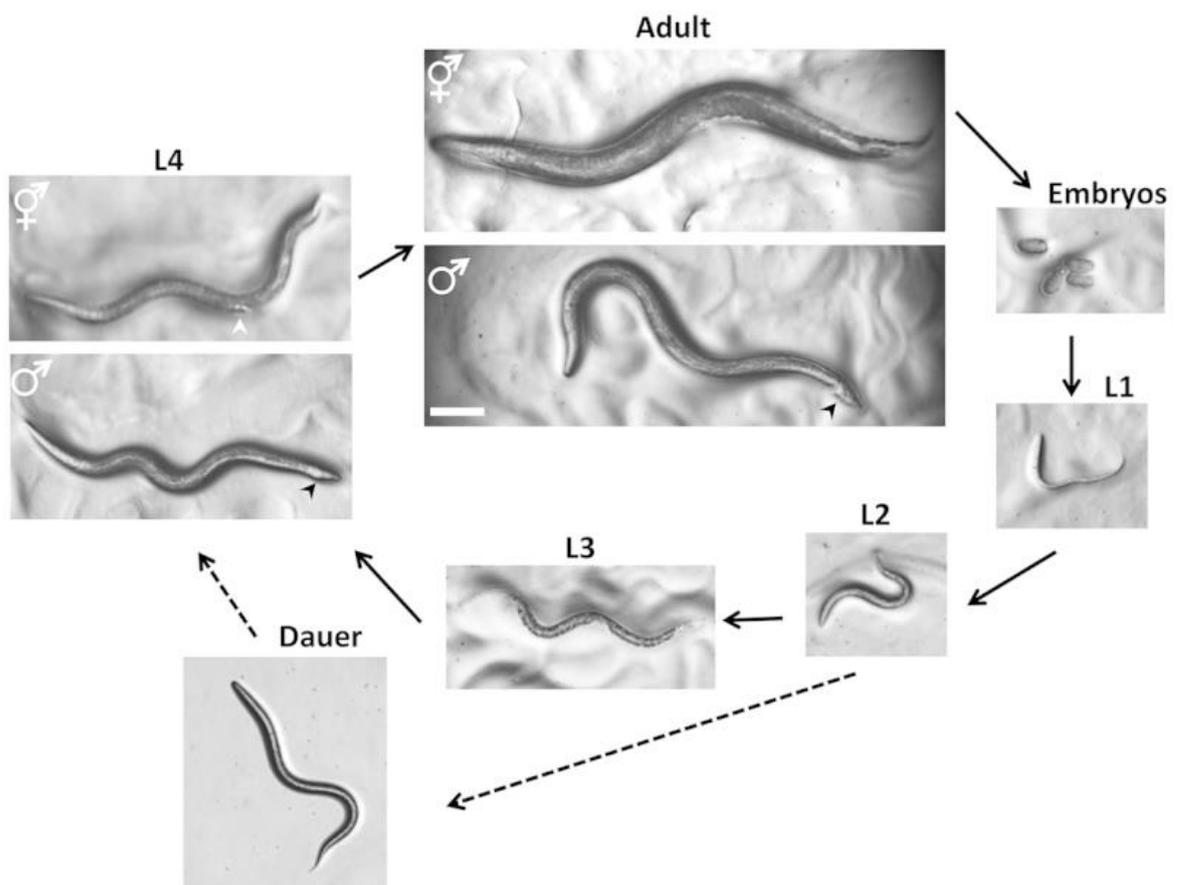


Figura 10: Ciclo de vida do nematoide *C. elegans*. **Fonte:** Corsi; Wightman; Chalfie, (2015).

Este modelo animal foi o primeiro organismo multicelular que teve seu genoma completamente sequenciado, por Sydney Brenner, em meados da década de 1960 (Hunt, 2017), o que permitiu a observação de que muitos genes e vias de sinalização são conservados entre esses nematoides e os seres humanos (Hunt, 2017). A partir de então, diversos estudos demonstram êxito no uso de *C. elegans* em pesquisas relacionadas a muitos aspectos biológicos, como desenvolvimento, especificação do destino celular, neurobiologia, tumorigênese, interferência da expressão gênica mediada por RNA (RNAi) e envelhecimento (Liao, 2018).

Além disso, os estudos utilizando os *C. elegans* também podem ser aplicados para avaliar o efeito tóxico de produtos naturais. Os testes de toxicidade são feitos com a expectativa de que as informações adquiridas em um determinado modelo se apliquem a outros sistemas biológicos, com cada modelo apresentando potencialidades e limitações dependendo das informações exigidas (Hunt, 2017). Os ensaios de toxicidade em *C. elegans* fornecem dados de um animal inteiro com sistemas digestivo, reprodutivo, endócrino, sensorial e neuromuscular intacto e metabolicamente ativo (Hunt, 2017), também podem ser realizados através da avaliação de diferentes parâmetros, como podemos observar na **Tabela 1**.

Parâmetros de toxicidade	Produto natural avaliado	Referência
Ensaio de sobrevivência	Própolis das abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona depilis</i> e <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Bonamigo <i>et al.</i> (2017)
	Extrato das folhas de <i>Acrocomia aculeata</i>	Monteiro-Alfredo <i>et al.</i> (2020)
	Polpa dos frutos de <i>Dipteryx alata</i>	Leite <i>et al.</i> (2020)
	Extrato de <i>Paullinia cupana</i>	Boasquíviz <i>et al.</i> (2018)
	Folhas de <i>Brassica chinensis</i>	Chen <i>et al.</i> (2015)

Parâmetros de toxicidade	Produto natural avaliado	Referência
Ensaio de tempo de vida	Polpa dos frutos de <i>Dipteryx alata</i>	Leite <i>et al.</i> (2020)
	Flores de <i>Heterotheca inuloides</i>	Rodríguez-Chávez <i>et al.</i> (2015)
Ensaio de análise do número de progênie	Polpa dos frutos de <i>Dipteryx alata</i>	Leite <i>et al.</i> (2020)
	Extrato de <i>Paullinia cupana</i>	Boasquíviz <i>et al.</i> (2018)
Ensaio de depuração de alimentos	Folhas de <i>Brassica chinensis</i>	Chen <i>et al.</i> (2015)
Ensaio de sobrevivência neuronal	Extrato de <i>Paullinia cupana</i>	Boasquíviz <i>et al.</i> (2018)
Ensaio de análise do comprimento corporal		
Ensaio de análise da locomoção		
Ensaio de análise das taxas de bombeamento faríngeo		

Tabela 1: Parâmetros para análise da toxicidade de produtos naturais no modelo *C. elegans*.

3. Objetivos:

Geral:

- Avaliar as propriedades antioxidantes e toxicidade do cerume da abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*.

Específicos:

- Quantificar a concentração de compostos fenólicos e flavonoides no extrato etanólico de cerume da abelha *T. fiebrigi* (EECT), *in vitro*;
- Verificar a capacidade do EECT de inibir os radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) *in vitro*;
- Analisar a capacidade do EECT em inibir a hemólise oxidativa e a peroxidação lipídica de eritrócitos humanos induzida pelo agente oxidante dicloridrato de azobis-(2-amidinopropano) (AAPH);
- Investigar a toxicidade aguda de diferentes concentrações do EECT em *Caenorhabditis elegans*, linhagem selvagem N2.

4. Justificativa

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, em baixas concentrações em comparação a um substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação desse substrato. Assim, os antioxidantes são responsáveis por evitar danos causados aos componentes celulares pela ação dos radicais livres (Young, Woodside, 2001).

Suplementos antioxidantes sintéticos são produzidos para o combate ao estresse oxidativo. Contudo, esses produtos são caros, não são acessíveis pela população como um todo e podem causar efeitos colaterais indesejados (Arulselvan, 2016). Como alternativa, existem os antioxidantes naturais, que são abundantes em fontes alimentares e podem ser a chave para a prevenção e proteção contra os danos promovidos pelas espécies reativas, tornando-os preciosos para redução das doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Arulselvan, 2016).

De maneira geral, já é sabido das propriedades benéficas dos produtos apícolas, que são utilizados para fins nutricionais e medicinais. Essas propriedades químicas e biológicas estão relacionadas as plantas fonte de recursos, ao clima e região onde a espécie está localizada (Nugitrangson *et al.*, 2016). Porém, nem todas as espécies de abelhas foram igualmente estudadas, acarretando um conhecimento limitado sobre seus respectivos produtos apícolas.

Uma destas espécies é a *Tetragonisca fiebrigi*, que ocorre em alguns países da América do Sul, incluindo o Brasil. A espécie já teve alguns de seus produtos estudados buscando avaliar diferentes atividades terapêuticas, como atividade antioxidante da própolis, por exemplo, que foi relacionada a presença de compostos fenólicos e terpenos (Campos *et al.*, 2015).

No entanto, são inexistentes os estudos relacionados ao cerume desta espécie ainda, mas acredita-se que este produto apresenta potencial bioprospectivo. Diante desse fato, o presente estudo buscou avaliar a capacidade antioxidante do EECT *in vitro* e a toxicidade do extrato utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*.

5. Material e métodos

5.1. Identificação das colmeias e obtenção do cerume

As colmeias das abelhas sem ferrão *T. fiebrigi* foram identificadas na cidade de Dourados (22°12'07"S 56°06'33"W), Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras de cerume foram coletadas e armazenadas a – 20 °C, até o preparo do extrato.

