

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E TOXICIDADE DE
PRÓPOLIS DE DUAS ABELHAS NATIVAS DO BRASIL:**

Scaptotrigona depilis E *Melipona quadrifasciata anthidioides*

Thaliny Bonamigo

Doctor Scientiae

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2017

THALINY BONAMIGO

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E TOXICIDADE DE
PRÓPOLIS DE DUAS ABELHAS NATIVAS DO BRASIL:
Scaptotrigona depilis E *Melipona quadrifasciata anthidioides***

Tese apresentada à IFES Tituladoras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biodiversidade, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae.*

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2017

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Manoel pelo companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus pais Agostinho e Cleusa, que dignamente me apresentaram à importância dos estudos e o caminho da honestidade e persistência.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem confio minhas preocupações e planos. Aquele que nos presenteia com a vida, e que coloca as pessoas certas no nosso caminho para que possamos crescer segundo os seus propósitos.

Ao Prof. Edson, a minha gratidão e reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de um profissional comprometido, que transmite serenidade, respeito e sabedoria. Obrigada pela confiança e amizade, que ela permaneça além desta jornada.

À minha família pelo estímulo e paciência.

Ao Grupo de Pesquisa em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicada ao Metabolismo (GEBBAM) pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao professor Dr. José B. P. Balestieri (UFGD) pela assistência e identificação das abelhas sem ferrão.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT e Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil – CNPq pela bolsa concedida.

A Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo ambiente amigável e pela estrutura fornecida. Ao corpo docente do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, pelos ensinamentos.

Minha gratidão e reconhecimento a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

BONAMIGO, Thaliny, M.S., Universidade Federal da Grande Dourados, junho de 2017. **ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E TOXICIDADE DE PRÓPOLIS DE DUAS ABELHAS NATIVAS DO BRASIL:** *Scaptotrigona depilis* E *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Orientador: Edson Lucas dos Santos. Co-Orientador: Claudio André Barbosa de Lira. Meliponíneos, conhecidos como abelhas sem ferrão, englobam muitas espécies nativas do Brasil. Algumas espécies produzem mel, geoprópolis, pólen, cerume e própolis, que são utilizados pela população humana para fins alimentares e medicinais. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar os constituintes químicos e avaliar as atividades antioxidante, citotóxica e a toxicidade dos extratos etanólicos de própolis das espécies de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis* (EEP-S) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EEP-M), nativas do Brasil. As amostras de própolis foram coletadas em Dourados, Mato Grosso do Sul. A partir destas foram preparados extratos etanólicos de própolis (EEPs). A composição química dos EEPs foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Posteriormente, avaliou-se à capacidade antioxidante *in vitro* dos EEPs através dos ensaios de captura dos radicais livres: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico de 2,2'-azino-bis (ABTS), e do ensaio de inibição da hemólise oxidativa e da peroxidação lipídica induzida pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto (AAPH). O potencial citotóxico e perfil de morte celular foram avaliados contra células eritroleucêmicas (K562) e determinados por citometria de fluxo e, a toxicidade *in vivo* foi avaliada utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Compostos fenólicos, ácidos, flavonoides, terpenos, e tocoferol foram identificados em ambos os extratos em diferentes quantidades. No EEP-S foi observado grandes quantidades de amirinas, por outro lado, o EEP-M apresentou aproximadamente quatro vezes mais tocoferol que o EEP-S, e compostos identificados exclusivamente no EEP-M. Em relação aos ensaios antioxidantes, os EEPs foram capazes de promover a captura dos radicais livres DPPH e ABTS, e proteger as hemácias humanas contra hemólise oxidativa e

peroxidação lipídica. Nos três métodos avaliados o EEP-M mostrou-se mais eficiente que o EEP-S. Na avaliação de citotoxicidade, os EEP-S e EEP-M mostraram-se citotóxicos contra células K562, sendo a necrose o principal mecanismo de morte observado. Adicionalmente, nas concentrações em que os EEPs foram citotóxicos contra células K562, não foi observado toxicidade contra o *C. elegans*. Deste modo, conclui-se que os EEPs apresentam atividades antioxidante e citotóxica as quais são atribuídas à composição química, incluindo compostos fenólicos, ácidos, flavonoides, terpenos e/ou ao sinergismo entre os diferentes compostos presentes nestas própolis. Portanto, os EEPs de *S. depilis* e *M. q. anthidioides* apresentam potencial terapêutico na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e a proliferação de células tumorais.

Palavras-chave: Cromatografia, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, células eritroleucêmicas K562, *Caenorhabditis elegans*.

ABSTRACT

BONAMIGO, Thaliny, M.S., Federal University of Grande Dourados, june 2017. **ANTIOXIDANT, CITOTOXIC AND TOXICITY ACTIVITIES OF PROPOLIS FROM TWO NATIVE BEES IN BRAZIL: *Scaptotrigona depilis* E *Melipona quadrifasciata anthidioides*.** Advisor: Edson Lucas dos Santos. Co-Advisor: Claudio André Barbosa de Lira. Meliponíneos, known as stingless bees, encompass many species native to Brazil. Some species produce honey, geopropolis, pollen, cerumen and propolis, that are used by the human population for alimentary and medicinal purposes. In this context, the objective of this study was to identify the chemical constituents and to evaluate the antioxidant, cytotoxic and toxicity activities of the ethanolic extracts of propolis of the species of stingless bees *Scaptotrigona depilis* (EEP-S) and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EEP-M), Native of Brazil. The samples of propolis were collected in Dourados, Mato Grosso do Sul. From these, ethanolic extracts of propolis (EEPs) were prepared. The chemical composition of the EEPs was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequently, the *in vitro* antioxidant capacity of EEPs was assessed by the free radical capture assays: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-3-ethylbenzothiazoline- Bis (ABTS), and the lipid peroxidation inhibition test induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Cytotoxic potential and cell death profile were evaluated against erythroleukemic cells (K562) and determined by flow cytometry, and *in vivo* toxicity was evaluated using the nematode *Caenorhabditis elegans*. Phenolic compounds, acids, flavonoids, terpenes, and tocopherol were identified in both extracts in different amounts. In the EEP-S, large amounts of amirin were observed; on the other hand, EEP-M presented approximately four times more tocopherol than EEP-S, and compounds identified exclusively in EEP-M. Regarding the antioxidant assays, the EEPs were able to promote the capture of free radicals DPPH and ABTS, and to protect human red blood cells against oxidative hemolysis and lipid peroxidation. In all three methods, EEP-M was more efficient than EEP-S. In the evaluation of cytotoxicity, EEP-S and EEP-M were cytotoxic against K562 cells,

with necrosis being the main mechanism of death observed. In addition, at concentrations at which EEPs were cytotoxic against K562 cells, no toxicity was observed against *C. elegans*. Thus, it is concluded that the EEPs present antioxidant and cytotoxic activities which are attributed to the chemical composition, including phenolic compounds, acids, flavonoids, terpenes and/or synergism between the different compounds present in these propolis. Therefore, the EEPs of *S. depilis* and *M. q. anthiodiooides* present therapeutic potential in the prevention and/or treatment of diseases related to oxidative stress and tumor cell proliferation.

Keywords: Chromatography, oxidative stress, lipid peroxidation, erythroleukemic cells K562, *Caenorhabditis elegans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Abelhas.....	4
2.1.1 Meliponíneos.....	4
2.1.2 <i>Scaptotrigona depilis</i>	5
2.1.3 <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	6
2.2 Própolis.....	7
2.2.1 Compostos químicos da própolis.....	9
2.2.2 Atividades biológicas da própolis.....	11
2.2.2.1 Espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante da própolis.....	12
2.2.2.2 Atividade antitumoral da própolis	18
2.3 Câncer e leucemia	24
2.3.1 Quimioterapicos derivados de plantas e morte celular	27
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 ARTIGO: Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: <i>Scaptotrigona depilis</i> and <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	34
5 CONCLUSÃO GERAL	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Os meliponíneos, também denominados “abelhas sem ferrão”, pertencem à tribo Meliponini, da qual muitas espécies são nativas do Brasil (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). Neste grupo de abelha, conhecidas por apresentarem um ferrão atrofiado, estão mais de 32 diferentes gêneros, dentre eles Plebeia, Scaptotrigona, Melipona, Trigona, e Lestrimelitta (Camargo e Pedro, 2013), os quais são responsáveis, por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (Slaa *et al.*, 2006; Ramvi, 2015; Sousa *et al.*, 2016).

No Brasil, dentre as espécies pertencentes a esta tribo, encontram-se: *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) e *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) (Camargo e Pedro, 2013). A maioria das abelhas sem ferrão apresenta pequeno porte, hábito eussocial e produzem mel, pólen, cerume e própolis (Nogueira-Neto, 1997; Choudharia *et al.*, 2012).

A própolis é mistura complexa de compostos formada por material resinoso e balsâmico coletado dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores pelas abelhas (Bankova *et al.*, 2000; Castaldo e Capasso, 2002). Apresenta cor, sabor, aroma e composição química variada em decorrência das diferentes origens vegetais e secreções salivares e enzimas das próprias abelhas que são adicionadas à resina (Castaldo e Capasso, 2002; Bankova, 2014). Outros fatores como a zona de temperatura e sazonalidade também podem influenciar a qualidade e quantidade dos compostos químicos presentes nas diferentes própolis (Sawaya *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007).

Este produto apícola é descrito por apresentar efeito antioxidante (Pérez-Peréz *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2015), antiúlcera gástrica (Mohafez *et*

al., 2010; El-Hady *et al.*, 2013), anti-inflamatório (Paulino *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2015), antiviral (Kai *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015), antiproliferativo (Banskota *et al.*, 2002) e antitumoral (Borges *et al.*, 2011; Dornelas *et al.*, 2012; Abubakar *et al.*, 2014).

Outra atividade, já descrita na literatura é a ação antimicrobiana da própolis frente a agentes etiológicos, como, bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus strains*, *Streptococcus pyogenes* e Gram-negativas, *Escherichia coli*, bem como leveduras, sobretudo *Candida albicans* (Choudharia *et al.*, 2012; Pérez-Pérez *et al.*, 2013).

As atividades biológicas dos extratos de própolis podem estar relacionadas com os diferentes compostos químicos presentes nesta resina. Em extrato de própolis de abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) foram detectados ácidos masticadienóico e masticadienólico (Sawaya *et al.*, 2006). Em extratos etanólicos de própolis de *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) foram identificados ácido benzoico e ácido cinâmico, ácido caurenóico, tocoferol, entre outros constituintes (Campos *et al.*, 2015), os quais foram relacionados com a atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato.

Portanto, o interesse em pesquisas com própolis, decorre das propriedades terapêuticas a ela atribuídas, e também ao alto valor agregado de venda desse produto natural no Brasil e no mundo (Machado *et al.*, 2012; Premratanachai e Chancao, 2014). Deste modo, em busca de novos recursos da fauna e flora nativa brasileira, recentemente, alguns estudos têm focado em pesquisas com abelhas sem ferrão (Campos *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015; Kustiawan *et al.*, 2015), que produzem própolis, como é o caso da

Scaptotrigona depilis e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, encontradas no Brasil (Camargo e Pedro, 2013). Relatos científicos sobre o potencial farmacológico dos compostos químicos produzidos por estas abelhas são limitados. Sabe-se que algumas comunidades indígenas utilizam os produtos apícolas como repelente e no tratamento de tosse, gripe e febre (Ballivián et al., 2008; Sousa et al., 2016).

Espécies de abelhas sem ferrão encontram-se em processo acelerado de desaparecimento (Ramvi, 2015). Neste contexto, estudos que visem o conhecimento dos recursos naturais apícolas e seus possíveis benefícios à humanidade são fundamentais, pois mostram a importância da preservação destas espécies de abelhas, que apresentam grande potencial para identificação e produção de moléculas biologicamente ativas.

Portanto, este estudo propõe identificar os constituintes químicos e avaliar as atividades antioxidante, citotóxica e a toxicidade de extratos etanólicos das própolis das espécies de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, encontradas em Dourados, Mato Grosso do Sul – Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abelhas

Dentre os filos zoológicos os insetos compõem cerca de 60% das espécies conhecidas e estão distribuídos nos diferentes biomas do Brasil (Rafael *et al.*, 2012). Estes animais são importantes para a população humana, exercendo de modo geral, aspectos positivos como a utilização na alimentação, decomposição e reciclagem de nutrientes, dispersão de sementes, e polinização de muitas espécies vegetais nativas (Michener, 2007; Calor, 2009).

As abelhas são insetos eussociais, pertencentes à ordem Hymenoptera (Nogueira-Neto, 1997), e estão reunidas na superfamília Apoidea, onde a maioria utiliza néctar e pólen das flores como fonte de alimento (Nogueira-Neto, 1997; Michener, 2007). Esta superfamília é dividida em várias famílias, dentre elas a família Apidae, a qual possui hábitos sociais mais avançados e é ainda dividida em quatro subfamílias: Bombíneos, Euglossíneos, Apíneos e Meliponíneos, (Nogueira-Neto, 1997).

2.1.1 Meliponíneos

Meliponíneos são encontrados em regiões de clima tropical e subtropical do mundo e estão distribuídos em 32 diferentes gêneros, dentre eles Plebeia, Scaptotrigona, Melipona, Trigona, Trigonisca e Tetragonisca (Camargo e Pedro, 2013), os quais são os mais conhecidos e estudados.

Segundo Pedro (2014), em estudo sobre as abelhas sem ferrão na fauna brasileira, até 2014 já tinham sido identificadas 244 espécies de abelhas sem ferrão. Estes insetos são eficientes polinizadores, principalmente das árvores nativas (Kerr *et al.*, 1996; Slaa *et al.*, 2006). A maioria das abelhas sem ferrão apresenta pequeno porte, conhecidas como mirim, no entanto há também espécies maiores, como a *Melipona quadrifasciata* que são denominadas popularmente de uruçu (Nogueira-Neto, 1997).

Algumas espécies de meliponíneos produzem mel, geoprópolis (própolis misturada com cera e barro ou terra), pólen, cerume e própolis os quais têm sido utilizados como alternativa econômica para agricultura familiar e contribuindo para uso sustentável dos recursos naturais (Nogueira-Neto, 1997; Venturieri, 2013). Estes produtos tem apresentado elevado valor econômico, que é atribuído aos seus diferentes usos medicinais (Souza, 2010; Premratanachai e Chancao, 2014).

2.1.2 *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942)

Scaptotrigona depilis (Moure, 1942), popularmente conhecida como abelha canudo, é encontrada no continente Americano. No Brasil é distribuída nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (Camargo e Pedro, 2013; Pedro, 2014). O gênero Scaptotrigona contem 22 espécies de abelhas descritas na literatura, e destas cerca de 10 ocorrem no Brasil (Oliveira *et al.*, 2013; Pedro, 2014).

Esta espécie é considerada pouco agressiva, vive em troncos ocos de árvores, e formam colônias bastante numerosas. O comprimento do

seu corpo pode variar de 5 a 7 mm, sendo maior que as abelhas mirins (Michener, 2007). Devido à necessidade de grande quantidade de alimento ao longo do ano, possuem hábito generalista em resposta à diversidade de fontes florais disponíveis (Ferreira *et al.*, 2010).

A abelha canudo produz cera, geoprópolis, mel e própolis (Michener, 2007; Lira *et al.*, 2014). As abelhas sem ferrão produzem mel e própolis em quantidade inferiores quando comparados à abelha Europa (*Apis mellifera* L.) (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006; Yamoto *et al.*, 2007).

O mel de *S. depilis* normalmente apresenta cor âmbar escuro e é mais líquido que o mel de *A. mellifera* (Lira *et al.*, 2014). Embora as características microbiológicas, físico-químicas e microscópicas do mel desta espécie já tenham sido descritas (Oliveira *et al.*, 2013), estudos sobre as propriedades terapêuticas, desse e de outros produtos apícolas ainda são escassos.