5.2. Preparo do Extrato Etanólico de Cerume de *Tetragonisca fiebrigi* (EECT)

O preparo do extrato foi realizado de acordo com Alencar *et al.* (2007). O cerume foi pesado e em seguida foi adicionado etanol 80 %, seguindo a proporção de 4,5 mL de solvente para cada grama de cerume. A solução foi mantida em banho-maria a 70 °C até a completa dissolução, sendo periodicamente homogeneizada em vórtex. Por último, o material foi filtrado para obtenção do EECT.

5.3. Ensaio de determinação de compostos fenólicos

O ensaio de determinação de compostos fenólicos foi realizado através do método colorimétrico Folin-Ciocalteu, como descrito por Meda *et al.* (2005). Para isso, foram adicionados 0,5 mL de EECT na concentração de 3,0 mg/mL a 2,5 mL do reagente Folin–Ciocalteu (1:10). A solução foi incubada no escuro, em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (14 %) a solução, que foi incubada novamente no escuro, em temperatura ambiente, por 2 h. Diferentes concentrações de ácido gálico (0,2 – 21,7 µg/mL) foram utilizadas como padrão para produzir a curva de calibração. Por último, a absorbância foi lida em espectrofotômetro modelo T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK) a 760 nm, utilizando etanol 80 % como branco. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo a média das três leituras utilizada para determinação da concentração de compostos fenólicos, expresso em mg equivalente ao ácido gálico (EAG) / g de cerume.

5.4. Ensaio de determinação do teor de flavonoides

O ensaio de determinação do teor de flavonoides no EECT foi realizado de acordo com o método descrito por Liberio *et al.* (2011), com algumas modificações.

Para isto, 0,5 mL do EECT a 3.0 mg/mL foram adicionados a 4,5 mL de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (2 %), solubilizado em metanol. A solução foi incubada no escuro, em temperatura ambiente, por 30 min. Diferentes concentrações de quercetina (0,2 – 21,7 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas como padrão para construir a curva de calibração. Por último, a absorbância foi lida em espectrofotômetro modelo T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK) a 415 nm, utilizando metanol como branco. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo a média das três leituras utilizada para determinação da concentração de flavonoides, que foi expresso em mg equivalente à quercetina (EQ) / g de cerume.

5.5. Captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•])

Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, foi realizada a análise de captura do radical DPPH[•], como descrito por Gupta e Gupta (2011), com pequenas modificações. Inicialmente, foi realizada a diluição do EECT e dos controles positivos ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT), que são antioxidantes de referência, para se obter as diferentes concentrações (1 – 3.000 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, foram adicionados 200 μL dos respectivos tratamentos à 1.800 μL de DPPH[•] a 0,11 mM, solubilizado em etanol 80 %. As soluções foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Por último, a absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro modelo T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK) a 517 nm. Como controle foram utilizados 200 μL de etanol 80 % adicionados a 1.800 μL do radical DPPH[•] sem a adição das amostras analisadas. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e a porcentagem de inibição do DPPH[•] foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Atividade de captura de DPPH (\%)} = (1 - \text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

5.6. Captura do radical livre 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS^{•+}

Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, foi também realizado o ensaio de captura do radical ABTS^{•+}, baseado no método descrito por Re *et al.* (1999). Para o preparo do radical ABTS^{•+} foram adicionados 88 μL da solução de persulfato de potássio (140 mM) a 5 mL da solução aquosa de ABTS (7 mM). A solução foi incubada

por 12 h no escuro e depois diluída em etanol absoluto para se obter a absorvância de $0,700 \pm 0,05$ em espectrofotômetro modelo T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK), a 734 nm. O extrato e os controles positivos (ácido ascórbico e BHT) foram diluídos em etanol 80 % para se obter as diferentes concentrações (1 – 2.000 µg/mL). Em seguida, foram adicionados 20 µL dos respectivos tratamentos à 1.980 µL de solução do radical ABTS^{•+}, sendo incubado no escuro à temperatura ambiente por 6 minutos. Por último, a absorvância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro a 734 nm. Como controle, foram utilizados 20 µL de etanol absoluto adicionados a 1.980 µL da solução radical ABTS^{•+}. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e a porcentagem de inibição do ABTS^{•+} foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Inibição do radical ABTS (\%)} = ((\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})/\text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

5.7. Ensaio antioxidante utilizando modelo de eritrócito humano

5.7.1. Preparo da suspensão de eritrócitos

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa: CEP do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Brasil (processo CEP número 123/12), 15 mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo citrato de sódio. O material foi então levado a centrífuga modelo 206-BL (FANEM LTDA, Guarulhos, BR) a 2.000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o plasma sanguíneo e a camada de leucócitos foram descartados, os eritrócitos foram lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) e centrifugados a 2.000 rpm por 5 min, por três vezes. Posteriormente, uma suspensão de hematócrito eritrocitário a 10 % foi preparada em solução salina a 0,9 %.

5.7.2. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa

A capacidade do EECT em proteger eritrócitos humanos contra a hemólise oxidativa foi avaliada de acordo com o método descrito por Campos *et al.* (2014). Inicialmente, 250 µL da suspensão de eritrócitos a 10 % foram pré-incubados com 250 µL de diferentes concentrações do EECT (50 – 125 µg/mL) ou ácido ascórbico, usado como controle positivo, durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução de dicloridrato de azobis- (2-amidinopropano) (AAPH), indutora de hemólise, a 50 mM. Uma solução de etanol 1% foi utilizada como controle solvente.

Para o preparo dos controles salina e AAPH, 250 µL da suspensão de eritrócitos foram pré-incubados com 250 µL de solução salina a 0,9 %. Para o preparo do controle hemólise total, 250 µL da solução de eritrócitos e 250 µL de água destilada foram pré-incubados. Os controles também passaram por um pré-tratamento de 30 min a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 500 µL da solução AAPH aos tubos referentes ao controle AAPH. Ao controle salina e ao controle solvente, foram adicionados 500 µL de solução salina 0,9 %. Por último, ao controle da hemólise total, foram adicionados 500 µL de água destilada. Todos os tratamentos foram mantidos a 37 °C, sendo agitados periodicamente. A capacidade do extrato em proteger os eritrócitos contra o agente indutor AAPH foi avaliada após 120, 180 e 240 min de incubação. Após cada respectivo período de incubação, as amostras foram levadas a centrífuga modelo 206-BL (FANEM LTDA, Guarulhos, BR) a 1.500 rpm, por 10 min. Em seguida, 200 µL do sobrenadante de todos os tratamentos foram transferidos para cubetas contendo 1.800 µL de solução salina 0,9 %, sendo posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro modelo T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK) a 540 nm. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata e a taxa de hemólise foi calculada pela seguinte equação, onde (A) é a absorbância da amostra e (B) é a hemólise total:

$$\text{Hemólise total (\%)} = (A / B) \times 100$$

5.7.3. Ensaio de eficiência inibitória contra a peroxidação lipídica

O ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Campos *et al.* (2014). A suspensão de eritrócitos a 10 % foi usada para avaliar o efeito do EECT contra a peroxidação lipídica, quantificada pela presença de malondialdeído (MDA). Para isso, 250 µL da suspensão de eritrócitos a 10 % foram pré-incubados com 250 µL das diferentes concentrações (50 – 125 µg/mL) do EECT ou ácido ascórbico, por 30 min a 37 °C. O controle salina e o controle AAPH foram preparados com 250 µL da suspensão de eritrócitos e 250 µL de solução salina 0,9 %. Uma solução de etanol 1% foi utilizada como controle solvente. Após os 30 min, 500 µL da solução de AAPH 50 mM foram adicionados à solução de eritrócitos pré-tratada com EECT ou ácido ascórbico e ao controle AAPH. No controle salina foram adicionados 500 µL de solução salina 0,9 %. Todas as amostras foram mantidas a 37 °C, sendo agitadas

periodicamente. A dosagem de MDA foi avaliada após 120, 180 e 240 min de incubação. Após cada respectivo período de incubação, as amostras foram levadas a centrífuga modelo 206-BL (FANEM LTDA, Guarulhos, BR) a 1.500 rpm por 10 min. Posteriormente, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 10 nmol. Como solução padrão, 500 µL de MDA a 20 mM foram adicionados a 1 mL de TBA. As amostras foram então incubadas a 96 °C por 45 min. Em seguida, foram resfriadas e 4 mL de álcool n-butílico foram adicionados às mesmas. Por último, as soluções foram levadas a centrífuga modelo 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, DE) a 3.000 rpm por 5 min. Dois mililitros do sobrenadante de cada amostra foram utilizados para leitura da absorbância em espectrofotômetro modelo T 70 UV/VIS (PG Instruments Limited, Leicestershire, UK), a 532 nm. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Os níveis de MDA nas amostras foram expressos em nmol/mL obtidos pela seguinte equação:

$$\text{MDA (nmol/mL)} = \text{Abs}_{\text{amostra}} \times (20 \times 220,32 / \text{Abs}_{\text{padrãoMDA}})$$

5.8. Linhagens e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Para realização dos ensaios *in vivo* foi utilizada a linhagem selvagem do tipo N2 do nematoide *C. elegans*, obtida do *Caenorhabditis Genetics Center* (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). Os animais foram mantidos em placas de Petri contendo ágar Nematode Growth Medium (NGM) e alimentados com bactéria *Escherichia coli* OP50.

Os nematoides utilizados nos experimentos estavam em estágio L4, que corresponde ao estágio de jovem adulto. Para que todos os animais em uma placa estivessem nesse estágio foi preciso seguir uma sequência de processos: primeiro foi feito um chunking, realizado através do corte do ágar de uma placa com número considerável de nematoides, que posteriormente foi colocado em uma nova placa com NGM e bactérias. A placa foi vedada e mantida em B.O.D. a 20 °C por 96 h.