2.1.3 *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier, 1836)

Melipona quadrifasciata anthidioides (Lepeletier, 1836), conhecida popularmente como mandaçaia, é uma espécie de abelha nativa do Brasil, e apresenta ampla distribuição geográfica (Camargo e Pedro, 2013).

As abelhas mandaçaias apresentam aspecto robusto, com corpo relativamente grande (10 e 11 mm de comprimento) quando comparado a outras espécies de meliponíneos (Michener, 2007). Estas abelhas nidificam em troncos de árvores ocos de altura mediana e são sensíveis as variações de

temperatura do ambiente, não construindo seus ninhos em lugares abertos ou desmatados (Oliveira, 2017).

M. q. anthidioides produz cerume, mel, geoprópolis e própolis (Nogueira-Neto, 1997). A quantidade de própolis produzida por esta espécie é inferior à abelha Europa, no entanto o gênero *Melipona* é um dos mais produtivos, entre as abelhas sem ferrão (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006; Yamoto *et al.*, 2007).

Há poucos relatos científicos que descrevem as propriedades farmacológicas dos produtos naturais produzidos por esta espécie. Velikova *et al.* (2000) identificaram e isolaram o ácido caurenóico em extrato metanólico de própolis de *M. q. anthidioides* da região Sul do Brasil e verificaram que este composto era responsável pela atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato.

2.2 Própolis

Própolis é um produto apícola, resinoso, produzido pelas abelhas a partir de exsudados de diferentes partes das plantas. Depois de coletado, este material é enriquecido com enzimas e secreções salivares destes insetos (Bankova, 2005; Castaldo e Capasso, 2002). O nome própolis é derivado do grego, significa em defesa da colmeia, cidade ou comunidade, *pro* “em defesa” ou “na entrada”, e *polis* “comunidade” ou “cidade” (Castaldo e Capasso, 2002).

Na colmeia, a própolis é utilizada para vedar frestas ou reparar danos, no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha e para a proteção contra insetos e micro-organismos (Marcucci, 1996). Este produto

apícola vem sendo utilizado há séculos pela humanidade e é um dos poucos remédios naturais que manteve a sua popularidade durante um longo período de tempo (Vargas *et al.*, 2004; Trusheva *et al.*, 2006).

De acordo com relatos, por volta de 1700 a.C, a própolis já era utilizada pelos egípcios para embalsamar corpos devido as suas propriedades anti-putrefação (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Outras civilizações milenares como os assírios, incas, gregos e romanos também utilizavam este produto apícola como agente antipirético, cicatrizante e antisséptico (Castaldo e Capasso, 2002).

No final do século XIX, na África do Sul, a própolis também foi utilizada como agente cicatrizante interno e externo (Silva-Carvalho *et al.*, 2015) e ainda, empregada para aumentar a apetite, e no tratamento de tuberculose e problemas pulmonares (Pereira *et al.*, 2002).

A própolis tem sido utilizada empiricamente e mencionada para tratar queimaduras graves, doenças inflamatórias superficiais, fortalecer o sistema imunológico, prevenir bronquite infantil e pneumonia crônica, além da sua utilização na forma de cosméticos e dermocosméticos (Sforcin, 2007; Lustosa *et al.*, 2008; Wagh, 2013). Esta resina é um remédio natural, disponível comercialmente sendo empregada como balas, spray bucal, extratos, comprimidos em gotas e pastilhas (Pinto *et al.*, 2011; Wagh, 2013).

Neste contexto, as diferentes utilizações da própolis pela medicina popular e sua complexa composição química, vêm atraindo o interesse de pesquisadores, os quais têm realizados estudos *in vitro* e *in vivo* para obter informações sobre as potencialidades farmacológicas da própolis e seus

mecanismos de ação (Machado *et al.*, 2012; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Osés *et al.*, 2016).

2.2.1 Compostos químicos da própolis

Estudos sobre composição química da própolis mostram que esse produto apícola contém cerca de 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, micronutrientes, como manganês, ferro, cálcio, estrôncio, cobre e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (Burdock, 1998; Park *et al.*, 2002; Menezes, 2005; Funari e Ferro, 2006).

Porém, estes valores podem ser alterados uma vez que fatores como o tipo de vegetação utilizada para coleta das resinas, as secreções salivares adicionadas a própolis pelas abelhas, a variabilidade genética das espécies, a temperatura e a sazonalidade podem influenciar na qualidade e quantidade dos compostos químicos da própolis (Marcucci, 1996; Sawaya *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007). Esses fatores conferem a este produto natural cor, sabor, aroma e composição química diferentes (Marcucci, 1996; Burdock, 1998).

Em países de clima temperado a principal fonte botânica para produção de própolis é o exsudado do botão de álamo (*Populus sp.*) (Bankova *et al.*, 2000; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Nestas regiões a flora não é tão diversificada, o que torna esta resina quimicamente semelhante, compostas por flavonoides como o éster feniletil do ácido cafeico (CAPE) (Bankova *et al.*, 2000).

No entanto, em países de clima tropical, onde há grande variação de temperatura e chuvas ao decorrer do ano e há maior diversidade de fontes botânicas, as própolis apresentam composição química bastante variada (Park *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2014). No Brasil, por exemplo, já foram identificados diferentes tipos de própolis, sendo a mais conhecida à própolis verde, produzida principalmente a partir dos exsudados da planta *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae), conhecida popularmente como alecrim do campo (Fischer *et al.*, 2008).

A própolis vermelha é outro tipo de própolis encontrada na região Norte do Brasil. A resina avermelhada, é característica da planta *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. (Fabaceae), as quais são utilizadas preferencialmente por determinadas espécies de abelhas para a fabricação de própolis (Trusheva *et al.*, 2006; Daugsch *et al.*, 2008). Além de verde e vermelha, esta resina pode apresentar ainda coloração amarela ou marrom, dependendo da origem botânica em que foi coletada (Marcucci, 1996).

Desta forma, em consequência da grande diversidade da flora, a composição química da própolis é bastante complexa o que dificulta o entendimento da correlação entre os compostos químicos existentes com as diferentes atividades biológicas que esta resina exerce, e ainda, a padronização do produto natural para efetivo emprego em terapias (Park *et al.*, 2002).

Em diferentes extratos de própolis já foram identificados mais de 300 compostos químicos (Marcucci, 1995; Marcucci *et al.*, 2001), entre eles, compostos fenólicos, flavonoides, terpenos (Bankova *et al.*, 2000; Bomanigo *et*

al., 2017), açucares, álcoois, entre outros (Maciejewicz, 2001; Kurek-Górecka *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015).

2.2.2 Atividades biológicas da própolis

Grande parte das atividades biológicas dos extratos de própolis tem sido atribuída aos compostos fenólicos e flavonoides (Lustosa *et al.*, 2008; Fokt *et al.*, 2010; Abubakar *et al.*, 2014). Estes compostos juntamente com os terpenos são encontrados principalmente em própolis de regiões de clima tropical como Brasil, Cuba, Venezuela e Chile (Lustosa *et al.*, 2008; Silva-Carvalho *et al.*, 2015), as quais tem se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (Trusheva *et al.*, 2006).

Independentemente das variações químicas, os constituintes presentes na própolis são responsáveis pela gama de atividades biológicas que este produto apícola exerce, tais como, efeito antioxidante (Pérez-Pérez *et al.*, 2013; Bonamigo *et al.*, 2017), antiúlcera gástrica (Mohafez *et al.*, 2010; El-Hady *et al.*, 2013), anti-inflamatório (Campos *et al.*, 2015), anestésico local, hepatoprotetor (Castaldo e Capasso, 2002), imunoestimulatório (Lustosa *et al.*, 2008) antiviral (Marcucci, 1995; Kujumgiev *et al.*, 1999), antiproliferativo (Borges *et al.*, 2011; Borawska *et al.*, 2016) e antitumoral (Abubakar *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

2.2.2.1 Espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante da própolis

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas que possuem elétrons desemparelhados na última camada de valência, sendo capazes de oxidar outras substâncias. Em sistemas biológicos, as EROS são produzidas naturalmente pelas células vivas na membrana celular, no citoplasma e na mitocôndria, e fazem parte de processos fisiológicos importantes, como a mediação na transferência de elétrons, sinalização celular (Dröge *et al.*, 2002), produção de ATP, expressão e ativação de alguns genes (Apel e Hirt, 2004), apoptose (Circu *et al.*, 2010), entre outros (Barbosa *et al.*, 2010).

Os organismos aeróbicos metabolizam 85 a 90% do oxigênio consumido na mitocôndria em água, e outra pequena parte deste oxigênio se transforma em EROS (Halliwell, 2005; Barbosa *et al.*, 2010). Não só a cadeia transportadora de elétrons, mas também algumas enzimas como, por exemplo, as NADPH oxidases (Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidase) e ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares, são geradores de EROS como, por exemplo, os radicais superóxido ($O_2\cdot$), hidroxila ($OH\cdot$), alcoxila ($LO\cdot$), peroxila ($LOO\cdot$) e ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual não possui elétrons desemparelhados, porém em sua catálise, é convertido em radical hidroxila ($OH\cdot$) que possui alta reatividade (Barbosa *et al.*, 2010).

No entanto, apesar de participarem de importantes processos fisiológicos, quando produzidos em excesso podem desencadear efeitos

tóxicos, danificando as células, incluindo proteínas, lipídios, ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico, os quais passam a funcionar de forma errônia, resultando no estresse oxidativo (Halliwell, 2005; Kasai e Kawai, 2006).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e o sistema de defesa antioxidante, o que resulta no acúmulo intracelular de espécies reativas (Ferreira e Matsubara, 1997). Os efeitos tóxicos, causados pela produção excessiva de EROS, podem levar às células a morte (Boonstra e Post, 2004), e/ou ao desenvolvimento de diferentes doenças como diabetes (Reis *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2013), doenças cardiovasculares (Savic-Radojevic *et al.*, 2017), Alzheimer (Anoop *et al.*, 2010), cataratas (Rokicki *et al.*, 2017), envelhecimento precoce e câncer (Geier *et al.*, 2009; Liou e Storz, 2010).

Contudo, o organismo humano possui dois sistemas antioxidantes, que incluem defesa endógena enzimática como as enzimas: superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), ou não enzimática, que consiste em antioxidantes biológicos sejam eles produzidos endogenamente como a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico (Halliwell, 2005; Apel e Hirt, 2004), ou moléculas oriundas da ingestão de alimentos como, por exemplo, α-tocoferol, carotenoides, ácido ascórbico, queracetina (Materska, 2008), resveratrol, catequinas, entre outros (Halliwell, 2005; Barbosa *et al.*, 2010; Dueñas-García *et al.*, 2017).

Assim, as defesas antioxidantes no organismo existem como um sistema coordenado e equilibrado, porém, este sistema protetor às vezes é insuficiente para prevenir completamente os danos gerados pelas espécies reativas (Kasai e Kawai, 2006; Barbosa *et al.*, 2010). Isto demonstra a

importância de se identificar compostos naturais e/ou novos compostos que sejam capazes de neutralizar essas moléculas, a fim de prevenir o estresse oxidativo. Neste contexto, vários estudos têm sido realizados para avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais (Laguerre *et al.*, 2007; Mohafez *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2016).

A complexa composição química da própolis tem sido relacionada com sua atividade antioxidante, principalmente pela variação quantitativa e qualitativa de compostos fenólicos presente neste produto apícola (Fabris *et al.*, 2013; Scalbert *et al.*, 2005; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Fabris e colaboradores (2013) mostram que extratos de própolis de diferentes origens geográficas (Brasil, Itália e Rússia), apresentam constituintes químicos semelhantes, porém os compostos majoritários variam conforme a região. Neste estudo, os extratos de própolis brasileiras foram capazes de inibir a peroxidação lipídica (inibição de 50% de captura de 2 mg/mL a 20 mg/mL) e capturar o radical livre DPPH, embora esta atividade antioxidante fosse menor comparada a própolis dos outros países.

Entretanto própolis de abelhas nativas apresentaram atividades antioxidantes mais potentes. As própolis das abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, por exemplo, foram capazes de capturar o radical livre DPPH, em concentrações menores que 61 µg/mL. Adicionalmente, o extrato das própolis destas abelhas protegeram eritrócitos humanos contra hemólise e peroxidação lipídica induzida pela agente oxidante AAPH, em concentrações de 125 µg/mL (Campos *et al.*, 2014; Bonamigo *et al.*, 2017).

Vitaminas como o α -tocoferol (Oyaizu *et al.*, 1999), e outros compostos bioativos como ácido ferúlico, ácido cafeico (CAPE), galangina, p-cumárico e quercetina identificados neste produto, foram relacionados com o efeito antioxidante da própolis (Volpi e Bergonzini, 2006, Orsolic *et al.*, 2006; Fokt *et al.*, 2010).

O CAPE e a quercetina, por exemplo, já apresentam efeito antioxidante em modelos experimentais *in vivo* utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Ambos foram capazes de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo estresse térmico e também aumentaram a expectativa de vida deste nematoide (Saul *et al.*, 2008; Havermann *et al.*, 2014).

Desta forma, muitos estudos tem comprovado que a atividade antioxidante da própolis tem relação com os diferentes compostos fenólicos presentes nesta resina (Scalbert *et al.*, 2005; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Saul *et al.*, 2008), o que pode ser justificado pela estrutura química destas moléculas (Duthie *et al.*, 2003), a qual é capaz de doar hidrogênio ou elétrons, impedindo a oxidação de outras substâncias, particularmente de lipídios (Brand-Williams *et al.*, 1995). Outro mecanismo pelos quais os compostos fenólicos exercem atividade antioxidante é a inativação de enzimas (xantina oxidase, proteína quinase C, oxidase de ácido ascórbico), responsáveis pela produção de EROS (Kurek-Górecka *et al.*, 2014).

Conforme descrito na tabela 1, vários estudos demonstram diferentes mecanismos antioxidantes da própolis produzida por abelhas de diferentes origens geográficas.

Tabela 1. Atividade antioxidante da própolis de diferentes origens geográficas.

Origem geográfica	Características Gerais da Própolis	Mecanismo
Brasil	Própolis da abelha sem ferrão <i>Melipona orbignyi</i>	Captura de radical livre DPPH; Inibição de hemólise oxidativa e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos (Campos <i>et al.</i> , 2014).
Brasil	Própolis da abelha sem ferrão <i>Tetragonisca fiebrigie</i>	Captura de radical livre ABTS; Inibição de hemólise oxidativa e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos (Campos <i>et al.</i> , 2015).
Brasil	Própolis das abelhas sem ferrão <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> e <i>Scaptotrigona depilis</i>	Captura dos radicais livres DPPH e ABTS; Inibição de hemólise oxidativa e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos (Bonamigo <i>et al.</i> , 2017).
Brasil	Própolis verde - derivada de resinas de Alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	Diminuição dos níveis de nitrito, mieloperoxidase, superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase e redução da glutationa / relação glutationa oxidada e dos níveis de malondialdeído em ratos expostos a fumaça do cigarro (Lopes <i>et al.</i> , 2013).
Uruguai	Derivada das resinas de <i>Populus nigra</i> e <i>B. dracunculifolia</i>	Inibição da peroxidação de lipoproteína de baixa densidade e NADPH oxidase e aumento da enzima óxido nítrico sintase em células endoteliais da aorta bovina (Silva <i>et al.</i> , 2011).

Continuação: Tabela 1.

Portugal (Algarve Central)	Própolis europeia – derivada de resinas de álamo (<i>P.nigra</i>)	Captura de radicais livres, quelação de iões metálicos (Miguel <i>et al.</i> , 2010).
Roménia	Própolis europeia – derivada de resinas de álamo (<i>P. nigra</i>)	Diminuição dos níveis de malondialdeído e restauração da atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) em ratos expostos a luz UVB (Bolfa <i>et al.</i> , 2013).
Turquia	Propolis do Mediterrâneo - derivada das resinas de álamo (<i>Populus spp.</i>), eucalipto (<i>Eucalyptus spp.</i>), e castanheira (<i>Castanea sativa</i>)	Diminuição da lesão do DNA induzida pelo H ₂ O ₂ , em fibroblastos (Aliyazicioglu <i>et al.</i> , 2011). Diminuição dos níveis de malondialdeído, superóxido dismutase, e aumento da atividade das enzimas catalase e glutationa peroxidase em peixes expostos a clorpirifos (CPF) (Yonar <i>et al.</i> , 2012).
Sigma Aldrich	Composto isolado CAPE/ característico em propolis europeia, porém encontrado em própolis de outros países como Brasil.	Captura de radical livre, inibição da atividade da enzima xantina oxidase e da peroxidação lipídica (Russo <i>et al.</i> , 2002). Manutenção da atividade da enzima superóxido dismutase, diminuição da atividade da xantina oxidase e dos níveis de malondialdeído e oxidase nítrica em ratos (Hosnuter <i>et al.</i> , 2004). Aumenta a resistência ao estresse e a vida útil em <i>Caenorhabditis elegans</i> (Havermann <i>et al.</i> , 2014).

Fonte: Adaptado de Silva-Carvalho *et al.* 2015.

2.2.2.2 Atividade antitumoral da própolis

Além das plantas medicinais, produtos naturais como à própolis, têm apresentado resultados promissores em estudos que avaliam a atividade antitumoral, despertando interesses farmacológicos. Este produto apícola apresenta diferentes compostos químicos, dentre eles compostos fenólicos, incluindo flavonoides, e terpenos, os quais têm sido relacionados a atividades citotóxicas de diferentes linhagens tumorais (Franchi *et al.*, 2012; Premratanachai e Chanchao, 2014; Kumazaki *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014).

Compostos fenólicos, como ácido cafeico (CAPE) e seus derivados já foram descritos por apresentar efeito anticarcinogênico em células de adenocarcinoma cervical (Hela) (Chang *et al.*, 2010), leucêmicas (HL-60) (Chen *et al.*, 2001), carcinoma cervical metastático humano (HTB-34) (Tyszka-Czochara *et al.*, 2017), células de carcinoma escamoso de pescoço (Detroit 562) (Dziedzic *et al.*, 2017), entre outras. No entanto, não foi observado efeito citotóxico tão intenso do CAPE em linhagens normais como, fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) (Orsolic e Basic, 2003) e fibroblastos de pulmão humano (WI-38) (Chen *et al.*, 2004).

A crisina, outro composto fenólico presente em própolis, também demonstrou efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais, dentre elas tumores de glioma (SVGp12) (Markiewicz-Żukowska *et al.*, 2012), células de adenocarcinoma cervical (HeLa) (Zhang *et al.*, 2004), leucemia (U937C) (Monasterio *et al.*, 2004), carcinoma escamoso de esôfago (KYSE-510) (Zhang *et al.*, 2009) e câncer de mama (MDA-MB-231) (Koo *et al.*, 2010). Este composto e CAPE induzem as células tumorais a apoptose através de

diferentes mecanismos moleculares (Watabe *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2010; Markiewicz-Żukowska *et al.*, 2012), os quais estão exemplificados na Tabela 2, que descreve a atividade citotóxica e os mecanismos de ação de diferentes tipos de própolis e de compostos isolados.

Derivados do ácido cinâmico também são compostos próapoptóticos capazes de induzir linhagens tumorais a morte através de mecanismos intrínsecos e extrínsecos (Kumazaki *et al.*, 2014). Além destes compostos, a maioria dos extratos brutos de própolis promove a morte de linhagens tumorais por apoptose, como demonstrado por Mishima *et al.* (2005), os quais observaram que extrato de própolis (5, 50 e 500 µg/mL) inibe o crescimento de células leucêmicas (HL-60), através ativação de genes que modulam o sistema imunológico e que induzem a apoptose.

Entretanto, outros mecanismos de morte já foram observados e relacionados à ação antitumoral da própolis. Campos e colaboradores (2015) estudaram o efeito do extrato de própolis da abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* contra células eritrolêucemicas (K562) *in vitro*, e observaram que o extrato leva estas células a morte por necrose. Outros extratos de própolis de abelhas sem ferrão também mostraram efeitos citotóxicos desencadeando a necrose como principal mecanismo de morte celular (Campos *et al.*, 2014; Bonamigo *et al.*, 2017).

Própolis iraquiana promoveu a morte via apoptose em células leucêmicas (HL-60) e via necrose em células de carcinoma de cólon humano (HCT-116), demonstrando que o mecanismo de morte pode ser dependente do tipo de célula cancerígena (Sulaiman *et al.*, 2012). O efeito antitumoral em células HCT-116 também foi demonstrado *in vivo*. A administração oral de

própolis demonstrou redução do volume do tumor em ratos, sem apresentar toxicidade (Sulaiman *et al.*, 2012).

Desta forma, estudos de citotoxicidade são necessários, principalmente pela grande diversidade de compostos existentes na própolis das diferentes espécies de abelhas que são capazes de produzi-la. A descoberta de novos medicamentos não consiste apenas no isolamento de compostos bioativos ou fitocomplexos a partir das fontes naturais, são necessários estudos *in vitro* e *in vivo*, que forneçam informações valiosas sobre os diferentes tipos de própolis, suas propriedades biológicas e seus mecanismos de ação.

Tabela 2. Atividade antitumoral de diferentes tipos de própolis e de compostos isolados.

Própolis ou composto isolado da própolis	Linhagem tumoral	Mecanismo de ação
Própolis brasileira Abelha sem ferrão <i>Tetragonisca fiebrigi</i>	- Células de leucemia mielóide crônica humana (K562)	- Apresentou atividade citotóxica contra células K562, com predominância de morte por necrose (Campos <i>et al.</i> , 2015).
Própolis brasileira Abelha sem ferrão <i>Melipona orbignyi</i>	- Células de leucemia mielóide crônica humana (K562)	- Apresentou atividade citotóxica contra células K562, com predominância de morte por necrose (Campos <i>et al.</i> , 2014).
Própolis brasileira Própolis verde- Derivada da resina de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	- Cultura celular de câncer de próstata humano derivada de metástase (DU145 e PC-3) - Linhagem celular primária derivada de câncer de próstata humano imortalizada com telomerase (RC-58T/ h /SA#4), - Células epiteliais primárias de próstata humano (PrEC)	Inibição da proliferação de células de câncer de próstata humano por regulação da expressão proteica de ciclinas D1, B1 e quinase dependente de ciclina (CDK) (envolvidas na regulação do ciclo celular), p21 (reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular) (Li <i>et al.</i> , 2007).

Continuação: Tabela 2.

<p>Própolis verde – Derivada da resina de <i>B. dracunculifolia</i> Bacarina, beturetol, kaempferide, isosakuranetina e drupanina Continuação: Tabela 2.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Células embrionárias de rim humano (HEK293) -Células de câncer colorretal humano (HCT116) 	<ul style="list-style-type: none"> -Inibição da expressão da proteína HIF-1a e dos genes alvo de HIF-1, tais como o transportador de glucose 1, a hexoquinase 2 e o fator de crescimento endotelial vascular A. - Efeitos anti-angiogênicos significativos no ensaio de membrana corioalantoica de pinto (CAM) (Hattori <i>et al.</i>, 2011).
<p>Própolis verde – Derivada da resina de <i>B. dracunculifolia</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ratos Wistar fêmeas 	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição da angiogênese em câncer de bexiga induzido pelo BBN [N-butil (4-hidroxibutil)] em ratos fêmeas Wistar (Ohta <i>et al.</i>, 2011; Dornelas <i>et al.</i>, 2012).
<p>Própolis verde – Derivada da resina de <i>B. dracunculifolia</i> Artepilin C</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Células de tumor maligno da bainha do nervo periférico deficiente em NF1 (S-462) e - Células de schwannoma deficientes em NF2 (HEI-193) -Camundongos atípicos nu/nu (de Charles River ou NCI) 	<ul style="list-style-type: none"> - Bloqueio da sinalização PAK1 oncogênica e suprição do crescimento de tumores NF (Neurofibromatosis) em camundongos (Messerli <i>et al.</i>, 2009).
<p>Própolis verde – Derivada da resina de <i>B. dracunculifolia</i> Artepilin C</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) - Ratos ICR 	<ul style="list-style-type: none"> -Inibição <i>in vitro</i> da formação de tubos e proliferação de células endoteliais. - Redução do número de vasos recém-formados <i>in vivo</i> (Ahn <i>et al.</i>, 2007).
<p>Drupanina, Bacarina e Artepilin C</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Células de leucemia humana (HL-60) - Células de câncer de cólon (SW480) 	<ul style="list-style-type: none"> -Inibição do crescimento das células tumorais. - Indução de morte por apoptose através da promoção de mudanças morfológicas e fragmentação do DNA nucleosomal (artepilin C > bacarina> drupanina) (Akao <i>et al.</i>, 2003).
<p>Artepilin C</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Células de câncer de próstata (LNCaP) 	<ul style="list-style-type: none"> - Induz a morte celular por apoptose. O co-tratamento com TRAIL e Artepilin C induz a ativação de caspase-8 e caspase-3 e interrupção do Potencial de membrana mitocondrial (Szliszka <i>et al.</i>, 2012).
<p>Própolis vermelha – Derivada da resina <i>Dalbergia ecastaphyllum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Células de câncer de pâncreas humano (PANC-1) 	<ul style="list-style-type: none"> - Apresentou atividade citotóxica contra a linhagem tumoral PANC-1 , sendo necrose o principal tipo de morte celular observado (Awale <i>et al.</i>, 2008).
<p>Própolis vermelha – Derivada da resina <i>D. ecastaphyllum</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> -Célula endotelial humana (CE), -Célula de carcinoma renal (RCC4), - Célula tronco e embrionária de ratos machos Wistar (CGR) 	<ul style="list-style-type: none"> - Polifenóis de própolis vermelha exercem atividade antiangiogênica em células x através da inibição da expressão do gene de VEGF, os quais são atribuídos à desestabilização da proteína HIF1a sob condições de hipoxia (Daleprane <i>et al.</i>, 2012).

Continuação: Tabela 2.

Própolis vermelha – Derivada da resina <i>D. ecastaphyllum</i>	- Células de câncer de mama (MCF-7) - Linhagem normal (fibroblastos humanos)	- Redução da viabilidade das células MCF-7 Indução de disfunção mitocondrial. Ativação da atividade de caspase-3 e fragmentação de DNA. Não afetou a viabilidade de fibroblastos (Kamiya <i>et al.</i> , 2012).
Própolis brasileira vermelha e verde	- Células de leucemia (K562), (HL-60), (NB4), (Ramos), (Raji), (Jurkat), (CEM), (Nalm16), (Nalm6), (RS4), (B15), (REH)	- A própolis vermelha apresentou efeito citotóxico <i>in vitro</i> superior à própolis verde em células de leucemia humana. As linhagens K562 e Nalm6 foram mais sensíveis. Estas própolis induziram as células K562 a apoptose (Franchi Jr. <i>et al.</i> , 2012).
Própolis da Tailândia Abelha sem ferrão <i>Trigona laeviceps</i>	- Células de câncer de cólon (SW620), mama (BT474), hepático (Hep-G2), pulmão (Chago) e estômago (Kato-III) - Células normais de fígado (fígado CH) e fibroblastos (HS-27)	- Atividade antiproliferativa contra as cinco linhas celulares de câncer e baixa atividade citotóxica nas linhas celulares normais (Umthong <i>et al.</i> , 2011).
Própolis da Turquia Derivada das resinas de <i>Populus spp.</i> , <i>Eucalyptus spp.</i> , e <i>Castanea sativa</i> .	- Células de câncer de mama (MCF-7)	- Apresentou atividade antitumoral, pela indução das células a apoptose, através da ativação de caspases (Seda <i>et al.</i> , 2010).
Própolis do Iraque - Derivada da resina de <i>Populus nigra</i>	-Células de leucemia humana (HL-60), (HCT-116) (HuFb) -Camundongos atípicos (nude -Fox N1-nu/nu) fêmeas portadores de tumor HCT-116	- Redução da proliferação das células HL-60, as quais foram induzidas a apoptose por regulação negativa da proteína Bcl-2 e regulação positiva da Bax; - Redução da proliferação das células HCT-116 e do potencial de formação de colônias. As células tratadas apresentaram morte por necrose. - Apresentou baixa toxicidade <i>in vivo</i> e houve aumento da expressão de p53 e diminuição de Ki-67 (Sulaiman <i>et al.</i> , 2012).
Própolis do Iran - Derivada da resina de <i>Poplar spp.</i> , <i>Ferula ovina</i>	-Ratos Wistar machos portadores de tumor gástrico	- Atividade antitumoral através da redução de fatores antiapoptóticas (beta-catenina e Bcl-2) e aumento expressão e de fatores proapoptótico (Bax), induzindo a apoptose (Alizadeh <i>et al.</i> , 2015).
Própolis de Portugal - Derivada da resina de <i>Populus nigra</i>	-Células de adenocarcinoma colorretal humano (HCT-15)	- Diminuição da proliferação celular e indução de morte celular (Valençã <i>et al.</i> , 2013).

Continuação: Tabela 2.

Própolis de Portugal - Derivada da resina de <i>Populus nigra</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Cultura primária renal (células normais) -Células de cultura primária de câncer renal - Células de carcinoma renal humanos (A-498) 	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição de quase 100% do crescimento de células tumorais e inibição menor que 25% das células normais (Valente <i>et al.</i>, 2011).
Própolis polonesa Derivada das resinas de <i>Populus nigra</i> , <i>Betula alba</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Aesculus hippocastanum</i> e <i>Fagus sylvatica</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Células de melanoma maligno humano (Me45); -Células de câncer colorectal (HCT 116) 	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição do crescimento celular e redução do tamanho celular das linhagens tumorais testadas. - Estimulação de morte apoptóticas em células de melanoma (Kubina <i>et al.</i>, 2015).
Flavonoides de própolis taiwanesa	<ul style="list-style-type: none"> - Células de câncer de próstata (PC-3) e (DU-145) - Células de hepatoma humano (Hep-3B) 	<ul style="list-style-type: none"> - Atividade citotóxica mais potente contra a linha celular (PC-3) e indução de morte por apoptose (Chen <i>et al.</i>, 2012).
Extrato etanólico de própolis, Crisina e CAPE	<ul style="list-style-type: none"> - Células de astroglia humana (SVGp12) 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução da viabilidade das células SVGp12. Observou-se que as células apresentavam forma condensada e morfologia das mitocôndrias podem indicar a ativação da via intrínseca da apoptose (Markiewicz-Żukowska <i>et al.</i>, 2012.).
CAPE Característico em própolis Europeia	<ul style="list-style-type: none"> - Células de câncer oral humano (TW2.6) 	<ul style="list-style-type: none"> -Supressão da proliferação celular e da formação de colônias; - Diminuição da população de células da fase G1 e aumento da população de células de fase G2 / M; - Indução de morte por apoptose; - Redução na abundância de proteínas de sinalização que regulam o ciclo celular e a atividade de Akt. -Co-tratamento de CAPE com fármaco quimioterapêutico 5-fluorouracil suprime a proliferação de células TW2.6 com mais eficiência (Kuo <i>et al.</i>, 2013).
CAPE Característico em própolis Europeia	<ul style="list-style-type: none"> -Células de câncer de mama humano (MCF-7) 	<ul style="list-style-type: none"> - Indução de morte por apoptose via sinal Fas; - Inibição de NF-κB; -Ativação de fatores proapoptóticos como, Bax e caspases e proteínas da família MAPK p38 e JNK (Watabe <i>et al.</i>, 2004).

Continuação: Tabela 2.