Após esse período, a placa apresentava nematoides em diferentes estágios e ovos, permitindo a realização do próximo passo: a sincronização. A placa foi lavada com meio M9 para que os animais e os ovos fossem retirados do ágar, o conteúdo extraído foi transferido para tubo Falcon onde foram adicionados hipoclorito (2%) e hidróxido de sódio (NaOH) 5 M, reagentes responsáveis pela lise dos animais, e

liberação dos ovos. Os ovos foram lavados em meio M9, e transferidos para uma nova placa com NGM e bactérias. A placa foi vedada e mantida em B.O.D. a 20 °C por 48 h, para que os animais atingissem o estágio L4.

5.9. Ensaio de toxicidade aguda

Para avaliar se o EECT promove toxicidade *in vivo*, foi realizado o ensaio de toxicidade aguda nos nematoides *C. elegans* no estágio L4, segundo Dengg *et al.* (2004). Primeiro, 100 µL de meio M9 foram pipetados em uma placa de 96 poços, posteriormente, entre 10 a 20 animais foram transferidos para cada poço com o auxílio de uma microespátula de platina. Por último, 100 µL de diferentes concentrações (5 – 2.000 µg/mL) do EECT foram adicionados. Para o controle positivo foram adicionados 100 µL de M9, já para o controle solvente, foram adicionados 100 µL de etanol, na concentração final de 1% (porcentagem de etanol presente na maior concentração avaliada do extrato). A placa foi mantida em B.O.D. a 20 °C por 24 e 48 h. Após os respectivos períodos, a viabilidade dos nematoides foi avaliada em microscópio estereoscópio modelo SMZ-140 & W10X/23 (British Columbia, Canadá). Os nematoides foram tocados com uma microespátula de platina sendo avaliados como vivos ou mortos. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata e os resultados foram expressos pela porcentagem de nematoides vivos, calculada pela seguinte equação, onde (Ni) é o número inicial de nematoides e (Nf) é o número final de nematoides após 24 e 48h de incubação:

$$\text{Viabilidade dos nematoides (\%)} = (Ni \times 100) / Nf$$

5.10. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) dos radicais livres foram determinadas por regressão não linear. A análise univariada de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett foi usada para comparar dois ou mais grupos. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

6. Resultados

6.1. Ensaio de determinação de compostos fenólicos

O método de Folin-Ciocalteu é um método colorimétrico, normalmente empregado para a determinação do teor de compostos fenólicos em uma solução. A reação entre compostos fenólicos e o reagente Folin-Ciocalteu deve ocorrer em meio básico pela adição de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Esse método se baseia na capacidade de oxidação dos compostos fenólicos e na consequente redução do reagente Folin-Ciocalteu, formado pela mistura dos ácidos fosfomolibdênio e fosfotungstênio. Como resultado dessa redução, ocorre a formação de um complexo de óxidos de tungstênio e molibdênio que apresentam cor azul, sendo a coloração proporcional à concentração dos compostos fenólicos. Esse ensaio foi empregado para avaliar a capacidade redutora do EECT, sendo observado que o extrato apresentou $3,93 \pm 0,39$ mg (EAG) / g do extrato do cerume.

6.2. Ensaio de determinação de flavonoides

O princípio do ensaio está relacionado ao fato do cátion alumínio ser capaz de formar complexos estáveis com os flavonoides, na presença de metanol. Assim, o complexo formado por flavonoides e alumínio absorve luz em comprimento de onda maior do que outros compostos, sendo possível a quantificação dos flavonoides em uma solução. No caso do EECT, foi observada a presença de $0,19 \pm 0,073$ mg (EQ) / g do extrato do cerume.

6.3. Ensaio de eliminação de radicais livres DPPH[•]

O radical livre DPPH[•] apresenta cor púrpura. Assim que substâncias antioxidantes são adicionadas a solução, o radical recebe átomos de hidrogênio, é reduzido e passa a apresentar coloração amarela. A capacidade da amostra de reduzir o DPPH[•] é evidenciada pela porcentagem de DPPH[•] restante no sistema. De acordo com a **Figura 11**, podemos observar que o EECT apresentou um aumento da porcentagem de inibição dos radicais livres DPPH[•] de maneira concentração dependente. Na concentração de $3.000 \mu\text{g/mL}$ o extrato apresentou inibição dos radicais DPPH[•] de $49,87\%$, enquanto o ácido ascórbico demonstrou atividade máxima

de inibição de 93,77 %, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e para o BHT o valor foi de 92,32 %, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

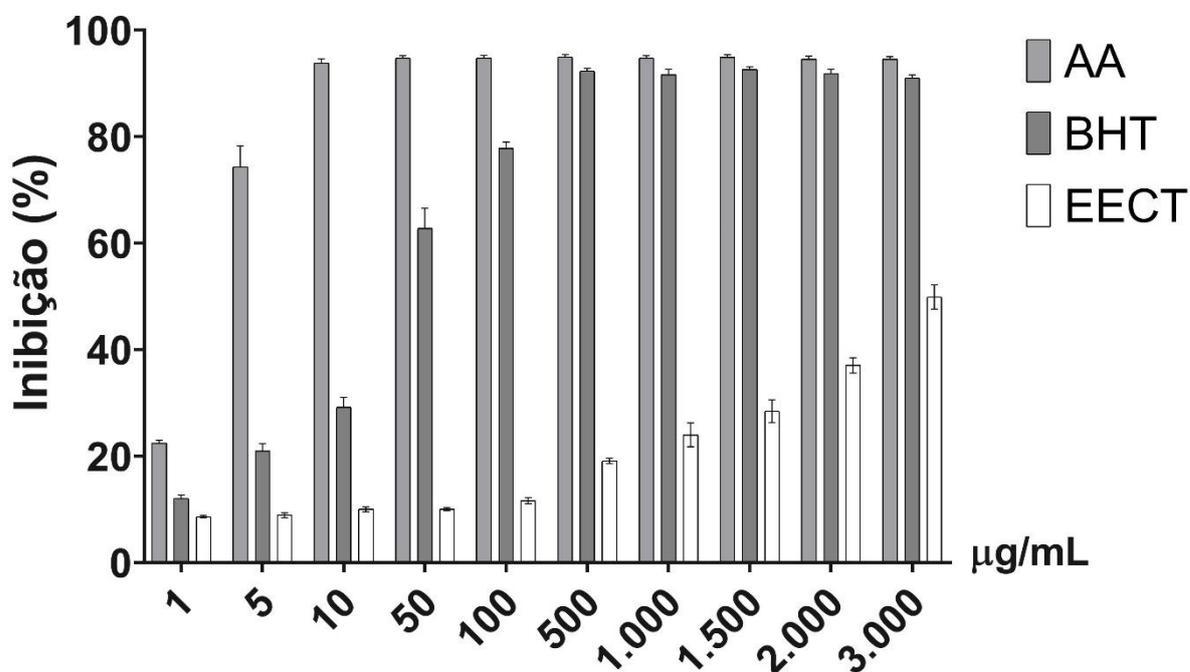


Figura 11: Efeito das diferentes concentrações (1 – 3.000 $\mu\text{g/mL}$) do EECT e dos padrões ácido ascórbico (AA) e BHT na inibição dos radicais DPPH $^{\bullet}$, expresso como porcentagem de inibição do DPPH $^{\bullet}$. Os valores são expressos como a média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

6.4. Ensaio de inibição de radicais livres ABTS $^{+\bullet}$

A solução contendo o radical ABTS $^{+\bullet}$ apresenta coloração azul/verde. O método se baseia no monitoramento da redução do cátion-radical ABTS $^{+\bullet}$ quando substâncias antioxidantes são adicionadas a solução. Isso acontece porque o radical ABTS $^{+\bullet}$ reage com um doador de átomo de hidrogênio, é reduzido e passa a apresentar coloração mais clara, ou até mesmo torna-se incolor. A redução do ABTS $^{+\bullet}$ ocorre de forma dependente da escala de tempo da atividade antioxidante, da concentração e composição do antioxidante. A **Figura 12** demonstra a inibição dos radicais ABTS $^{+\bullet}$ pelos antioxidantes de referência ácido ascórbico e BHT e o EECT, que têm sua capacidade antioxidante evidenciada, de acordo com o aumento de suas concentrações. O EECT apresentou um IC $_{50}$ de 257,80 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os antioxidantes padrões, ácido ascórbico e BHT, apresentaram um IC $_{50}$ de 2,59 $\mu\text{g/mL}$.

e 8,36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$ o extrato promoveu 78,45 % de inibição dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$, já os antioxidantes de referência alcançaram a inibição máxima, sendo que para o ácido ascórbico esse valor foi de 99,33 %, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, e para o BHT o valor foi de 99,16 %, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