CAPE Característico em própolis Europeia	- Células leucêmicas linfoblastoide (PL104)	-A indução da apoptose através da exposição à fosfatidilserina (PS) e fragmentação do conteúdo de DNA; - Houve parada do ciclo celular na fase sub-G1; e diminuição da expressão de proteínas Bcl-2 e aumento dos níveis de proteínas BAX; Modulação do potencial da membrana mitocondrial. ($\Delta\psi_m$); liberação do citocromo c na mitocôndrias, aumento de ROS intracelular e ativação de caspases (Cavaliere <i>et al.</i> , 2014).
CAPE Característico em própolis Europeia	-Células de glioma (C6)	-Inibição do crescimento de células de glioma C6; Parada do ciclo celular na fase G0/G1 e diminuição do nível de proteína da pRb hiperfosforilada; Regulação positiva dos inibidores de quinase dependentes de ciclina p21, p27 e p16; diminuição do crescimento tumoral em xenoenxertos, redução do número de células mitóticas e proliferação de células nucleares do antígeno nuclear (PCNA)-positivo no glioma C6 (Kuo <i>et al.</i> , 2006).
	-Células de leucemia humana (HL-60)	-Inibição do crescimento de células HL-60; - Indução de morte por apoptose por ativação da caspase-3, fragmentação do DNA e regulação positiva de Bax e negativa de Bcl-2 (Chen <i>et al.</i> , 2001).

Fonte: Adaptado de Silva-Carvalho *et al.* 2015.

2.3. Câncer: Leucemia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) câncer é um termo genérico para englobar um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento e a proliferação anormal e desordenada das células em um organismo. Estas células anormais de rápida proliferação podem invadir zonas adjacentes do organismo e outros tecidos e órgãos formando metástase.

O câncer pode ser desencadeado por diferentes fatores, dentre eles endógenos (fatores genéticos) e exógenos (luz UV, radiação ionizante, vírus, tabaco, produtos químicos, e outros) (Boyle e Lavin, 2008). Também é frequentemente associado ao desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio no

organismo, uma vez que as EROS podem danificar o DNA, e a multiplicação das células danificadas, sem reparo adequado, conduzir ao tumor (Dornas *et al.*, 2007; Cotinguiba *et al.*, 2013).

O câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsável por mais de seis milhões de mortes todos os anos (Guerra *et al.*, 2005; Inca, 2014). Só no Brasil, o número estimado para 2016/2017 é de 596 mil novos casos de câncer incluindo os casos de pele (não melanoma), câncer de próstata, mama, cólon, reto, colo de útero, leucemia entre outros (Inca, 2016).

Os tumores são classificados de acordo com o tipo de célula onde se originam, com o grau de severidade e também conforme as proteínas e genes que expressam. Está nomenclatura comum, é universal e denominada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, muitas vezes é insuficiente para caracterizar os diferentes tipos de câncer, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estádio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas ao tratamento (Vieira *et al.*, 2008).

No Brasil, sem considerar os tumores da pele não melanoma, a leucemia está entre as doze neoplasias mais frequentes em homens e mulheres (Inca, 2016). Este tipo de câncer acomete as células hematopoiéticas afetando a produção dos glóbulos brancos do sangue (Hamerschlak, 2012). As células hematopoiéticas são formadas pela medula óssea presente no interior dos ossos longos, sendo as células mieloides as que dão origem aos eritrócitos (góbulos vermelhos), plaquetas, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e as células linfoides, que dá origem aos linfócitos (Figura 1) (Oliveira, 2015).

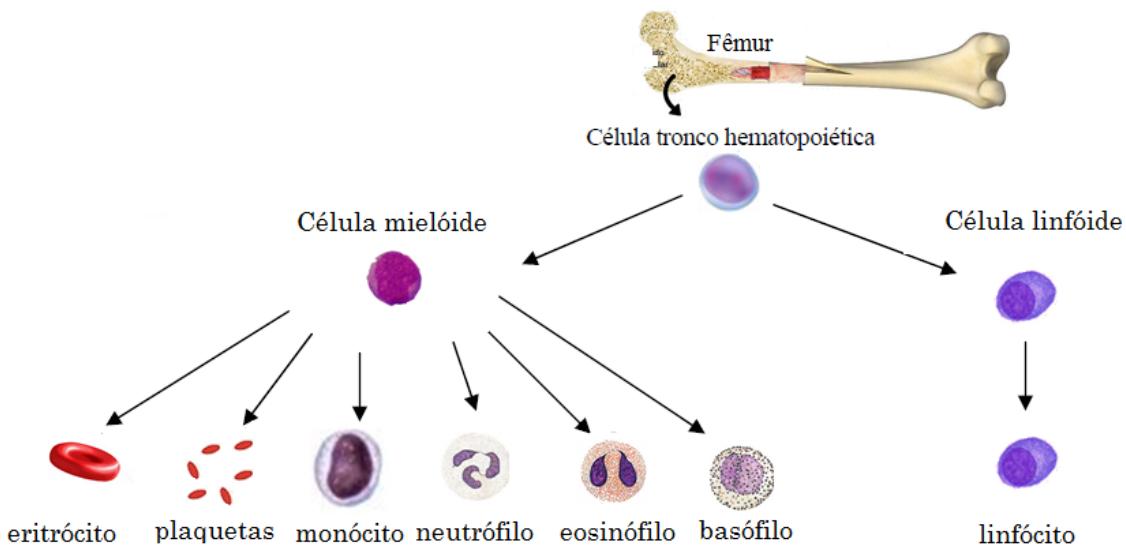


Figura 1. Diferenciação das células hematopoiéticas.

A leucemia pode ser classificada em diferentes tipos de acordo com a linhagem celular de origem e o grau de maturação destas células, sendo subdividida em leucemia mielóide ou linfóide, crônica ou aguda (Silva et al., 2006). A leucemia mielóide tem origem nas células mielóides e a leucemia linfóide é originada nas células linfóides, já a forma aguda caracteriza-se pela proliferação rápida de células imaturas (blastos) no sangue, ao contrário da crônica que progride em um ritmo mais lento (Hamerschlak, 2012).

Desta forma são classificadas quatro tipos de leucemia: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielocítica aguda (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia mielocítica crônica (LMC). A leucemia linfocítica aguda pode ocorrer em adultos, porém representa cerca de 80% das leucemias ocorridas durante a infância (Zanichelli et al., 2010). A leucemia mielocítica aguda ocorre tanto em adultos como em crianças. As formas crônicas de leucemias mielóide e linfóide raramente acometem crianças, sendo frequentes em adultos (Inca, 2017). Entre os tratamentos para essa neoplasia estão a

combinação de diferentes drogas e o transplante de medula óssea (Hamerschlak, 2012).

2.3.1 Quimioterápicos derivados de plantas e morte celular

De maneira geral, dentre os tratamentos mais comumentemente para o câncer estão: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia consiste na remoção do tumor, já a radioterapia é a incidência de feixes raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X a fim de erradicar estas células (Murad e Katz, 1996; Freire e Alves, 2014).

Outra terapia empregada é a quimioterapia que consiste na utilização de agentes químicos com objetivo de destruir as células neoplásicas, sem afetar as células normais, a qual pode ser utilizada em combinação com a cirurgia ou a radioterapia (Freire e Alves, 2014; Inca, 2017). No entanto, os quimioterápicos existentes atualmente no mercado, atuam de maneira não específica, sendo tóxicos tanto em células normais quanto em células tumorais, desencadeando efeitos colaterais como náuseas, diarreia, queda de cabelo, mal-estar, agitação (Murad e Katz, 1996; Inca, 2017). Este quadro torna relevante a busca por novos fármacos que apresentem menores ou nenhum efeito colateral (Costa-Lotufo *et al.*, 2010).

Dentre os quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer, muitos são compostos bioativos derivados de plantas, uma vez que estes vegetais produzem uma grande biodiversidade estrutural de metabolitos secundários (Almeida *et al.*, 2005; Brandão *et al.*, 2010). O isolamento e identificação destes compostos tem permitido a descoberta de novos agentes

antineoplásicos e incentivado pesquisas nesta área (Carvalho *et al.*, 2006; Maciel *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010).

Os agentes antineoplásicos podem ser classificados em dois grupos: 1) aqueles que inibem o processo carcinogênico, sendo alimentos ou ervas utilizados para prevenção desta doença como, por exemplo, o chá verde (*Camellia sinensis*) (Diet, Nutrition, And Cancer, 1982; Lambert *et al.*, 2005), e 2) os agentes supressores como, por exemplo, a vimcristina e a vimblastina que atuam no desenvolvimento da doença, inibindo a proliferação destas células anormais e levando-as a morte celular, processo o qual é perdido nas células tumorais (Carvalho *et al.*, 2006; Brandão *et al.*, 2010).

Compostos vegetais capazes de inibir o crescimento e proliferação das diferentes linhagens tumorais são os mais estudados para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre os antineoplásicos oriundos de espécies vegetais, destaca-se a vincristina e a vimblastina, alcaloides isolados da uma planta *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), e empregados no tratamento de diferentes linhagens tumorais, dentre elas a leucemia linfoblástica aguda infantil (Almeida *et al.*, 2005; Costa-Lotufo *et al.*, 2010; Brandão *et al.*, 2010). Estes alcaloides ligam-se as β -tubulinas, que são heterodímeros formadores dos microtúbulos, impedindo a polimerização dos microtúbulos, resultando no atraso da mitose e consequentemente levando as células tumorais a apoptose (Prakash e Timasheff, 1983; Jordan e Wilson, 2004).

Outro alcaloide com ação antineoplásica é a camptotecina extraída da casca e do caule de *Camptotheca acuminata* Decne (Cornaceae) (Wall *et al.*, 1966). Este alcaloide, diferentemente dos alcaloides de vinca, atua

inibindo a enzima topoisomerase I, que é importante no processo de replicação do DNA (Pommier, 2006). A partir da camptotecina foram gerados os análogos topotecan e irinotecan que possuem menor toxicidade e consequentemente menos efeitos colaterais (Mann, 2002).

A classe dos terpenos também possui ação antineoplásica importante como o paclitaxel, que é extraído da casca da árvore de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (Brandão *et al.*, 2010). A partir do paclitaxel foi originado um derivado, não natural, o docetaxel, com ação antitumoral mais potente. Ambos agem impedindo a estabilização dos microtúbulos (Altmann e Gertsch, 2007).

Além destes compostos antitumorais existem outros compostos derivados de plantas como, por exemplo, os taccalonolides A e E, dicoumarol, ferulenol, podofilotoxina, entre outros que vem sendo estudados como as colchicinas (Altmann e Gertsch, 2007; Brandão *et al.*, 2010). Contudo, esses antineoplásicos, apesar de atuarem por mecanismos de ação diferentes, possuem um objetivo comum que é interromper o ciclo celular das células cancerígenas, uma vez que nestas células este processo está sem controle (Brandão *et al.*, 2010).

A morte celular é um processo importante, o qual pode ocorrer passivamente ou induzida por estímulos internos ou externos, e é através desse processo que ocorre a manutenção das células dos organismos multicelulares (Grivicich *et al.*, 2007). Os mecanismos que levam as células a morte podem apresentar diferenças morfológicas e bioquímicas, por isso a morte celular é classificada em diferentes categorias, dentre elas necrose,

apoptose, apoptose tardia, autofagia e senescência. As falhas nos mecanismos que as coordenam podem resultar em tumorigênese (Hunter *et al.*, 2007).

A necrose ocorre geralmente em resposta a injuria celular, podendo ou não ser um evento controlado (Festjens *et al.*, 2006; Grivicich *et al.*, 2007). Este tipo de morte é caracterizado pelo aumento do volume celular, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana celular, e outros processos como inibição da produção de energia celular, desequilíbrio iônico e ativação de proteases não-apoptóticas que culminam na ruptura celular e liberação do conteúdo intracelular, podendo causar danos às células vizinhas e reações inflamatórias locais (Figura 3a) (Ricci e Zong, 2006; Anazetti e Melo, 2007; Grivicich *et al.*, 2007).

Diferentemente das características morfológicas da necrose, durante a apoptose a célula sofre alterações como consequência de uma cascata de eventos moleculares, geneticamente regulados (Ricci e Zong, 2006). De maneira geral, há um encolhimento celular devido à perda da aderência da matriz extracelular e das células vizinhas, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófagos (Figura 3b). Neste tipo de morte celular, as organelas são mantidas intactas, outra característica importante é a fragmentação do DNA (Ricci e Zong, 2006; Grivicich *et al.*, 2007).

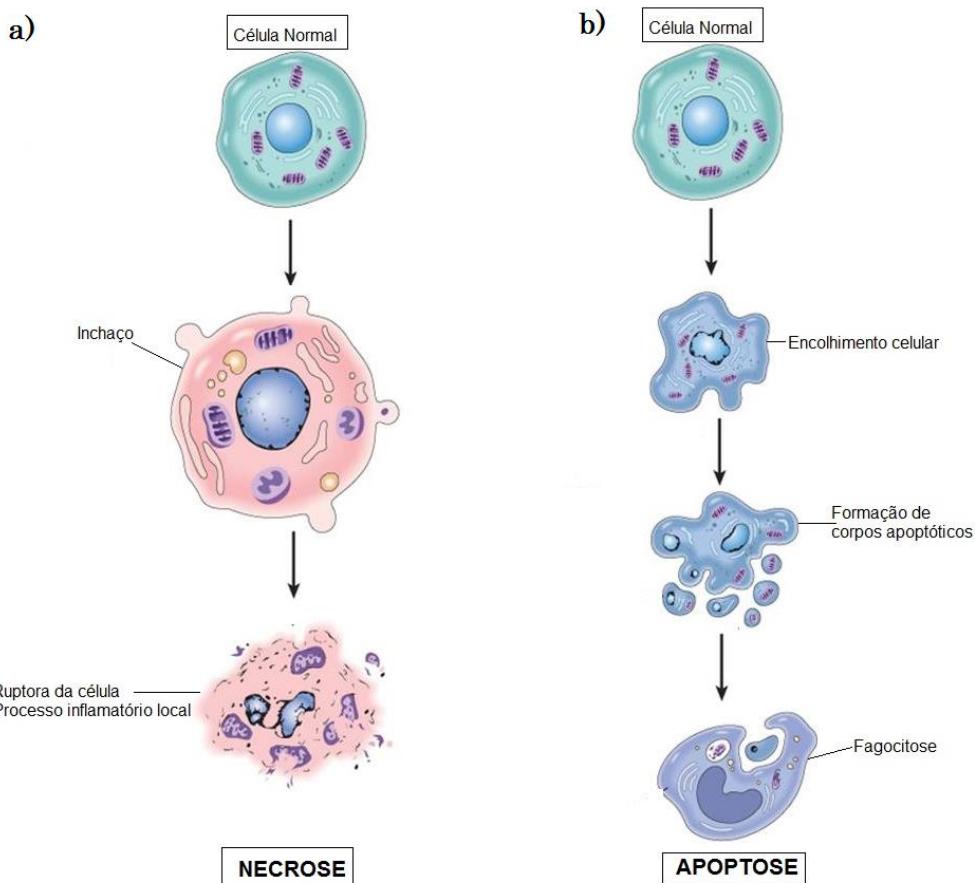


Figura 3. Características morfológicas de morte celular por Necrose (a) e Apoptose (b). Fonte: <http://doktersarap.blogspot.com/2011/10/cellular-injury.html>

A apoptose é importante para manter a homeostase dos tecidos, e pode ser desencadeada por duas vias de sinalização: 1) a via intrínseca ou mitocondrial, a qual é ativada por fatores intracelulares como, danos no DNA, ativação de oncogênese, estresse intracelular, entre outros, e 2) a via extrínseca, iniciada via ativação de receptores de morte presentes na membrana celular (Ricci e Zong, 2006).

Diferentes estudos mostram que drogas antitumorais e novos compostos antineoplásicos são capazes de promover a apoptose em diferentes

linhagens tumorais (Wang *et al.*, 2000; Kimoto *et al.*, 2001; Brandão *et al.*, 2010; Safe *et al.*, 2012). O entendimento desse e de outros mecanismos moleculares capazes de desencadear a morte celular nestas células, bem como suas aplicações são de extrema importância para o tratamento do câncer (Nicholson, 2000; Philchenkov e Balcer-Kubiczek, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a composição química e avaliar o potencial farmacológico das própolis produzidas pelas abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, nativas do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar compostos químicos presentes na própolis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Determinar a atividade antioxidante da própolis através do método de captura dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 3-etylbenzotiazolina-6-sulfónico de 2,2'-azino-bis (ABTS), e do ensaio de inibição da hemólise oxidativa e da peroxidação lipídica induzida pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto (AAPH).
- Avaliar a ação citotóxica das própolis contra células K562 (célula leucêmica humana).
- Avaliar a toxicidade das própolis utilizando o modelo *in vivo* com o nematóide *Caenorhabditis elegans*.

4 Artigo

Artigo publicado na revista Oxidative Medicine and Cellular Longevity (ISSN - 1942-0900)

Fator de impacto da revista: 4.49

Qualis para biodiversidade: A1

Fonte: Piacentini, 2014



(a) Abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* e (b) extrato etanólicos de própolis de *M. q. anthidioides*.

Fonte: Cristiano Menezes *et al.*, 2015.



(a) Abelha *Scaptotrigona depilis* e (b) extrato etanólico de própolis de *S. depilis*.

Research Article

Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*

**Thaliny Bonamigo,¹ Jaqueline Ferreira Campos,¹
Tamaeh Monteiro Alfredo,¹ José Benedito Perrella Balestieri,¹
Claudia Andrea Lima Cardoso,² Edgar Julian Paredes-Gamero,^{3,4}
Kely de Picoli Souza,¹ and Edson Lucas dos Santos¹**

¹School of Environmental and Biological Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

²Course of Chemistry, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil

³Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, SP, Brazil

⁴Interdisciplinary Center of Biochemistry Investigation, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Edson Lucas dos Santos; edsonsantosphd@gmail.com

Received 10 November 2016; Revised 27 January 2017; Accepted 1 February 2017; Published 9 March 2017

Academic Editor: Jasmina Giacometti

Copyright © 2017 Thaliny Bonamigo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Propolis is a natural mixture of compounds produced by various bee species, including stingless bees. This compound has been shown to exhibit antioxidant, antiproliferative, and antitumor activities. The present study aimed to determine the chemical constituents as well as the antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of ethanol extracts of propolis obtained from the stingless bees *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*, which are found in Brazil. Phytosterols, terpenes, phenolic compounds, and tocopherol were identified in the ethanol extracts of propolis (EEPs) in different concentrations. The compounds stigmasterol, taraxasterol, vanilic acid, caffeic acid, quercetin, luteolin, and apigenin were found only in EEP-M. The EEPS were able to scavenge the free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and protected human erythrocytes against lipid peroxidation, with the latter effect being demonstrated by their antihemolytic activity and inhibition of malondialdehyde formation. The EEPS showed cytotoxic activity against erythroleukemic cells and necrosis was the main mechanism of death observed. In addition, the concentrations at which the EEPS were cytotoxic were not toxic against *Caenorhabditis elegans*. In this context, it is concluded that EEP-S and EEP-M show antioxidant and cytotoxic activities and are promising bioactive mixtures for the control of diseases associated with oxidative stress and tumor cell proliferation.

1. Introduction

Stingless bees, also known as meliponini, belong to the tribe Meliponini and are distributed across more than 32 genera [1]. Most species in this group exhibit eusocial habits and are found in tropical and subtropical regions, and 244 species have been described in Brazil [2, 3].

This group of bees plays an important ecological role, contributing to the preservation of plant species through pollination. Moreover, they produce pollen, honey, wax, and propolis, which are used in the hive and are consumed by

humans as nutraceuticals [4–6]. Among these compounds, propolis is obtained through the collection of exudates from different parts of plants and combined with salivary enzymes from bees, resulting in a resinous material that is used to repair cracks and damage to the hive, defend against microorganisms, and mummify the bodies of other insects [7, 8].

Propolis is generally composed of 50% to 60% resins and balsams, 30% to 40% waxes, 5% to 10% essential oils, and 5% pollen grains and micronutrients, with small amounts of vitamins B1, B2, B6, C, and E [9]. The color and chemical composition of this resin vary depending on the plant species

from which bees collect the raw material and the bee species that produces it [8].

Therefore, studies on propolis collected from different geographical regions and bee species are of great importance because these elements affect the chemical composition and, consequently, the biological properties of propolis.

The therapeutic activity of propolis from stingless bees has been widely investigated in recent decades, including descriptions of its antioxidant activity [10–12], antimicrobial activity [5, 13, 14], anti-inflammatory activity [15, 16], and anti-tumor activity [7, 12, 17].

Among bee species, *Scaptotrigona depilis*, popularly known as “mandaguari” and *Melipona quadrifasciata anthidioides*, known as “mandaçaia,” are stingless species found in South American countries including Paraguay, Argentina, and Brazil [1] and their genetic and behavioral characteristics have been well described [18–21]. However, studies on the biological activity of propolis in these species are scarce in the literature, particularly in view of the difficulty in finding colonies in their natural environment, where species are disappearing because of anthropogenic activity.

The pharmacological properties of propolis in these two species were evaluated by Velikova et al. [13], who described the antimicrobial activity of propolis extracts from *M. q. anthidioides*, and by Sawaya [10] who described the antioxidant activity of propolis extracts from *S. depilis*. In this context, the present study aimed to determine the chemical constituents as well as the antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of ethanol extracts of propolis from the stingless bee species *S. depilis* and *M. q. anthidioides* from the state of Mato Grosso do Sul in Midwest Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Research Ethics. No specific permits were required for the described field studies. All field works to collect the propolis samples were conducted on private land and with owner permission. The field studies did not involve endangered or protected species. The protocol to collect of human peripheral blood was approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa; CEP) of the University Center of Grande Dourados (Centro Universitário da Grande Dourados; UNIGRAN), Brazil (CEP process number 123/12). All subjects provided written informed consent for participation.

2.2. Preparation of the Ethanol Extract of Propolis (EEPs). Propolis samples from *S. depilis* (83.81 g) and *M. q. anthidioides* (36.42 g) were collected from the state of Mato Grosso do Sul (22°13'12"S-54°49'2"W), in the Midwest Region of Brazil, with a total of seven collections being performed for each species. The ethanol extract of propolis (EEPs) was prepared using 4.5 mL of 80% ethanol per 1 g of propolis. This mixture was incubated in a water bath at 70°C in a sealed container until total dissolution and subsequently filtered in filter paper qualitative 80 g/m² (Prolab, São Paulo, Brazil) to obtain the EEPs of *S. depilis* (EEP-S) and *M. q. anthidioides* (EEP-M) [22]. After preparation of the extracts, they were kept at a temperature of -20°C until analysis.

2.3. Chemical Analysis

2.3.1. Preparation of the Samples. The samples (1 mg) was fractionated with hexane and water in proportion 1:1 v:v and fraction soluble in hexane was analyzed by GC-MS and fraction in water by HPLC.

2.3.2. GC-MS. Samples were injected and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The GC-MS analysis was performed on a gas chromatograph (GC-2010 Plus Shimadzu Kyoto Japan) equipped with a mass spectrometer detector (GC-MS Ultra 2010) using LM-5 (5% phenyl dimethyl poly siloxane) capillary column (15 m length × 0.2 mm i.d. and 0.2 μm film thickness) with initial oven temperature set at 150°C and heating from 150°C to 280°C at 15°C min⁻¹ and a hold at 280°C for 15 min. The carrier gas was helium (99.99%) supplied at a flow rate of 1.0 mL/min, with split ratio 1:20, 1 μL injection volume. The injector temperature was 280°C and the quadrupole detector temperature was 280°C. The MS scan parameters included an electron-impact ionization voltage of 70 eV mass range of 45–600 m/z and scan interval of 0.3 s. The identifications were completed by comparing the mass spectra obtained in the NIST21 and WILEY229 libraries. In some cases, the compound was confirmed by comparison of standards. Standards of the stigmasterol, β-sitosterol, β-amyrin, α-amyrin, β-amyrin acetate, and tocopherol (Sigma-Aldrich with purity ≥97%) were prepared in the concentration initial of 1000 μg/mL. The concentrations of compounds were determined by extern calibration after dilutions appropriated in the range of 0.1–50 μg/mL. The quantification of taraxasterol was performed in relation to stigmasterol. The procedure was performed in triplicate.

2.3.3. HPLC. The extracts were analyzed in an analytical HPLC (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) system with a diode array detector (DAD) monitored at λ = 200–600 nm. The HPLC column was a C-18 (25 cm × 4.6 mm; particle size, 5 μm; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA), with a small precolumn (2.5 cm × 3 mm) containing the same packing, used to protect the analytical column. In each analysis, the flow rate and the injected volume were set as 1.0 mL min⁻¹ and 20 μL, respectively. All chromatographic analyses were performed at 22°C. Elution was carried out using an binary mobile phase of water with 6% acetic acid and 2 mM sodium acetate (eluent A) and acetonitrile (eluent B). The following applied gradients are as follows: 5% B (0 min), 15% B (30 min), 50% B (35 min), and 100% B (45 min). Standards of the vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, benzoic acid, cinnamic acid, quercetin, luteolin, apigenin, and vanillin (Sigma-Aldrich, ≥97%) were prepared in the concentration initial of 1000 μg/mL. The concentrations of compounds were determined by extern calibration after dilutions appropriated in the range of 0.01–10 μg/mL. The procedure was performed in triplicate.

2.4. Antioxidant Activity

2.4.1. DPPH Free Radical Scavenging Activity. The free radical-scavenger activity was determined by the DPPH

(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay, as described previously by D. Gupta and R. K. Gupta [23] with some modifications. The antiradical activity of extracts was evaluated using a dilution series, in order to obtain a large spectrum of sample concentrations. This involved the mixing of 1.8 mL of DPPH solution (0.11 mM DPPH in 80% ethanol) with 0.2 mL of EEP-S or EEP-M (1–300 µg/mL), followed by homogenization. After 30 min, quantification of the remaining DPPH radicals was recorded by using absorption set at 517 nm. Ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as reference antioxidants. The tests were performed in duplicate in 2 independent experiments. DPPH solution without the tested sample was used as control. The percentage inhibition was calculated from the control with the following equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \right) \times 100. \quad (1)$$

2.4.2. ABTS Free Radical Scavenging Activity. Free radical scavenging capacity for EEP was studied as described by Re et al. [24], through the evaluation of the free radical scavenging effect on 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical. The stock solutions included 7 mM ABTS solution and 140 mM potassium persulfate solution. The ABTS⁺ radical was then prepared by mixing the two stock solutions (5 mL of ABTS solution and 88 µL potassium persulfate solution) and left for 12–16 h at room temperature in the dark. The solution was then diluted by mixing 1 mL ABTS⁺ radical with ethanol absolute to obtain an absorbance of 0.70 nm ± 0.05 units at 734 nm using a spectrophotometer. Then, 20 µL of EEP-S or EEP-M (1–300 µg/mL) was mixed with 1980 µL of the ABTS⁺ radical and the absorbance was taken at 734 nm after 6 min using a spectrophotometer. Ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as positive controls. Three independent experiments were performed in triplicate. The percentage of inhibition of the ABTS radical was calculated according to the following equation, where Abs_{control} is the absorbance of ABTS⁺ radical without the tested sample:

$$\begin{aligned} & \text{\% inhibition of ABTS} \\ &= \left(\frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100. \end{aligned} \quad (2)$$

2.4.3. Antioxidant Assay Using the Human Erythrocyte Model

(1) Preparation of Erythrocyte Suspensions. Following approval by the Research Ethics Committee, 20 mL of peripheral blood was collected from healthy donors into sodium citrate-containing tubes and was subsequently centrifuged at 1500 rpm for 10 min. After centrifugation, the blood plasma and leukocyte layers were discarded, and the erythrocytes were washed 3 times with saline solution and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Finally, 10% erythrocyte suspensions

were prepared in saline solution to obtain 2.5% after the treatment.

(2) Oxidative Hemolysis Inhibition Assay. The protective effect of the propolis extracts was evaluated according to the method described by Campos et al. [12], with minor modifications. The assays were conducted with erythrocyte suspensions. The erythrocytes were preincubated at 37°C for 30 min in the presence of different concentrations of EEP or ascorbic acid (50–125 µg/mL). Then, 50 mM 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) solution was added. A sample of 1% ethanol was used as a negative control. Total hemolysis was induced by incubating erythrocytes with distilled water. Basal hemolysis caused by EEP was assessed by incubating erythrocytes with the extract without the presence of AAPH, and the control was assessed in erythrocytes incubated only with 0.9% NaCl. This mixture was incubated at 37°C for 240 min, with periodical stirring. Hemolysis was determined after every 120, 180, and of 240 minutes of incubation; specifically, sample were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and aliquots of there were transferred to tubes with saline, after which the absorbance of the supernatant was read spectrophotometrically at 540 nm. The percentage hemolysis was measured with the formula $A/B \times 100$, where (A) is the sample absorbance and (B) is the total hemolysis. Five independent experiments were performed in duplicate.

(3) Inhibitory Efficiency against Lipid Peroxidation. A 2.5% erythrocyte suspension was used to assess the protective effects of EEP against lipid peroxidation as described by Campos et al. [12] with some modifications. Erythrocytes were preincubated at 37°C for 30 min with different concentrations of EEPs or ascorbic acid (50–125 µg/mL). A sample of 1% ethanol was used as a negative control. Next, 50 mM AAPH was added to the erythrocyte solution, which was then incubated at 37°C for 4 hours with periodical stirring. At 120, 180, and 240 minutes of incubation, the samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min, and 500 µL aliquots of the supernatant were transferred to tubes with 1 mL of 10 nmol thiobarbituric acid (TBA). As a standard control, 500 µL of 20 mM malondialdehyde (MDA) solution was added to 1 mL of TBA. The samples were incubated at 96°C for 45 min. The samples were then cooled, 4 mL of n-butyl alcohol was added and the samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The absorbance of supernatants sample was read at 532 nm. Three independent experiments were performed in duplicate. MDA levels in the samples were expressed in nmol/mL, obtained with the following formula:

$$\text{MDA} = \text{Abs sample} \times \left(20 \times \frac{220.32}{\text{Abs standard}} \right). \quad (3)$$

2.5. Cytotoxic Activity and Cell Death Profile. K562 erythroleukemia cells line was grown in suspension in RPMI 1640 media (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab), 100 U/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂. The cytotoxic activity and

cell death profile were evaluated according to the method described by Paredes-Gamero et al. [25], with minor modifications. Cells were seeded into 96-well plates (2×10^4 cell/well) and cultured in medium with 10% FBS in the absence or presence of EEP-S or EEP-M (31–500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. As negative controls were used cells were incubated with 0.2% ethanol (highest concentration of ethanol in extract). All effects of the EEPs were compared with negative controls. After this period, the K562 cells were washed with PBS and resuspended in annexin-labeling buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.14 M NaCl, and 2.5 mM CaCl₂). The suspensions were stained with annexin-FITC and propidium iodide (PI) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated at room temperature for 15 min. Three thousand events were collected per sample, and the analyses were performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) with CellQuest software (Becton Dickinson).

2.6. In Vivo Toxicity

2.6.1. Rearing and Maintenance of *Caenorhabditis elegans*. To perform the in vivo toxicity assay, we used the wild-type N2 strain of the nematode *Caenorhabditis elegans*. The specimens were incubated at 20°C in Petri dishes containing nematode growth medium (NGM) agar and fed with *Escherichia coli* strain OP50-1. The nematode culture was synchronized through treatment of pregnant hermaphrodites with 2% sodium hypochlorite and 5 M sodium hydroxide.

2.6.2. Assessment of Toxicity in *C. elegans*. A toxicity assay for the EEPs was performed in *C. elegans* [26] in 96-well plates. Each well contained 10 nematodes at the L4 stage, which were incubated for 24 hours at 20°C with EEP-S and EEP-M at different concentrations (250–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in M9 medium. After this period, nematode viability was evaluated by repeatedly touching the worms with a microspatula. For the manipulation and examination of nematodes, a model Motic SMZ-140 & W10X/23 (British Columbia, Canada) stereomicroscope was used. The data were calculated from two independent experiments in duplicate.