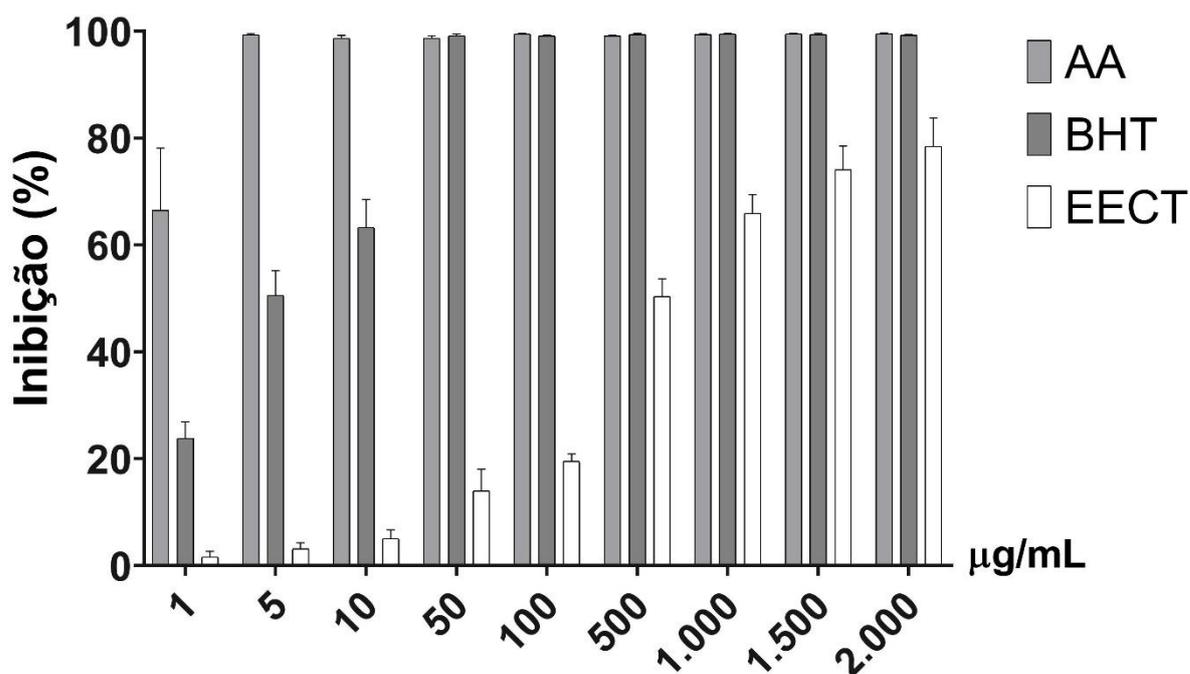


Figura 12: Efeito das diferentes concentrações (1 – 2.000 $\mu\text{g/mL}$) do EECT e dos padrões ácido ascórbico (AA) e BHT na inibição dos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$, expresso como porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Os valores são expressos como a média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

6.5. Ensaio de inibição da hemólise oxidativa induzida por AAPH

A membrana plasmática dos eritrócitos é rica em ácidos graxos poli-insaturados, o que os torna suscetíveis a peroxidação lipídica promovida por radicais livres. O AAPH é capaz de promover a formação do radical peroxil (ROO^{\bullet}) e, conseqüentemente, causar a oxidação de lipídios e proteínas na membrana celular, levando a hemólise. Como observado na **Figura 13**, o ácido ascórbico e o EECT foram capazes de inibir a hemólise em eritrócitos humanos, após 240 min de incubação quando os tratamentos são comparados ao controle AAPH, onde eritrócitos são incubados apenas com o agente oxidante. Nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$, o EECT foi capaz de inibir a hemólise em 51,68 % e 47,33 %, respectivamente.

Já o ácido ascórbico, nas concentrações de 100 µg/mL e 125 µg/mL, foi capaz de inibir a hemólise em 52,81 % e 56,25 %, respectivamente. De acordo com a **Figura 14**, não houve diferença estatística quando comparamos o controle ácido ascórbico e o EECT com o controle salina, indicando que os tratamentos não induziram a hemólise oxidativa em eritrócitos, quando incubados sem a presença do agente oxidante AAPH.

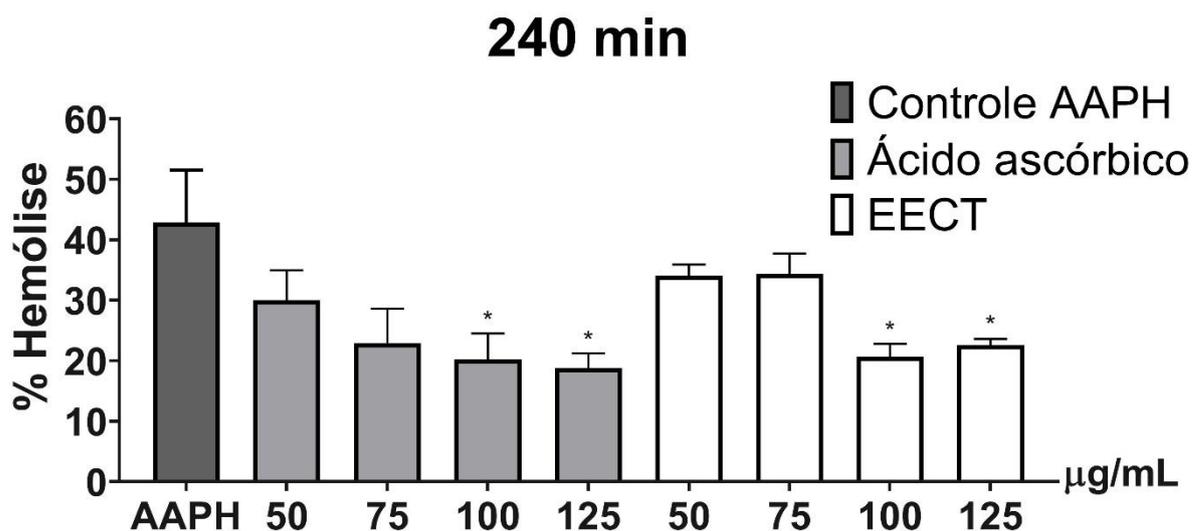


Figura 13: Efeito das diferentes concentrações (50 – 125 µg/mL) do EECT e ácido ascórbico (antioxidante padrão) contra a hemólise induzida por AAPH (50 mM) aos 240 min de incubação. Os valores são expressos como a média ± EPM de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. * Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$) quando os grupos tratados com EECT ou ácido ascórbico foram comparados ao grupo controle AAPH (eritrócitos incubados apenas com agente oxidante).

240 min

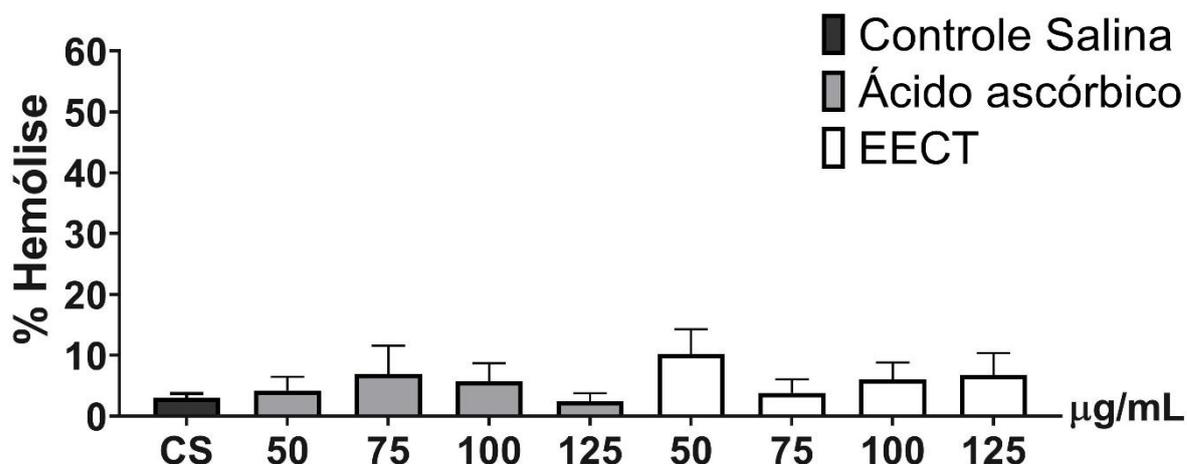


Figura 14: Efeito das diferentes concentrações (50 – 125 µg/mL) do EECT e ácido ascórbico (antioxidante padrão) em eritrócitos humanos, sem adição do agente indutor de hemólise AAPH (50 mM) aos 240 min de incubação. Os valores são expressos como a média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. Os tratamentos com EECT e ácido ascórbico foram comparados ao grupo controle salina (eritrócitos incubados apenas com solução NaCl 0,9 %).

6.6. Ensaio de inibição da peroxidação lipídica induzida por AAPH

A capacidade do EECT de proteger contra peroxidação lipídica induzida por AAPH em eritrócitos humanos foi avaliada por meio da dosagem de malondialdeído, que é um importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo. O ensaio consistiu no uso de AAPH como indutor do estresse oxidativo, promovendo a hemólise oxidativa em eritrócitos humanos e tendo como produto dessa reação o MDA. O ácido tiobarbitúrico (TBA) foi utilizado para evidenciar a presença de MDA nas amostras avaliadas. De acordo com o observado na **Figura 15**, aos 120 min de incubação, o EECT apresentou níveis reduzidos de MDA nas concentrações 75 µg/mL e 100 µg/mL, quando comparado ao controle AAPH, em que os eritrócitos foram incubados apenas com o agente indutor de danos oxidativos. Na concentração de 75 µg/mL, o EECT apresentou uma porcentagem de redução de MDA de 37,83 %, enquanto na concentração de 100 µg/mL essa porcentagem foi de 41,35 %. O ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, apresentou níveis reduzidos de MDA em todas as concentrações testadas, demonstrando uma porcentagem de inibição do MDA de 85,04 % na concentração de 125 µg/mL.