2.7. Statistical Analyses. All data are shown as the mean \pm standard error of mean (SEM) and for statistical significant differences between the groups, using the analysis of variance (ANOVA) and posttest Dunnett, comparing the treatment with the control, using the Prism 6 GraphPad software. The results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical Composition. The compounds identified in EEP-S and EEP-M are shown in Tables 1 and 2. Phytosterols, terpenes, phenolic compounds, and tocopherol were identified in the two extracts in different concentrations. EEP-S presented a higher content of amyrins (triterpenes) and β -sitosterol (phytosterols), whereas EEP-M exhibited a higher concentrations of tocopherol, amyrins, and apigenin (flavonoid). The compounds stigmasterol, taraxasterol, vanillic acid,

caffeic acid, quercetin, luteolin, and apigenin were found only in EEP-M.

3.2. Antioxidant Activity

3.2.1. DPPH and ABTS Free Radical Scavenging Activity. EEP-S and EEP-M were observed to scavenge free radicals in vitro. In both of the evaluated methods, EEP-M showed better antioxidant activity compared with EEP-S. In the DPPH assay, EEP-M showed 50% inhibition of free radicals (IC_{50}) at a concentration of $60.91 \pm 2.01 \mu\text{g}/\text{mL}$. The IC_{50} was not calculated for EEP-S. The maximum activity of EEP-M was achieved at a concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 3).

In the assay with the ABTS radical, IC_{50} values of the EEPs were $80.04 \pm 0.31 \mu\text{g}/\text{mL}$ (EEP-S) and $13.45 \pm 1.81 \mu\text{g}/\text{mL}$ (EEP-M), and they showed maximal activity at concentrations of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The antioxidant activity of EEP-M was similar to that of the synthetic antioxidant BHT (Table 3).

3.2.2. Oxidative Hemolysis Inhibition Assay. The standard antioxidant ascorbic acid and the EEPs showed concentration- and time-dependent antihemolytic activity. EEP-S decreased hemolysis for 120 min, with hemolysis inhibition reaching $63.5 \pm 10.7\%$ at a concentration of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, when compared with the AAPH sample. At the same concentration, ascorbic acid and EEP-M protected erythrocytes against hemolysis induced by the oxidant 2,2'-azobis(2-aminopropane) hydrochloride (AAPH) for up to 240 min, with hemolysis inhibition reaching $56.5 \pm 12.8\%$ and $37.7 \pm 10.4\%$ at 240 min, respectively, compared with erythrocytes treated with AAPH (Figure 1). At the various concentrations tested, the basal hemolysis observed using ascorbic acid and EEPs without the AAPH inducer was similar to the control treatments with saline and ethanol (data not shown).

3.2.3. Efficiency of EEPs in the Inhibition of AAPH-Induced Lipid Peroxidation. The effectiveness of EEPs in inhibiting lipid peroxidation induced by AAPH in human erythrocytes can be determined by measuring malondialdehyde (MDA) levels. Ascorbic acid and EEPs decreased MDA levels in a concentration- and time-dependent manner. EEP-S inhibited lipid peroxidation for 180 min. The ascorbic acid control solution inhibited lipid peroxidation by $65.6 \pm 8.9\%$, whereas EEP-M inhibited peroxidation by $74.4 \pm 6.1\%$ for 240 min at a concentration of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, when compared with the AAPH sample (Figure 2).

3.3. Cytotoxic Activity and Cell Death Profile. The ethanol extracts of propolis showed concentration-dependent cytotoxicity. At the highest concentration tested (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the cell growth of erythroleukemic cells (K562) were $32.6 \pm 3.2\%$ (EEP-S) and $21.2 \pm 4.1\%$ (EEP-M) (Figure 3). At this concentration, after 24 h of treatment, EEP-S promoted death by necrosis in $52.9 \pm 4.1\%$ of cells and death by late apoptosis in $12.1 \pm 0.6\%$ of cells (Figures 4(a) and 4(b)), whereas EEP-M promoted death by necrosis in $57.5 \pm 3.8\%$ of cells and death by late apoptosis in $19.4 \pm 1.6\%$ of cells (Figures 5(a) and 5(b)).

TABLE 1: Compounds identified in unpolar fraction of the EEPs from *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* by GC-MS.

Peak	Retention time (min)	Compounds	Molecular mass	EEP-S (mg/g)	EEP-M (mg/g)
1	17.02	Stigmasterol*	412	—	4.8 ± 0.1
2	17.72	β-Sitosterol*	414	9.6 ± 0.2	5.4 ± 0.2
3	17.93	β-Amyrin*	426	14.3 ± 0.3	11.6 ± 0.3
4	18.09	Taxasterol	426	—	3.0 ± 0.1
5	18.45	α-Amyrin*	426	10.5 ± 0.3	5.0 ± 0.1
6	19.65	β-Amyrin acetate*	468	21.5 ± 0.4	13.7 ± 0.4
7	24.56	Tocopherol*	430	3.6 ± 0.1	15.0 ± 0.5

*Compound was confirmed by comparison of standard.

Data are shown as media ± standard deviation.

TABLE 2: Compounds identified in polar fraction of the EEPs from *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* by HPLC.

Peak	Retention time (min)	Compounds	Molecular mass	EEP-S (mg/g)	EEP-M (mg/g)
1	7.95	Vanilic acid	168	—	5.9 ± 0.1
2	8.64	Caffeic acid	180	—	6.1 ± 0.2
3	10.44	Vanillin	152	5.5 ± 0.2	5.7 ± 0.1
4	13.48	p-Coumaric acid	164	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.2
5	17.28	Ferulic acid	194	5.4 ± 0.2	6.1 ± 0.2
6	19.99	Benzoic acid	122	6.8 ± 0.2	6.9 ± 0.1
7	35.33	Quercetin	302	—	9.9 ± 0.2
8	36.68	Luteolin	286	—	1.3 ± 0.1
9	40.01	Cinnamic acid	148	13.4 ± 0.4	13.2 ± 0.3
10	42.62	Apigenin	270	—	15.6 ± 0.4

*Compound was confirmed by comparison of standard.

Data are shown as media ± standard deviation.

3.4. *Toxicity in C. elegans*. EEP-S and EEP-M were not toxic to the nematodes after 24 h of incubation at any of the concentrations evaluated compared with the control group (Figure 6).

4. Discussion

Propolis is a bee product that is widely used in the cosmetics and food industries and is considered a functional food (nutraceutical) able to prevent diseases when included in food products [5]. The chemical constituents present in propolis are responsible for its therapeutic properties [7, 11, 27], including its antibacterial, antifungal, and antiviral activities [5, 14] as well as its anti-inflammatory and antitumor activities [15, 16, 28, 29].

The major compounds identified in the EEP-S were β-amyrin, β-amyrin acetate, and α-amyrin and in the EEP-M were tocopherol, β-amyrin acetate, and apigenin. Both extracts show similar amounts of β-amyrin, vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, and benzoic acid; however, the EEP-S showed higher content of amyrins than EEP-M. By contrast, EEP-M exhibited approximately four times the amount of tocopherol found in EEP-S and other compounds which were found exclusively on the EEP-M. Despite presenting the same chemical constituents, variations in the concentrations of these compounds may influence the biological activities of the extracts.

The compounds phenolic and flavonoid are correlated with the antioxidant and antitumor activity of propolis [8, 10–12, 30]. Additionally, other compounds identified in the propolis such as caffeic acid, apigenin, and triterpenes are described with important blockers of oncogenic kinase PAK1, well known to be responsible for a variety of diseases such as infectious diseases, Alzheimer's disease, diseases inflammatory, diabetes, hypertension, obesity, and cancer [31].

Phenolic compounds and terpenes have been found in propolis extracts of other species of stingless bees from the same geographical region [12, 29], which may be related to the plant species from which the bees collect raw materials for propolis production.

The terpenes and phenolic compounds found in EEPs have been described as compounds responsible for the antioxidant activities of various plant species [32–34]. Antioxidants are compounds that, when present at low concentrations, retard or prevent the oxidation of substrates and are highly beneficial to health due to protecting cells and macromolecules from oxidizing agents [35].

The most common oxidants in the body include the superoxide (O_2^-), hydroxyl (OH^*), peroxyl (ROO), alkoxy (RO), and hydroperoxyl (HO_2) radicals, which are collectively known as reactive oxygen species (ROS). These free radicals are produced via gradual reduction of molecular oxygen and generate unpaired electrons, which cause oxidative stress when they are out of equilibrium [36].

TABLE 3: IC₅₀ and maximum DPPH and ABTS radical scavenging activity of standard antioxidants, EEP-S and EEP-M.

Sample	DPPH			ABTS		
	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Maximum inhibition %	$\mu\text{g/mL}$	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Maximum inhibition %	$\mu\text{g/mL}$
Ascorbic acid	3.32 ± 0.65	96.75 ± 0.41	50	2.50 ± 0.48	97.37 ± 1.55	10
BHT	22.84 ± 7.87	89.36 ± 2.30	200	20.46 ± 2.78	95.36 ± 1.80	100
EEP-S	ND	14.91 ± 1.73	300	80.04 ± 0.31	73.42 ± 3.47	200
EEP-M	60.91 ± 2.01	97.47 ± 0.03	300	13.45 ± 1.81	99.31 ± 0.12	100

Values are means ± SEM. DPPH ($n = 2$) and ABTS ($n = 3$). ND: not determined.

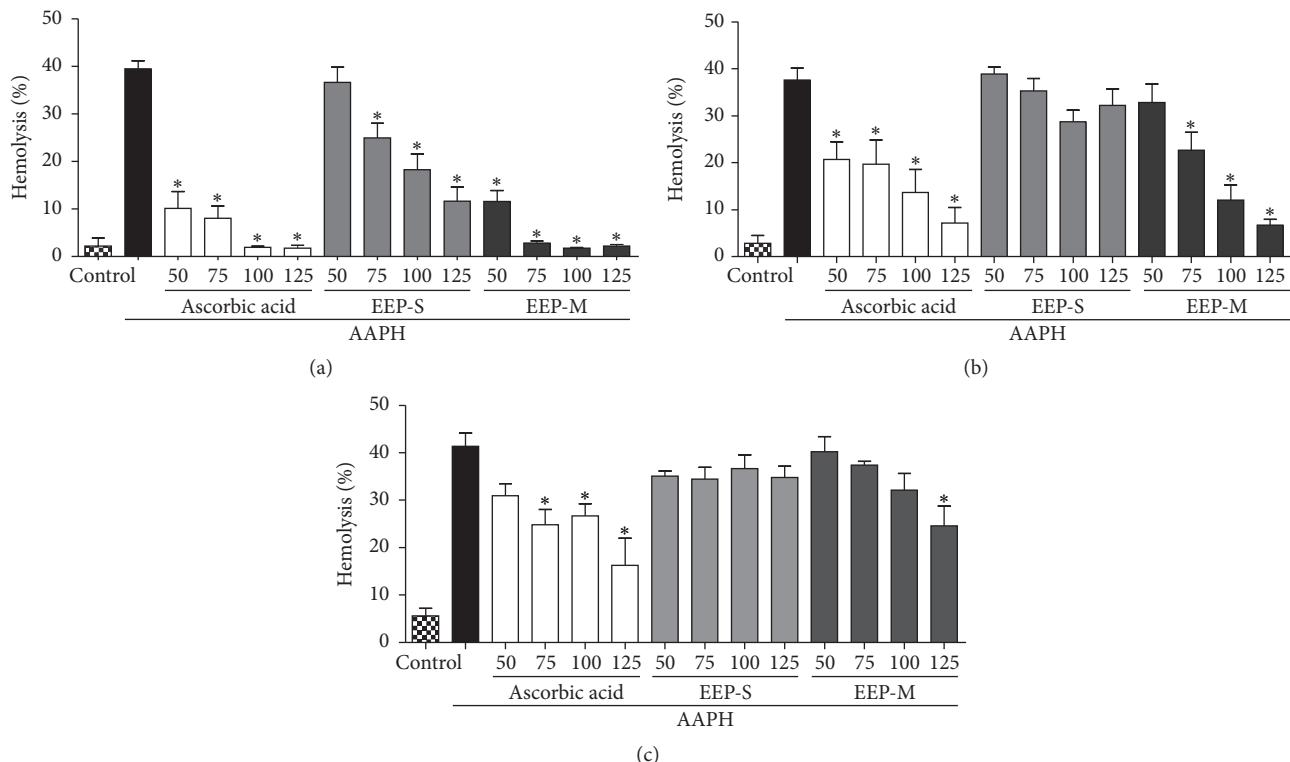


FIGURE 1: Protective effects of ascorbic acid (standard antioxidant) and ethanol extracts of propolis from *S. depilis* and *M. q. anthidioides* against AAPH-induced hemolysis determined using a human erythrocyte suspension at 120 min (a), 180 min (b), and 240 min (c). Ethanol was employed as a negative control. The results are expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean), $n = 5$. *Significantly different ($p < 0.05$) compared with the AAPH group.

Both EEPs stabilized the free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). However, EEP-M showed higher antioxidant activity than EEP-S, which may be related to the different concentrations of tocopherol in the extracts. Some studies have reported the importance of tocopherols as antioxidants [37, 38].

In addition, the amyrins may be associated with the antioxidant activity of the extracts. Tocopherols and these triterpenes are fat-soluble antioxidants that scavenge ROS [34, 39, 40]. These compounds may have been responsible for the increased antioxidant activity of the EEPs observed in the assay with the free radical ABTS, as this method is applied to hydrophilic and lipophilic antioxidant systems [41].

Therefore, the higher solubility of these compounds in the solvent used in this assay produced greater antioxidant activity.

These results corroborate those obtained in the assays involving the inhibition of lipid peroxidation, in which the EEPs presented antihemolytic activity and protective activity against lipid peroxidation when incubated with human erythrocytes in the presence of an oxidizing agent. EEPs may also inhibit the peroxy radical (ROO), which induces peroxidation of lipids and proteins present in human erythrocyte membranes [42].