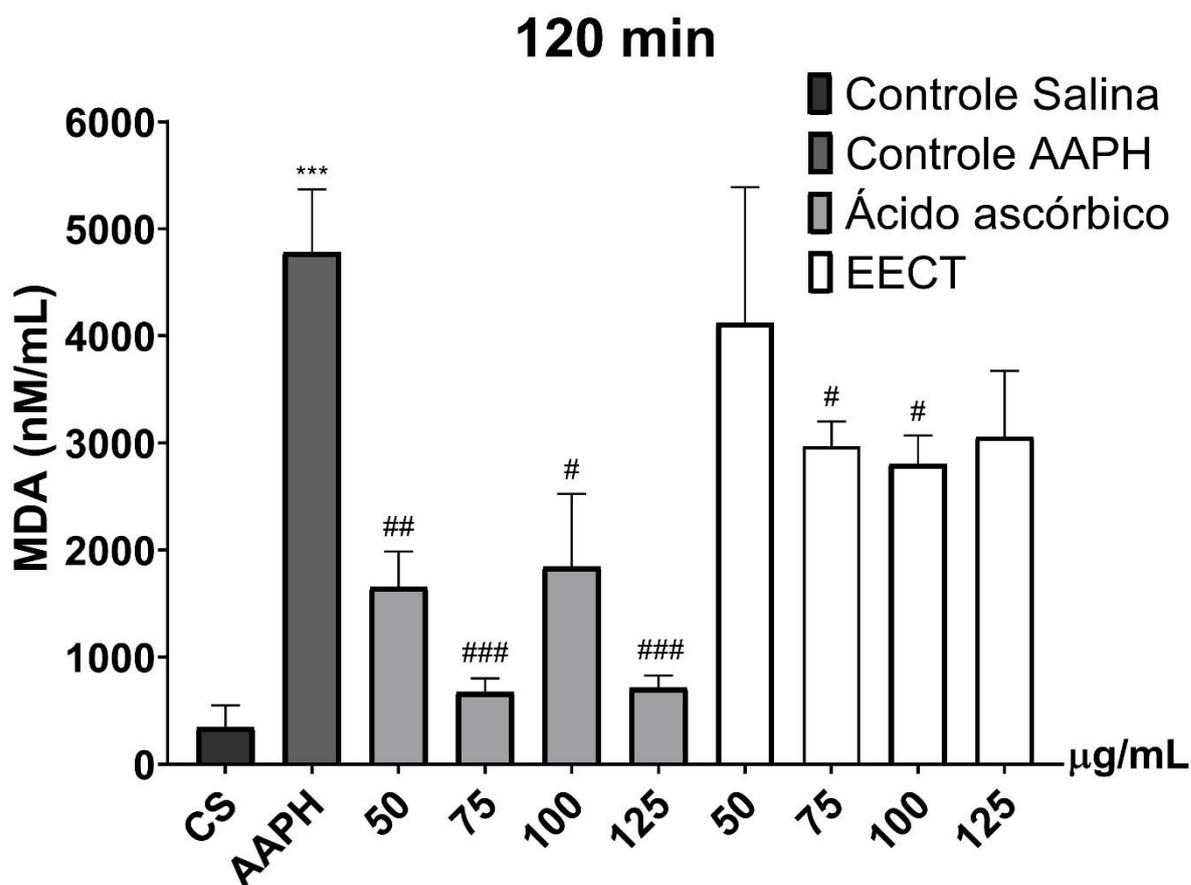


Figura 15: Efeito das diferentes concentrações (50 – 125 $\mu\text{g/mL}$) do EECT e ácido ascórbico (antioxidante padrão) na peroxidação lipídica induzida por AAPH (50 mM) aos 120 min de incubação. O controle salina representa eritrócitos incubados apenas com solução NaCl 0,9 %. Os valores são expressos como a média \pm EPM de dois experimentos independentes, realizados em duplicata. * Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$) quando o controle AAPH (eritrócitos incubados apenas com agente oxidante) é comparado com o controle salina (eritrócitos incubados apenas com solução NaCl 0,9 %). # Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$) quando o grupo tratado com EECT e ácido ascórbico foram comparados ao grupo controle AAPH.

6.7. Ensaio de toxicidade aguda no modelo *C. elegans*

Para avaliar a possível toxicidade do EECT, foi realizado o ensaio de toxicidade aguda utilizando nematoides *C. elegans* em estágio adulto (L4). Os nematoides foram expostos a diferentes concentrações do EECT (5 – 2.000 $\mu\text{g/mL}$), controle M9 e controle solvente, durante a fase adulta por 24 h (**Figura 16 (a)**) e 48 h (**Figura 16 (b)**). Os resultados demonstram que, durante os tempos avaliados, as concentrações testadas do EECT não apresentaram nenhum efeito tóxico ao *C. elegans*, quando o grupo tratado foi comparado ao grupo controle, mantido apenas em M9 (*C. M9*).

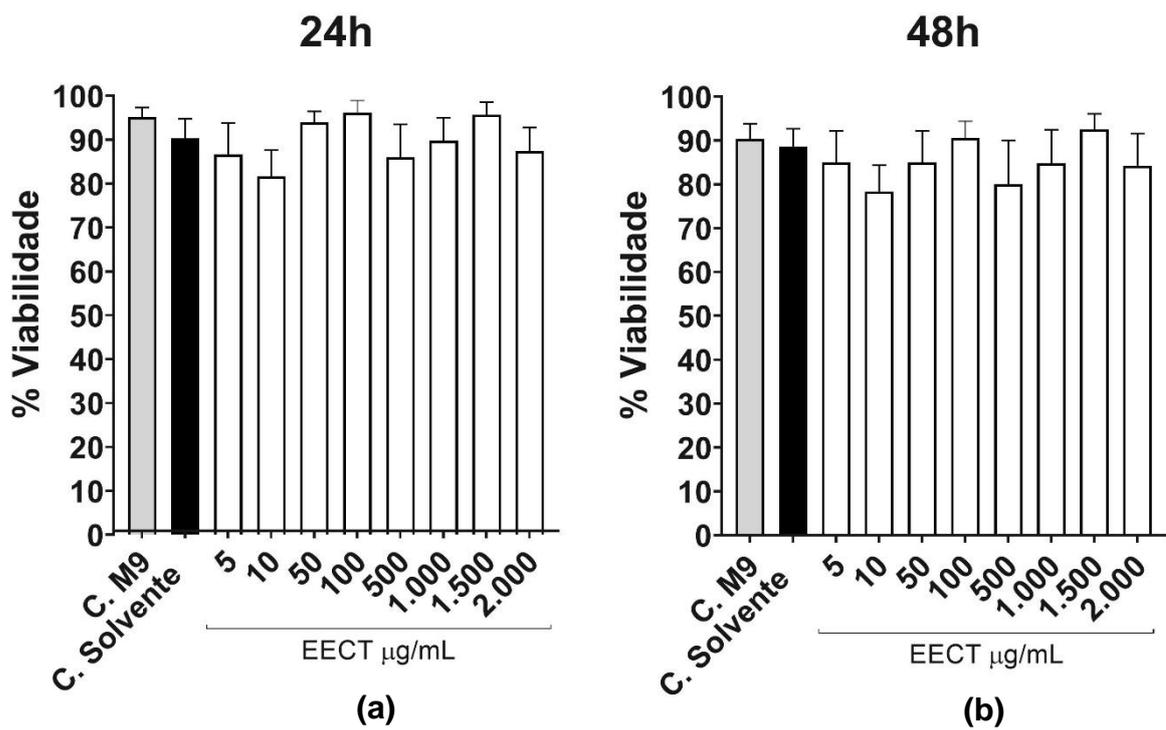


Figura 16: Porcentagem de viabilidade de *C. elegans* expostos ao meio M9 (C. M9), ao solvente etanol a 1 % (C. Solvente) e a diferentes concentrações de EEET (5 – 2.000 µg/mL), após (a) 24 h e (b) 48 h de incubação. Os valores são expressos como a média ± EPM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata.

7. Discussão

Sabe-se que o consumo de frutas, vegetais e grãos contribui na proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, sendo essa proteção associada a presença de fitoquímicos nesses alimentos (Zhang *et al.*, 2015). Por isso, pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando identificar compostos naturais eficazes, não tóxicos, que apresentem atividade antioxidante e outros benefícios à saúde (Liao, 2018).

A identificação de novos compostos que demonstram atividade antioxidante é importante para prevenção de danos causados pelo estresse oxidativo em nosso organismo. Sabe-se que os antioxidantes de origem vegetal apresentam grande bioatividade e diversidade molecular, o que afeta positivamente a saúde de quem os consome por meio de alimentos, incluindo produtos apícolas gerados a partir de néctar, pólen ou resinas vegetais (Martinello; Mutinelli, 2021).

Dentre estes, o cerume é formado pela mistura de própolis e cera secretada pelas abelhas, que o utilizam na colônia para construir estruturas de proteção e suporte, além de potes de mel (Al-Hatamleh, 2020). O cerume de abelhas sem ferrão também apresenta importância para o homem, uma vez que é utilizado na medicina tradicional em países como México, Brasil, Índia e Vietnã (Popova; Trusheva; Bankova, 2019).

A própolis utilizada na produção do cerume pode ser coletada pelas abelhas a partir de exsudatos de brotos de folhas e rachaduras na casca de várias espécies de árvores. Posteriormente, esse material é enriquecido com secreções salivares e enzimáticas das abelhas, podendo então ser utilizado para diferentes finalidades na colmeia (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). A cera é sintetizada através de glândulas localizadas no abdômen de abelhas operárias, a partir de açúcares provenientes do mel (Martinello; Mutinelli, 2021).