Oxidative stress leads to lipid peroxidation and, consequently, cell damage due to the oxidation of essential cellular compounds, including lipids, proteins, and nucleic acids. An

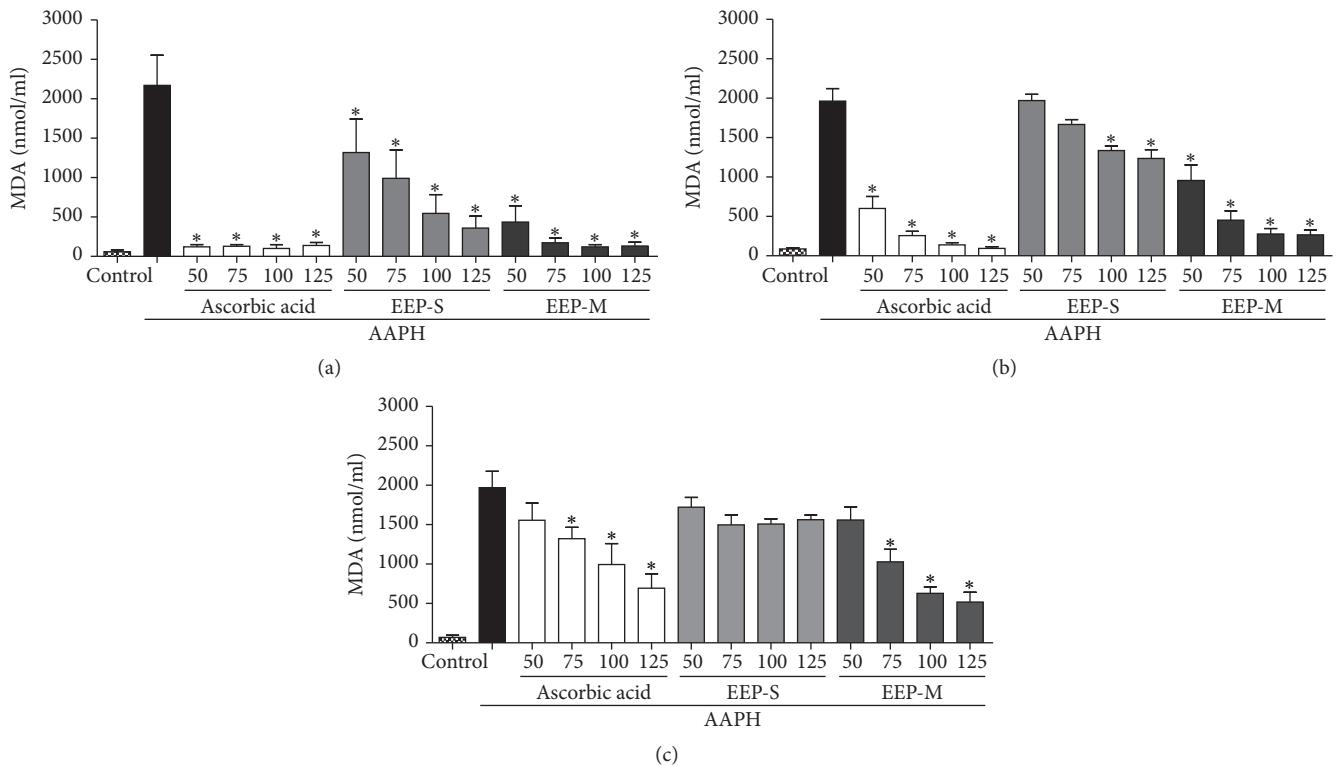


FIGURE 2: Protective effects of ascorbic acid (standard antioxidant) and ethanol extracts of propolis from *S. depilis* and *M. q. anthidioides* against the production of malondialdehyde (MDA)—a byproduct of lipid peroxidation—in a human erythrocyte suspension at 120 min (a), 180 min (b), and 240 min (c). Ethanol was used as a negative control. The results are expressed as the mean \pm SEM (standard error of the mean), $n = 3$. *Significantly different ($p < 0.05$) compared with the AAPH group.

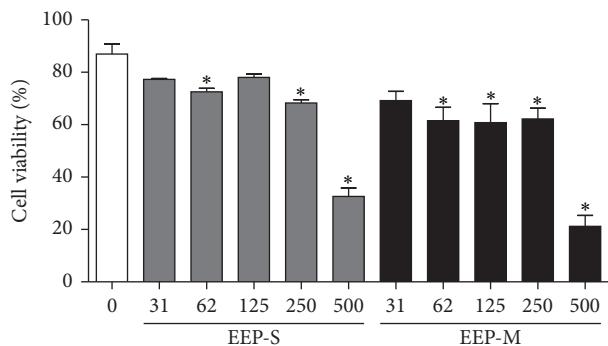


FIGURE 3: Cytotoxic activity of EEPs from *S. depilis* (EEP-S) and *M. q. anthidioides* (EEP-M) against the K562 erythroleukemia cell line. * $p < 0.05$ for the treated group versus control viable cells.

excess of these free radicals can promote cell aging and the development of various diseases, including Alzheimer's, cancer, arthritis, and diabetes, and can increase the risk of cardiovascular disease [36, 43].

Therefore, the evaluated EEPs contain important antioxidant compounds that can limit the spread of oxidative stress-related diseases. The free radicals scavenging and antihemolytic ability demonstrated by the EEP-M were more efficient than results observed for propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* [29] and *Melipona orbignyi* [12] from

Midwest Region of Brazil and some extracts of *Apis mellifera* [44, 45].

In the present study, EEP-S and EEP-M exhibited cytotoxic activity against K562 erythroleukemic cells. In addition, the decrease in cell viability was greater in cells treated with EEP-M than in those treated with EEP-S. However, both EEPs caused necrosis in most of the cells at a concentration of 500 μ g/mL. The cytotoxic effect of propolis was also observed in other cell lines as human lung adenocarcinoma epithelial (A549), human cervical adenocarcinoma (HeLa), and human breast adenocarcinoma (MCF-7) but the mechanisms involved in the death of these tumor cells were apoptosis [46–48]. Therefore, the use of EEP-S and EEP-M may constitute an alternative treatment for chronic myeloid leukemia, as K562 cells are resistant to apoptosis induced by various agents [49].

Some compounds found in EEPs may play an important role in anticancer activity, including tocopherol, which shows antitumor activity in esophageal cancer cells [50] and breast cancer in vitro and in vivo [51]. Furthermore, caffeate derivatives are cytotoxic against human carcinoma cell lines [52].

Other phenolic compounds present in propolis exhibit antiproliferative and cytotoxic effects against various tumor cell lines, including those obtained from renal cell carcinomas [53] and the colon [30], pancreas [54], skin [55], and lungs [56]. Amyrins can be isolated from plants and is known as natural potent anticancer; its compounds induces tumor cell

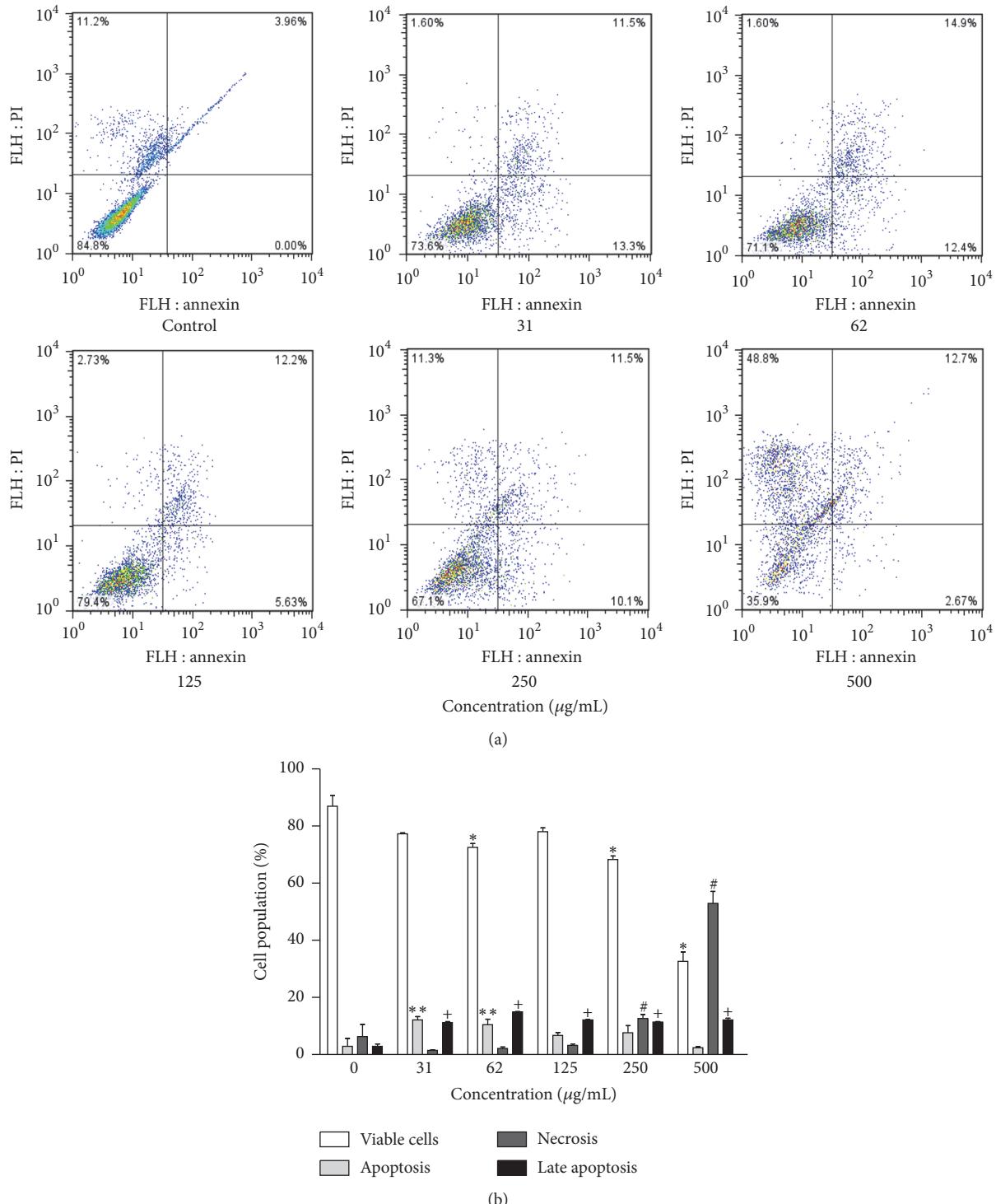


FIGURE 4: Cytotoxic action of EEP from *S. depilis* against the K562 erythroleukemia cell line. (a) Representative diagrams obtained via flow cytometry of cells stained with annexin V-FITC/PI: the lower left quadrant (PI-/An-) represents viable cells; the lower right quadrant (PI-/An+) represents apoptotic cells; the upper left quadrant (PI+/An-) represents cells undergoing necrosis; and the upper right quadrant (PI+/An+) represents cells in late apoptosis. (b) Frequency of cell death, obtained from the corresponding diagrams for the tested concentrations. * $P < 0.05$ for the treated group versus control viable cells. ** $P < 0.05$ for the treated group versus control apoptosis. # $P < 0.05$ for the treated group versus control necrosis. + $P < 0.05$ for the treated group versus control late apoptosis.

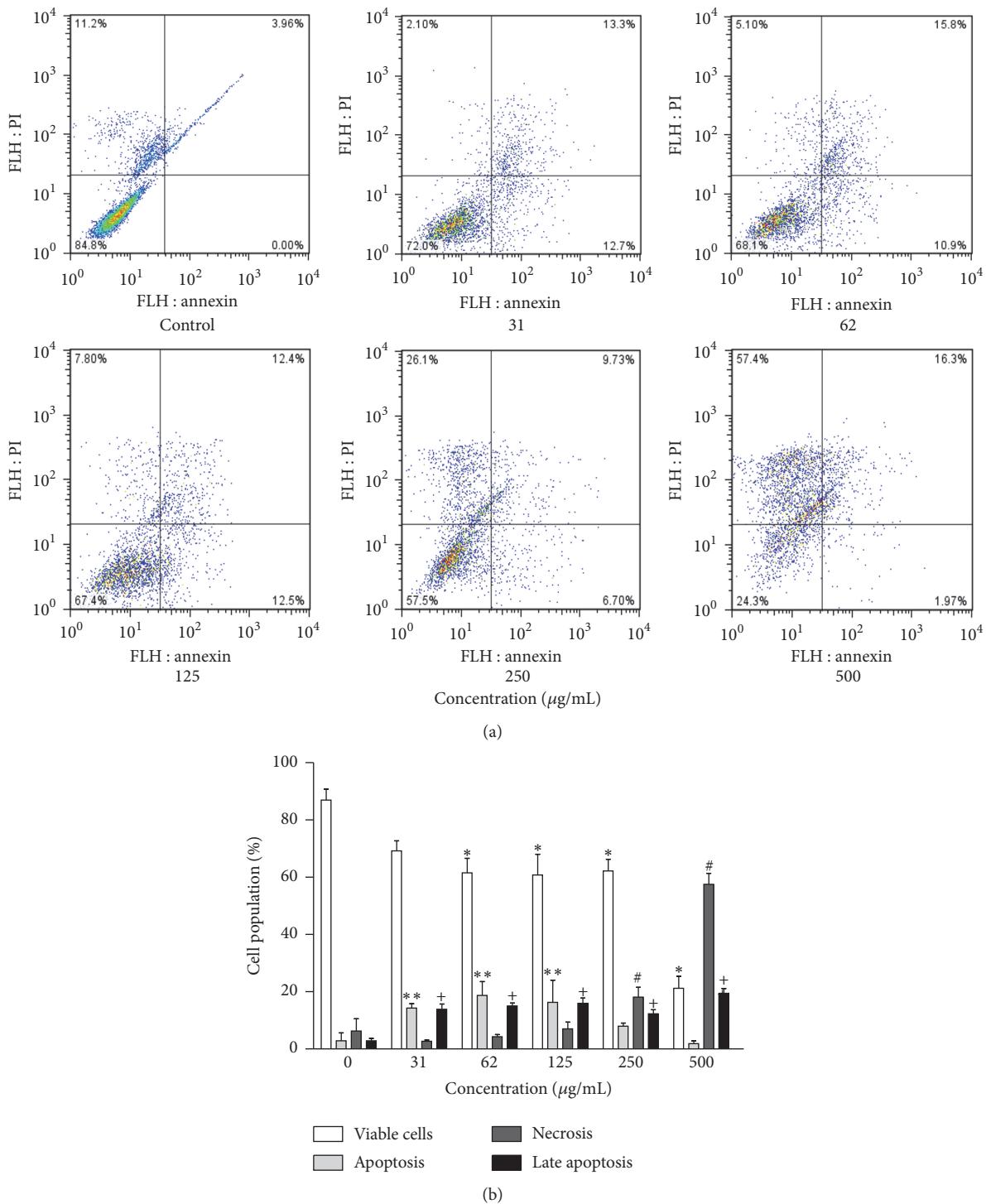


FIGURE 5: Cytotoxic action of EEP from *M. q. anthidioides* against the K562 erythroleukemia cell line. (a) Representative diagrams obtained via flow cytometry of cells stained with annexin V-FITC/PI; the lower left quadrant (PI-/An-) represents viable cells; the lower right quadrant (PI-/An+) represents apoptotic cells; the upper left quadrant (PI+/An-) represents cells in necrosis; and the upper right quadrant (PI+/An+) represents cells in late apoptosis. (b) Frequency of cell death, obtained from the corresponding diagrams for the tested concentrations. * $P < 0.05$ for the treated group versus control viable cells. ** $P < 0.05$ for the treated group versus control apoptosis. # $P < 0.05$ for the treated group versus control necrosis. + $P < 0.05$ for the treated group versus control late apoptosis.

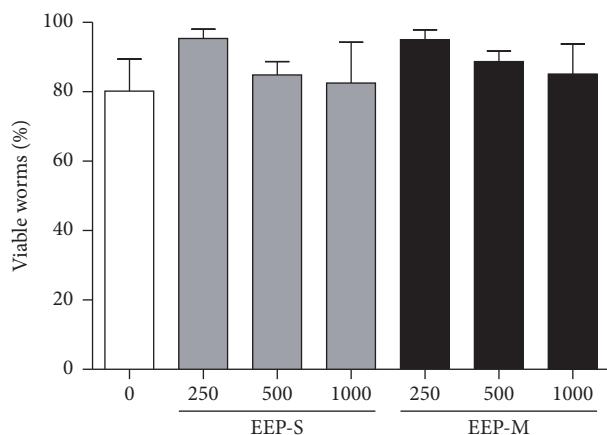


FIGURE 6: Toxicity of EEPs from *S. depilis* EEP-S and *M. q. anthidioides* (EEP-M) against *C. elegans*. * $P < 0.05$ for the treated group versus the control with untreated nematodes.

death as human bladder carcinoma (NTUB1) [34, 57] and leukemia cells (HL-60) [58].

Although the EEPs presented cytotoxic activity against K562 cells, no toxic or lethal effects were observed against the nematode *C. elegans*.

In vivo experimental models serve as a tool to understand effects of natural products in whole organisms. These results suggest that the evaluated propolis samples show specificity against leukemic cells, considering that these nematodes were not affected. This specificity may be important for the treatment of leukemia because drug toxicity and low specificity are among the major difficulties in the treatment of this disease [37].

Corroborating with the toxicity data of the EEPs, recent study showed that the crude extract of propolis presented anticancer effects in human lung cancer cell and is antimalanogenic in the melanoma cell line; additionally it was able to prolong the life of *C. elegans* [48]. In addition, the caffeic acid, the major constituent of propolis, does no present toxic effects and also was able to increase the survival of the nematode *C. elegans* after infection with the fungal pathogen [59]. The ability of propolis or caffeic acid to extend lifespan in *C. elegans* was associated with inactivation of oncogenic kinase PAK1 [48, 59].