A composição química desses produtos pode variar entre as espécies de abelhas e zonas geográficas. Existem poucas informações relacionadas ao cerume de abelhas sem ferrão na literatura, porém já foi descrito que o cerume de *Meliponula ferrugínea* apresenta compostos como açúcares e derivados de açúcar, ácidos aromáticos, ácidos graxos, diterpenos, resorcinóis, ácidos anacárdicos, ácido quinico e triterpenos em sua composição química (Popova *et al.*, 2021).

Em relação a cera, sabe-se que esse produto é composto por hidrocarbonetos, ácidos graxos livres e álcoois graxos livres, monoésteres de cera linear, hidroximonoésteres derivados dos ácidos palmítico, 15-hidroxipalmítico e oleico e ésteres de cera complexos contendo ácido 15-hidroxipalmítico e dióis (Martinello; Mutinelli, 2021). Já a própolis, é composta por 50 % de resinas e bálsamo vegetal (incluindo compostos fenólicos), 30 a 40 % de cera e ácidos graxos, 5 a 10 % de óleos essenciais e aromáticos, 5 % de pólen e aproximadamente 5 % de outras substâncias, incluindo aminoácidos, micronutrientes e vitaminas, como tiamina, riboflavina, piridoxina, vitaminas C e E (Martinello; Mutinelli, 2021).

Buscando quantificar os compostos responsáveis pelas atividades observadas durante os estudos realizados com o extrato etanólico de cerume da abelha *Tetragonisca fiebrigi*, ensaios colorimétricos foram realizados, permitindo a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides em sua composição química. Nossos resultados se assemelham aos obtidos por Campos *et al.* (2015), onde foi constatada a presença de compostos fenólicos no extrato etanólico de própolis de *Tetragonisca fiebrigi*.

Os compostos fenólicos compõem um diverso grupo de metabólitos secundários das plantas, apresentando grande diversidade de estruturas e funções. A síntese desses compostos ocorre normalmente durante o desenvolvimento da planta, assim como em resposta a situações incluindo estresse ambiental e radiação UV (Haminiuk *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos são considerados um dos mais importantes grupos de compostos ocorrentes em espécies vegetais, sendo relatada a existência de pelo menos 8.000 estruturas químicas. Já foi descrito que esses compostos exibem atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória, antiaterogênica, antitrombótica, imunomoduladora e analgésica, além da atividade antioxidante (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante desses compostos está relacionada a sua estrutura química, formada por um ou mais anéis aromáticos ligados a hidroxilas (Zheng, 2010). Essa atividade pode estar relacionada a capacidade de doação de elétrons a radicais livres, promovendo a conversão do radical a uma molécula estável (Haminiuk *et al.*, 2012). Podem também agir complementando ou ampliando as funções das vitaminas e enzimas antioxidantes responsáveis pela defesa contra o estresse oxidativo, além

de ser capaz de modular as vias de sinalização celular em nosso organismo (Tsao, 2010).

Outros mecanismos de ação incluem a supressão da geração de radicais livres e consequente redução da taxa de oxidação; captação direta de radicais das reações em cadeia da peroxidação lipídica, por meio da doação de elétrons (Tsao, 2010); quelação de íons metálicos; inibição de enzimas geradoras de radicais livres e modulação de enzimas antioxidantes endógenas (Banjarnahor; Artanti, 2014).

Um das classes mais importantes de compostos fenólicos são os flavonoides, que apresentam uma ampla gama de efeitos benéficos a saúde, incluindo ação antioxidante (Zheng, 2010). Os mecanismos de ação dos flavonoides incluem o bloqueio do acesso de agentes oxidantes pela membrana celular, protegendo assim a estrutura e função da membrana; inibição de enzimas produtoras de radicais livres, como a xantina oxidase (XO) e inibição da liberação de radicais livres pelos neutrófilos (Hussain *et al.*, 2016).

Compostos fenólicos (incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e taninos) estão presentes na composição de produtos apícolas, conferindo atividade antioxidante a esses produtos por meio da inibição de enzimas específicas, simulação de alguns hormônios e neurotransmissores e eliminação direta dos radicais livres (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Ao avaliar as propriedades biológicas do cerume da abelha *T. fiebrigi*, observamos que o EECT apresentou atividade antioxidante *in vitro*, evidenciada por meio da eliminação dos radicais livres DPPH[•] e ABTS^{•+} e essa atividade antioxidante está relacionada a presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato.

O EECT demonstrou maior atividade antioxidante no ensaio de captura do radical ABTS^{•+} do que do radical. Esse resultado muito provavelmente está relacionado a presença de compostos lipofílicos no cerume de *T. fiebrigi*. Uma vez que o radical ABTS^{•+} apresenta seletividade tanto para antioxidantes hidrossolúveis quanto para antioxidantes lipossolúveis, enquanto o radical DPPH[•] apresenta afinidade apenas para compostos hidrossolúveis (Leite *et al.*, 2020).

A atividade antioxidante promovida pelo EECT também pôde ser evidenciada nos ensaios de inibição da hemólise oxidativa e da peroxidação lipídica, onde utiliza-se o agente oxidante AAPH para promover o estresse oxidativo em eritrócitos humanos.

O radical AAPH, quando adicionado a uma solução aquosa, se decompõe e gera um radical alquila, que reage com oxigênio (O₂) e libera um radical peróxil (ROO[•]), responsável por induzir a oxidação de lipídios poli-insaturados das membranas dos eritrócitos, desencadeando a peroxidação lipídica em cadeia e a hemólise dos eritrócitos. Entretanto, quando soluções antioxidantes estão presentes, os radicais peróxil (ROO[•]) são sequestrados e convertidos em espécies não reativas, inibindo a hemólise dos eritrócitos.

O EECT foi capaz de inibir a hemólise oxidativa e peroxidação lipídica, além disso, não apresentou atividade hemolítica, demonstrando a segurança desses resultados. Os compostos antioxidantes, como polifenóis presentes no EECT, podem contribuir com a atividade de inibição da peroxidação lipídica, e consequentemente hemólise dos eritrócitos, observada neste estudo.

Resultados semelhantes foram observados na própolis da espécie *T. fiebrigi* no estudo de Campos *et al.* (2015), onde experimentos realizados demonstraram que a própolis foi capaz de inibir radicais ABTS^{•+}, a hemólise oxidativa e a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos.

Além dos ensaios *in vitro* para determinar a atividade antioxidante do EECT, também foi investigada a toxicidade do EECT em um organismo vivo, o nematoide *C. elegans*. Esses nematoides são amplamente utilizados em diferentes estudos devido à similaridade de suas vias metabólicas com mamíferos (Torre *et al.*, 2019). Além disso, esse organismo modelo é uma excelente alternativa ao uso de mamíferos na pesquisa, apresentando vantagens que incluem curto tempo de geração, baixo custo para manutenção e ausência de restrições éticas (Sandner *et al.*, 2021).

No presente estudo, o organismo modelo *C. elegans* foi utilizado nos ensaios de toxicidade, onde os nematoides foram incubados com EECT. Esse ensaio nos permitiu observar que o EECT não foi tóxico aos nematoides nas concentrações e tempo avaliados, o que garante maior segurança para realização de ensaios futuros utilizando modelos *in vivo*. Os resultados obtidos por ensaios de toxicidade são importantes, pois permitem analisar e identificar agentes nocivos em alimentos ou produtos farmacêuticos garantindo, assim, o avanço relacionado à segurança alimentar e ao desenvolvimento de medicamentos (Leite *et al.*, 2020).

8. Conclusões

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente estudo nos levaram a concluir que o cerume da abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* apresenta importante atividade antioxidante, observada em ensaios *in vitro* e em modelo de eritrócitos humanos. Além disso, ensaios *in vivo* nos permitiram avaliar que o EECT não apresenta toxicidade aos nematoides *C. elegans*. Esses dados abrem perspectivas para a realização de novos experimentos buscando investigar outras propriedades terapêuticas ou até mesmo a aplicação do EECT na indústria farmacêutica ou alimentícia. Por fim, os resultados obtidos podem contribuir com a propagação do conhecimento e, conseqüentemente, a conservação da abelha *Tetragonisca fiebrigi*, nativa do Brasil.

Referências bibliográficas:

ALBUQUERQUE, Bianca R.; HELENO, Sandrina A.; OLIVEIRA, M. Beatriz PP; BARROS, Lillian; FERREIRA, Isabela CFR. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021. DOI: 10.1039 / D0FO02324H.

ALENCAR, S. M; OLDONI, T. LC.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. SR.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>.

AL-HATAMLEH, Mohammad AI; BOER, Jennifer C.; WILSON, Kirsty L.; PLEBANSKI, Magdalena; MOHAMUD, Rohimah; MUSTAFA, Mohd Zulkifli. Antioxidant-based medicinal properties of stingless bee products: recent progress and future directions. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 923, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10060923>.

APFELD, Javier; ALPER, Scott. What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*?. **Methods in molecular biology**, v. 1706, p. 53-75, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_4.

ARULSELVAN, Palanisamy; FARD, Masoumeh Tangestani; TAN, Woan Sean; GOTHAI, Sivapragasam; FAKURAZI, Sharida; NORHAIZAN, Mohd Esa; KUMAR, S. Suresh. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>.

BANJARNAHOR, Sofna D.S.; ARTANTI, Nina. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p. 239-44, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.13181/mji.v23i4.1015>.

BIRBEN, Esra; SAHINER, Umit Murat; SACKESEN, Canish; ERZURUM, Serpil; KALAYCI, Omer. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.

BOASQUÍVIS, Patrícia Ferreira; SILVA, Giovana Melo Martins; PAIVA, Franciny Aparecida; CAVALCANTI, Rodrigo Marinho; NUNEZ, Cecília Verônica; OLIVEIRA, Riva de Paula. Guarana (*Paullinia cupana*) extract protects *Caenorhabditis elegans* models for Alzheimer disease and Huntington disease through activation of antioxidant and protein degradation pathways. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018. DOI: 10.1155 / 2018/9241308.

BONAMIGO, Thaliny; CAMPOS, Jaqueline Ferreira; OLIVEIRA, Alex Santos; TORQUATO, Heron Fernandes Vieira; BALESTIERI, José Benedito Perrella; CARDOSO, Claudia Andrea Lima; PAREDES-GAMERO, Edgar Julian; SOUZA, Kely de Picoli; SANTOS, Edson Lucas dos. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of

Plebeia droryana and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **PLoS One**, v. 12, n. 9, 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0183983](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183983).

BRODKIEWICZ, Ivana Y.; REYNOSO, Marcos A.; VERA, Nancy R. *In vivo* evaluation of pharmacological properties of Argentine stingless bee geopropolis. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43088-020-00058-8>.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, JS, Urban, D. & Melo, GAR (Orgs). **Catálogo das Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da Região Neotropical - versão online**. Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 26 de maio de 2021.

CAMPOS, Jaqueline Ferreira; SANTOS, Uilson Pereira dos; MACORINI, Luis Fernando Benitez; MELO, Adriana Mary Mestriner Felipe de; BALESTIERI, José Benedito Perrella; PAREDES-GAMERO, Edgar Julian; CARDOSO, Claudia Andre Lima; SOUZA, Kely de Picoli; SANTOS, Edson Lucas dos. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374-380, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>.

CAMPOS, Jaqueline Ferreira; SANTOS, Uilson Perereira dos; ROCHA, Paola dos Santos da; DAMIÃO, Marcio José; BALESTIERI, José Benedito Perrella; CARDOSO, Claudia Andrea Lima; PAREDES-GAMERO, Edgar Julian; ESTEVINHO, Leticia Miranda; SOUZA, Kely de Picoli; SANTOS, Edson Lucas dos. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/296186>.

CORSI, Ann K.; WIGHTMAN, Bruce; CHALFIE, Martin. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

DOMINGUES, Caio Eduardo da Costa; INOUE, Lais Vieira Bello; SAILVA-ZACARIN, Elaine Cristina Mathias da; MALASPINA, Osmar. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111395>.

DENGG, Marlene; VAN MEEL, Jacques C.A. *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 50, n. 3, p. 209-214, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.04.002>.

DORNELES, Andressa Linhares; ROSA, Annelise de Souza; BLOCHTEIN, Betina. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 48, n. 5, p. 612-620, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0502-x>.

DURACKOVA, Zdenka. Free radicals and antioxidants for non-experts. **Systems biology of free radicals and antioxidants**, p. 537-565, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-30018-9_2.

FLORES, Fabio Fernando; HILGERT, Norma Inés; LUPO, Liliana Concepción. Melliferous insects and the uses assigned to their products in the northern Yungas of Salta, Argentina. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 27, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13002-018-0222-y>.

Fototeca Cristiano Menezes, FCM. **Species link**. Disponível em: <https://specieslink.net/col/FCM/>. Acesso em 06 de novembro de 2021.

FRÉZAL, Lise; FÉLIX, Marie-Anne. The natural history of model organisms: *C. elegans* outside the Petri dish. **eLife**, v. 4, 2015. DOI: 10.7554 / eLife.05849.

GE, Xiangzhen; JING, Luzhen; ZHAO, Kun; SU, Chunyan; ZHANG, Bo; ZHANG, Qian; HAN, Lihong; YU, Xiuzhu; LI, Wenhao. The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color. **Food Chemistry**, v. 335, n. 127655, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127655>.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220-1234, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>.

GUPTA, Deepika; GUPTA, Rajinder K. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: *in vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-13>.

HAMILTON, Karina D.; BROOKS, Peter R.; OGBOURNE, Steven M.; RUSSEL, Fraser D. Natural products isolated from *Tetragonula carbonaria* cerumen modulate free radical-scavenging and 5-lipoxygenase activities *in vitro*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1748-6>.

HAMINIUK, Charles W.I.; MACIEL, Giselle M.; PLATA-OVIEDO, Manuel S. V.; PERALTA, Rosane M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>.

HUNT, Piper Reid. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.3357>.

HUSSAIN, Tarique; TAN, Bie; YIN, Yulong; BLACHIER, Francois; TOSSOU, Myrlene C. B.; RAHU, Najma. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>.

IFEANYI, Obeagu Emmanuel. A review on free radicals and antioxidants. **International Journal of Current Research in Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 123-133, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.22192/ijcrms.2018.04.02.019>.

JENSEN, Svend J. Knak. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 666, p. 387-392, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.08.037>.

KABEL, Ahmed M. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. **World Journal of Nutrition and Health**, v. 2, n. 3, p. 35-38, 2014. DOI: 10.12691/jnh-2-3-2.

KAUR, Harpreet; GUPTA, Shalini; VERMA, Minni; SINGH, Kamaljit; SINGH, Jagmohan. Free radicals and antioxidants in human health and disease - An overview. **Research & Reviews in BioScience**, v. 7, n. 5, p. 187-191, 2013.

LAVINAS, Flavia C.; MACEDO, Ellis Helena B. C.; SÁ, Gabriel B. L.; AMARAL, Ana Claudia F.; SILVA, Jefferson R. A.; AZEVEDO, Mariana M. B.; VIEIRA, Bárbara A.; DOMINGOS, Thaisa Francielle S.; VERMELHO, Alane B.; CARNEIRO, Carla S.; RODRIGUES, Igor A. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 389-399, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.007>.

LEITE, Natasha Rios; ARAÚJO, Laura Costa Alves de; ROCHA, Paola dos Santos da; AGARRAYUA, Danielle Araujo; ÁVILA, Daiana Silva; CAROLLO, Carlos Alexandre; SILVA, Denise Brentan; ESTEVINHO, Letícia Miranda; SOUZA, Kely de Picoli; SANTOS, Edson Lucas dos. Baru Pulp (*Dipteryx alata* Vogel): Fruit from the Brazilian Savanna Protects against Oxidative Stress and Increases the Life Expectancy of *Caenorhabditis elegans* via SOD-3 and DAF-16. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10081106>.

LIAO, Vivian Hsiu-Chuan. Use of *Caenorhabditis elegans* to study the potential bioactivity of natural compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1737-1742, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05700>.

LIBERIO, Silvana A.; PEREIRA, Antônio Luís A.; DUTRA, Richard P.; REIS, Aramys S.; ARAÚJO, Maria José A. M.; MATTAR, Nadia S.; SILVA, Lucilene A.; RIBEIRO, Maria Nilce S.; NASCIMENTO, Flávia Raquel F.; GUERRA, Rosane N. M.; MONTEIRO-NETO, Valério. 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**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-108>.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, v. 763, p. 1-10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.

LORENZO, Jose M.; MUNEKATA, Paulo E.S.; GÓMEZ, Belen; BARBA, Francisco J.; MORA, Leticia; PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, Cristina; TOLDRÁ, Fidel. Bioactive

peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in food science & technology**, v. 79, p. 136-147, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>.

LOXTERKAMP, Elizabeth; CHA, Jaaram; WU, Katherine; SULLIVAN, Janessa; HOLBK, Olivia; GHAITH, Hazar; SRUN, Lena; BAUER, Deborah E. Behavioral Differences between Male and Hermaphrodite *C. elegans*. **Micropublication Biology**, v. 2021, 2021. DOI: 10.17912/micropub.biology.000431.

LU, Shelly C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>.

LUO, Xuan; DONG, Yating; GU, Chen; ZHANG, Xueli; MA, Haile. Processing technologies for bee products: An overview of recent developments and perspectives. **Frontiers in nutrition**, v. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.727181>.

MARTINELLO, Marianna; MUTINELLI, Franco. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 71, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10010071>.

MARTÍNEZ, Ramón Alejandro; SCHVEZOV, Natasha; BRUMOVSKY, Luis Alberto; ROMÁN, Amada Beatriz Pucciarelli. Influence of temperature and packaging type on quality parameters and antimicrobial properties during Yateí honey storage. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 196-202, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.17717>.

MATHEW, Blessy Baby; TIWARI, Archana; JATAWA, Suresh Kumar. Free radicals and antioxidants: A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, p. 4340-4343, 2011.

MAURY, Gabriel Llauradó; RODRÍGUEZ, Daniel Méndez; HENDRIX, Sophie; ARRANZ, Julio César Escalona; BOIX, Yilan Fung; PACHECO, Ania Ochoa; DÍAZ, Jesús García; MORRIS-QUEVEDO, Humberto J.; DUBOIS, Albys Ferrer; ALEMAN, Elizabeth Isaac; BEENARTS, Natalie; MÉNDEZ-SANTOS, Isidro E; RATÓN, Teresa Orberá; COS, Paul; CUYBERS, Ann. Antioxidants in plants: A valorization potential emphasizing the need for the conservation of plant biodiversity in Cuba. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1048, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9111048>.

MEDA, Aline; LAMIEN, Charles Euloge; ROMITO, Marco; MILLOGO, Jeanne; NACOULMA, Odile Germaine. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; WITKOWSKA, Anna Maria; ZUJKO, Małgorzata Elżbieta. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>.

MONTEIRO-ALFREDO, Tamaeh; MATAFOME, Paulo; IACIA, Bianca Pancoti; ANTUNES, Kátia Ávila; SANTOS, Jéssica Maurino dos; CUNHA, Janielle da Silva Melo da; OLIVEIRA, Sara; OLIVEIRA, Alex Santos; Campos, Jaqueline Ferreira; MAGALHÃES, Mariana; CABRAL, Célia; SEIÇA, Raquel; CARDOSO, Andre Lima; OLIVEIRA, Caio Fernando Ramalho de; SANTOS, Edson Lucas dos; SOUZA, Kely Picoli de. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. Leaves Increase SIRT1 Levels and Improve Stress Resistance. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/5238650>.

NEHA, Kumari; HAIDER, M. D. Rafi; PATHAK, Ankita; YAR, M. Shahar. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>.

NUGITRANGSON, Pongvit; PUTHONG, Songchan; IEMPRIDEE, Tawin; PIMTONG, Wittaya; PORNPAKAKUL, Surachai; CHANCHAO, Chanpen. *In vitro* and *in vivo* characterization of the anticancer activity of Thai stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) cerumen. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 2, p. 166-176, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1177/1535370215600102>.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.

PAUNOVIĆ, Milica G.; MATIĆ, Miloš M.; OGNJANOVIĆ, Branka I.; SAIČIĆ, Zorica S. Antioxidative and haematoprotective activity of coenzyme Q10 and vitamin E against cadmium-induced oxidative stress in Wistar rats. **Toxicology and industrial health**, v. 33, n. 10, p. 746-756, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/0748233717725480>.

PHAM-HUY, Lien Ai; HE, Hua; PHAM-HUY, Chuong. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

PIMENTEL, Tatiana Colombo; ROSSET, Michele; SOUSA, Janaina Maria Batista; OLIVEIRA, Louise Iara Gomes de; MAFALDO, Isis Meireles; PINTADO, Maria Manuela Estevez; SOUZA, Evandro Leite de; MAGNANI, Marciene. Stingless bee honey: An overview of health benefits and main market challenges. **Journal of Food Biochemistry**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13883>.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta; IORDACHE, Florin; STANCA, Loredana; PREDOI, Gabriel; SERBAN, Andreea Iren. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>.

POPOVA, Milena; TRUSHEVA, Boryana; BANKOVA, Vassya. Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. **Phytomedicine**, v. 86, n. 153098, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153098>.

POPOVA, Milena; GERGINOVA, Dessislava; TRUSHEVA, Boryana; SIMOVA, Svetlana; TAMFU, Alfred Ngenge; CEYLAN, Ozgur; CLARK, Kerry; BANKOVA,

Vassya. A Preliminary Study of Chemical Profiles of Honey, Cerumen, and Propolis of the African Stingless Bee *Meliponula ferruginea*. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 997, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10050997>.

POSPÍŠIL, Pavel; YAMAMOTO, Yasusi. Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 457-466, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.005>.

RE, Roberta; PELLEGRINI, Nicoletta, PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

REITER, Tiffany A. NO[•] chemistry: a diversity of targets in the cell. **Redox Report**, v. 11, n. 5, p. 194-206, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1179/135100006X116718>.

ROUBIK, David W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 124-143, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2006026>.

RODRÍGUEZ-CHÁVEZ, José Luis; COBALLASE-URRUTIA, Elvia; NIETO-CAMACHO, Antonio; DELGADO-LAMAS, Guillermo. Antioxidant capacity of “Mexican arnica” *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives: Their anti-inflammatory evaluation and effect on *C. elegans* life span. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/843237>.

SALLEH, Sharifah Nur Amalina Syed; HANAPIAH, Nur Ayuni Mohd; JOHARI, Wan Lutfi Wan; AHMAD, Hafandi; OSMAN, Nurul Huda. Analysis of bioactive compounds and chemical composition of Malaysian stingless bee propolis water extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.049>.

SANDNER, Georg; KÖNIG, Alice; WALLNER, Melanie; WEGHUBER, Julian. Alternative model organisms for toxicological fingerprinting of relevant parameters in food and nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-18, 2021.

SEN, Saikat; CHAKRABORTY, Raja; SRIDHAR, C.; REDDY, Y. S. R.; DE, Biplab. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **International journal of pharmaceutical sciences review and research**, v. 3, n. 1, p. 91-100, 2010.

SCHVEZOV, Natasha; PUCCIARELLI, Amada B.; VALDES, Belen; DALLAGNOL, Andrea M. Characterization of yateí (*Tetragonisca fiebrigii*) honey and preservation treatments: Dehumidification, pasteurization and refrigeration. **Food Control**, v. 111, n. 107080, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107080>.

SHANAHAN, Maggie; SPIVAK, Marla. Resin use by stingless bees: a review. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 719, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects12080719>.

SHARIFI-RAD, Mehdi; KUMAR, Nanjangud V. Anil; ZUCCA, Paolo; VARONI, Elena Maria; DINI, Luciana; PANZARINI, Elisa; RAJKOVIC, Jovana; FOKOU, Patrick Valere

Tsouh; AZZINI, Elena; PELUSO, Ilaria; MISHRA, Abhay Prakash; NIGAM, Manisha; RAYESS, Youssef El; BEYROUTHY, Marc El; POLITO, Letizia; IRITI, Marcello; MARTINS, Natália; MARTORELL, Miguel; DOCEA, Anca Oana; SETZER, William N.; CALINA, Daniela; CHO, William C; SHARIFI-RAD, Javad. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.

SIES, Helmut. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122-126, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>.

SIMIONI, Carolina; ZAULI, Giorgio; MARTELLI, Alberto M.; VITALE, Marco; SACCHETTI, Gianni; GONELLI, Arianna; NERI, Luca M. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 17181, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.24729.

SINGH, Ravindra Pratap; SHARAD, Shashwat; KAPUR, Suman. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. **Journal, Indian Academy of Clinical Medicine**, v. 5, n. 3, p. 218-225, 2004.

STUCHI, Ana Lúcia Paz Barateiro; TOLEDO, Vagner de A. Arnaut; LOPES, Denise Alves; CANTAGALLI, Liriana Belizário; RUVOLO-TAKASUSUKI, Maria Claudia Colla. Molecular marker to identify two stingless bee species: *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 123-134, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v59i1.671>.

TORRE, María Pilar; CAVERO, Rita Yolanda; CALVO, Maria Isabel; VIZMANOS, José Luis. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity *in vivo*. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 142, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8050142>.

TSAO, Rong. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu2121231>.

VO, Thi Thuy Tien; CHU, Pei-Ming; TUAN, Vo Phuoc; TE, Joyce Si-Lang; LEE, I-Ta. The promising role of antioxidant phytochemicals in the prevention and treatment of periodontal disease via the inhibition of oxidative stress pathways: Updated insights. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, 2020. DOI: 10.3390/antiox9121211.

VOSSLER, Favio Gerardo; FAGÚNDEZ, Guillermina Andrea; BLETTLER, Diego Cesar. Variability of food stores of *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) from the Argentine Chaco based on pollen analysis. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, 2014. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.449-460>.

WEIDINGER, Adelheid; KOZLOV, Andrey V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472-484, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom5020472>.

YADAV, Anuj; KUMARI, Rewa; YADAV, Ashwani; MISHRA, J.P.; SRIVASTAVA, Seweta; PRABHA, Shashi. Antioxidants and its functions in human body - A Review. **Research in environment and life sciences**, v. 9, n. 11, p. 1328-1331, 2016.

YAMAN, Suzan Onur; AYHANCI, Adnan. Lipid Peroxidation. In: **Lipid Peroxidation**. IntechOpen, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.95802.

YOSHIKAWA, Toshikazu; NAITO, Yuji. What is oxidative stress?. **Japan medical association journal**, v. 45, n. 7, p. 271-276, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>.

YUCEL, Banu; TOPAL, Erkan; KOSOGLU, Mustafa. Bee Products as Functional Food. In: SHIOMI, Naofumi; WAISUNDARA, Viduranga (Ed.). **Superfood and Functional Food: The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine**. Croatia: SPI Global, 2017. C. 2, p. 15-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/65477>.

ZHANG, Yu-Jie; GAN, Ren-You; LI, Sha; ZHOU, Yue; LI, An-Na; XU, Dong-Ping; LI, Hua-Bin. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21138-21156, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules201219753>.

ZHENG, Cheng-Dong; LI, Gang; LI, Hu-Qiang; XU, Xiao-Jing; GAO, Jin-Ming; ZHANG, An-Ling. DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. **Natural product communications**, v. 5, n. 11, p. 1759 - 1765, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501112>.

ZWIRCHMAYR, Julia; KIRCHWEGGER, Benjamin; LEHNER, Theresa; TAHIR, Ammar; PRETSCH, Dagmar; ROLLINGER, Judith M. A robust and miniaturized screening platform to study natural products affecting metabolism and survival in *Caenorhabditis elegans*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69186-6>.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIGRAN

Dourados, 20 de Novembro de 2012.

Prezado Pesquisador
Edson Lucas dos Santos

O Projeto de vossa autoria 123/12, intitulado: “Potencial antioxidante de plantas e própolis de abelhas nativas do cerrado” foi integralmente **APROVADO** pelo CEP-UNIGRAN e poderá ser conduzido.

Ressalto que os relatórios semestrais devem ser apresentados ao Comitê para acompanhamento e que alterações em seu projeto devem ser avisadas previamente a coordenação.

Respeitosamente,


Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo
Coordenadora do CEP-UNIGRAN

Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Universitário da Grande Dourados
R: Balbina de Matos, 2121 – Fone: (67) 3411-4207 / Fax: 3411-4167 – CEP: 79824-900 – Dourados – MS
E-mail: comitedeetica@unigran.br