Previous studies have shown that *C. elegans* can be used as an experimental model for obtaining rapid results in toxicity studies for pharmacological compounds [60, 61] because it is a multicellular organism with a high reproduction rate and short life cycle, which makes it an excellent in vivo model for complementing cell culture-based systems [61].

Therefore, we conclude that the tested EEPs exhibit antioxidant and cytotoxic activities, attributed to their chemical composition, which includes phytosterols, terpenes, phenolic compounds, and tocopherol, and possibly to the synergy between different compounds present in propolis. Moreover, these EEPs show therapeutic potential for use in the prevention and treatment of diseases associated with oxidative stress and the proliferation of tumor cells.

Abbreviations

AAPH:	2,2'-Azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride
Abs:	Absorbance
An:	Annexin V-FITC
BHT:	Butylhydroxytoluene
DAD:	Diode array detector
DPPH:	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
CG-MS:	Gas chromatography-mass spectrometry
HPLC:	High performance liquid chromatography
EEPs:	Ethanol extract of propolis
EEP-S:	Ethanol extract of propolis of <i>Scaptotrigona depilis</i>
EEP-M:	Ethanol extract of propolis of <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>
MDA:	Malondialdehyde
NaCl:	Sodium chloride
PI:	Propidium iodide
SEM:	Standard error of the mean
TBA:	Thiobarbituric acid.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank Marcelo Mori, Ph.D., for intellectual assistance. This work was supported by grants from Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Edson Lucas dos Santos, Cláudia Andréa Lima Cardoso, and Edgar J. Paredes-Gamero were recipient of fellowship from CNPq, Brazil.

References

- [1] J. M. F. Camargo and S. R. M. Pedro, "Meliponini Lepeletier," in *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apidae) in the Neotropical Region*, J. S. Moure, D. Urban, and G. A. R. Melo, Eds., 2016, <http://www.moure.cria.org.br/catalogue/contente/10/10/16>.
- [2] M. Cortopassi-Laurino, V. L. Imperatriz-Fonseca, D. W. Roubik et al., "Global meliponiculture: challenges and opportunities," *Apidologie*, vol. 37, no. 2, pp. 275–292, 2006.
- [3] S. R. M. Pedro, "The stingless bee fauna in Brazil (hymenoptera: apidae)," *Sociobiology*, vol. 61, no. 4, pp. 348–354, 2014.
- [4] D. W. Roubik, *Ecology and Natural History of Tropical Bees*, Cambridge University Press, New York, NY, USA, 1989.
- [5] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Álvarez, "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly," *Journal of Food Science*, vol. 73, no. 9, pp. R117–R124, 2008.
- [6] A. Ajibola, J. P. Chamunorwa, and K. H. Erlwanger, "Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth," *Nutrition and Metabolism*, vol. 9, article 61, 2012.
- [7] S. Castaldo and F. Capasso, "Propolis, an old remedy used in modern medicine," *Fitoterapia*, vol. 73, no. 1, pp. S1–S6, 2002.

- [8] V. Bankova, M. Popova, and B. Trusheva, "Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review," *Chemistry Central Journal*, vol. 8, article 28, pp. 1–8, 2014.
- [9] Y. K. Park, S. M. Alencar, and C. L. Aguiar, "Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 9, pp. 2502–2506, 2002.
- [10] A. C. H. F. Sawaya, "Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees," *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, vol. 1, no. 2, pp. 37–42, 2009.
- [11] N. S. S. Guimarães, J. C. Mello, J. S. Paiva et al., "Baccharis dracunculifolia, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 3–4, pp. 1091–1097, 2012.
- [12] J. F. Campos, U. P. dos Santos, L. F. B. Macorini et al., "Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 65, pp. 374–380, 2014.
- [13] M. Velikova, V. Bankova, I. Tsvetkova, A. Kujumgiev, and M. C. Marcucci, "Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees," *Fitoterapia*, vol. 71, no. 6, pp. 693–696, 2000.
- [14] L. Barrientos, C. L. Herrera, G. Montenegro et al., "Chemical and botanical characterization of chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 577–585, 2013.
- [15] M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić et al., "Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 3, pp. 772–778, 2011.
- [16] R. Lima Cavendish, J. De Souza Santos, R. Belo Neto et al., "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 173, pp. 127–133, 2015.
- [17] K. S. Borges, M. S. Brassesco, C. A. Scrideli, A. E. E. Soares, and L. G. Tone, "Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines," *Genetics and Molecular Biology*, vol. 34, no. 2, pp. 310–314, 2011.
- [18] H. V. van Tomé, G. F. Martins, M. A. P. Lima, L. A. O. Campos, and R. N. C. Guedes, "Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *melipona quadrifasciata anthidioides*," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 6, Article ID e38406, 2012.
- [19] L. B. de Faria, K. P. Aleixo, C. A. Garófalo, V. L. Imperatriz-Fonseca, and C. I. da Silva, "Foraging of *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae) in an urbanized area: seasonality in resource availability and visited plants," *Psyche*, vol. 2012, Article ID 630628, 12 pages, 2012.
- [20] M. H. Kärcher, C. Menezes, D. A. Alves, O. S. Beveridge, V.-L. Imperatriz-Fonseca, and F. L. W. Ratnieks, "Factors influencing survival duration and choice of virgin queens in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*," *Naturwissenschaften*, vol. 100, no. 6, pp. 571–580, 2013.
- [21] G. Figueiredo-Mecca, L. R. Bego, and F. S. Nascimento, "Foraging behavior of scaptotrigona depilis (hymenoptera, apidae, meliponini) and its relationship with temporal and abiotic factors," *Sociobiology*, vol. 60, no. 3, pp. 277–282, 2013.
- [22] S. M. Alencar, T. L. C. Oldoni, M. L. Castro et al., "Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 113, no. 2, pp. 278–283, 2007.
- [23] D. Gupta and R. K. Gupta, "Bioprotective properties of Dragon's blood resin: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, no. 13, pp. 1–9, 2011.
- [24] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, 1999.
- [25] E. J. Paredes-Gamero, M. N. C. Martins, F. A. M. Cappabianco, J. S. Ide, and A. Miranda, "Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: Regulated cell death or membrane disruption," *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1820, no. 7, pp. 1062–1072, 2012.
- [26] J. A. Lewis and J. T. Fleming, "Basic culture methods," in *Caenorhabditis Elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*, H. F. Epstein and D. C. Shakes, Eds., pp. 3–29, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1995.
- [27] V. D. Wagh, "Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials," *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2013, Article ID 308249, 11 pages, 2013.
- [28] N. Paulino, S. R. Abreu, Y. Uto et al., "Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis," *European Journal of Pharmacology*, vol. 587, no. 1–3, pp. 296–301, 2008.
- [29] J. F. Campos, U. P. Santos, P. S. da Rocha et al., "Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, Article ID 296186, 11 pages, 2015.
- [30] A. H. Banskota, T. Nagaoka, L. Y. Sumioka et al., "Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 80, no. 1, pp. 67–73, 2002.
- [31] H. Maruta, "Herbal therapeutics that block the oncogenic kinase PAK1: a practical approach towards PAK1-dependent diseases and longevity," *Phytotherapy Research*, vol. 28, no. 5, pp. 656–672, 2014.
- [32] A. A. Azlim Almey, C. Ahmed Jalal Khan, I. Syed Zahir, K. Mustapha Suleiman, M. R. Aisyah, and K. Kamalul Rahim, "Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants' leaves," *International Food Research Journal*, vol. 17, no. 4, pp. 1077–1084, 2010.
- [33] A. S. Awaad and N. A. Al-Jaber, "Antioxidant natural plant," in *Ethnomedicine: Source & Mechanism I*, vol. 27, pp. 1–35, RPMP, 2015.
- [34] L. H. Vázquez, J. Palazon, and A. Navarro-Ocaña, "The pentacyclic triterpenes α , β -amyrins: a review of sources and biological activities," in *Phytochemicals—A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, p. 538, InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- [35] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Lölicher, and O. I. Aruoma, "The characterization of antioxidants," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 33, no. 7, pp. 601–617, 1995.
- [36] A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada, and G. Swierczek-Zieba, "Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis," *Molecules*, vol. 19, no. 1, pp. 78–101, 2014.
- [37] M. L. De Mesquita, R. M. Araújo, D. P. Bezerra et al., "Cytotoxicity of δ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer

- cell lines," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 1, pp. 623–630, 2011.
- [38] P. X. Chen, Y. Tang, M. F. Marcone et al., "Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Food Chemistry*, vol. 185, pp. 298–308, 2015.
- [39] R. Amarowicz and R. B. Pegg, "Legumes as a source of natural antioxidants," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 110, no. 10, pp. 865–878, 2008.
- [40] Z. Wang, A. M. Joshi, K. Ohnaka et al., "Dietary intakes of retinol, carotenes, vitamin C, and vitamin E and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study," *Nutrition and Cancer*, vol. 64, no. 6, pp. 798–805, 2012.
- [41] A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 24, no. 7, pp. 1043–1048, 2011.
- [42] C. G. Zou, N. S. Agar, and G. L. Jones, "Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture," *Life Sciences*, vol. 69, no. 1, pp. 75–86, 2001.
- [43] M. M. Silva, M. R. Santos, G. Caroço, R. Rocha, G. Justino, and L. Mira, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination," *Free Radical Research*, vol. 36, no. 11, pp. 1219–1227, 2002.
- [44] H. Shi, H. Yang, X. Zhang, and L. Yu, "Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 50, pp. 12403–12410, 2012.
- [45] N. Mercan, I. Kivrak, M. E. Duru et al., "Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey," *Annals of Microbiology*, vol. 56, no. 4, pp. 373–378, 2006.
- [46] S. Khacha-Ananda, K. Tragoopua, P. Chantawannakul, and Y. Tragoopua, "Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways," *Investigational New Drugs*, vol. 34, no. 6, pp. 707–722, 2016.
- [47] M. Tartik, E. Darendelioglu, G. Aykutoglu, and G. Baydas, "Turkish propolis suppresses MCF-7 cell death induced by homocysteine," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 82, pp. 704–712, 2016.
- [48] N. Taira, B. C. Q. Nguyen, P. T. Be Tu, and S. Tawata, "Effect of Okinawa propolis on PAK1 activity, *Caenorhabditis elegans* longevity, melanogenesis, and growth of cancer cells," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 27, pp. 5484–5489, 2016.
- [49] C.-D. Kang, S.-D. Yoo, B.-W. Hwang et al., "The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells," *Leukemia Research*, vol. 24, no. 6, pp. 527–534, 2000.
- [50] S. Lim, J. Y. Lee, W. H. Jung et al., "Anticancer effects of astaxanthin and α -tocopherol in esophageal cancer cell lines," *The Korean Journal of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research*, vol. 11, no. 3, pp. 170–175, 2011.
- [51] W. Yu, L. Jia, S.-K. Park et al., "Anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms: RRR- α -tocopherol blocks the anticancer actions of γ -tocopherol," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 53, no. 12, pp. 1573–1581, 2009.
- [52] Y.-C. Chen, Y.-H. Kuo, N.-C. Yang, C.-W. Liu, W.-T. Chang, and C.-L. Hsu, "Cytotoxic and apoptotic effects of caffeate derivatives on A549 human lung carcinoma cells," *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 77, no. 10, pp. 535–543, 2014.
- [53] M. J. Valente, A. F. Baltazar, R. Henrique, L. Estevinho, and M. Carvalho, "Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 1, pp. 86–92, 2011.
- [54] F. Li, S. Awale, Y. Tezuka, H. Esumi, and S. Kadota, "Study on the constituents of mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells," *Journal of Natural Products*, vol. 73, no. 4, pp. 623–627, 2010.
- [55] C. Chen, M. Weng, C. Wu, and J. Lin, "Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 1, no. 2, pp. 175–185, 2004.
- [56] F. Li, S. Awale, Y. Tezuka, and S. Kadota, "Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 10, pp. 5434–5440, 2008.
- [57] K.-W. Lin, A.-M. Huang, H.-Y. Tu et al., "Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human ntb1 cells through a ROS-dependent mechanism," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 1, pp. 407–414, 2011.
- [58] F. W. A. Barros, P. N. Bandeira, D. J. B. Lima et al., "Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 3, pp. 1268–1276, 2011.
- [59] J. J. Coleman, T. Komura, J. Munro et al., "The immunomodulatory activity of caffeic acid phenethyl ester in *Caenorhabditis elegans* is mediated by the CED-10 (Rac-1)/PAK1 pathway," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 17, pp. 2033–2046, 2016.
- [60] M. Dengg and J. C. A. van Meel, "*Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 50, no. 3, pp. 209–214, 2004.
- [61] M. C. K. Leung, P. L. Williams, A. Benedetto et al., "*Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology," *Toxicological Sciences*, vol. 106, no. 1, pp. 5–28, 2008.

5 CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que os EEPs apresentam atividades antioxidante e citotóxica as quais são atribuídas à composição química, incluindo compostos fenólicos, ácidos, flavonoides, terpenos e/ou ao sinergismo entre os diferentes compostos presentes nestas própolis. Assim, os EEPs de *S. depilis* e *M. q. anthidioides* apresentam potencial terapêutico na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e da proliferação de células tumorais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA, Ang BS (2014). Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014: 1-11.
- Alizadeh AM, Afrouzan H, Dinparast-Djadid N, Sawaya AC, Azizian S, Hemmati HR, Mohagheghi MA, Erfani S (2015). Chemoprotection of MNNG-initiated gastric cancer in rats using Iranian propolis. Archives of Iranian Medicine, 18 (1): 18–23.
- Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Nakayama T (2007). Suppression of tumorinduced angiogenesis by Brazilian propolis: major componente artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. Cancer Letters, 252 (2): 235–243.
- Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Smishima S, Nozawa Y (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26 (7): 1057–1059.
- Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Cakiroglu TN, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. Acta Biologica Hungarica, 62 (4): 388–396.
- Anazetti MC, Melo OS (2007). Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. Metrocamp Pesquisa, 1 (1): 37-58.
- Anoop A, Singh PK, Jacob RS, Maji SK (2010). CSF Biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. International Journal of Alzheimer's Disease, 2010: 1-12.

Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annual Review of Plant Biology, 55: 373–399.

Araújo KSS, Júnior JSF, Sato MO, Finco FDBA, Soares IM, Barbosa RS, Alvim TC, Ascêncio SD, Mariano SMB (2016). Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amazônica*, 46 (1): 61 – 68.

Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S (2008). Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 16 (1): 181–189.

Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova*, 28 (1): 118-129.

Altmann KH, Gertsch J (2007). Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Natural Product Reports*, 24: 327–357.

Ballivián JMPP (ORG.) (2008). Abelhas Nativas sem ferrão. Terra indígena Guarita, Ed. Oiko – RS.

Bankova V, de Castro SL, Marcucci MC (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.

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

Bankova V, Popova M, Trusheva B (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: A Review. *Chemistry Central Journal*, 8 (28): 1-8.

Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23 (4): 629-643.

Bolfa P, Vidrighinescu R, Petruta A, Dezmirean D, Stan L, Vlase L, Damian G, Catoi C, Filip A, Clichici S (2013). Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food and Chemical Toxicology*, 62: 329–342.

Bonamigo T, Campos JF, Alfredo TM, Balestieri JBP, Cardoso CAL, Paredes-Gamero EJ, Souza KP, dos Santos EL (2017). Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017: 1-12.

Boonstra J, Post JA (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 337:1 –13.

Borawska MH, Naliwajko SK, Moskwa J, Markiewicz-Żukowska R, Puścion-Jakubik A, Soroczyńska J (2016). Anti-proliferative and anti-migration effects of Polish propolis combined with *Hypericum perforatum* L. on glioblastoma multiforme cell line U87M. *Complementary and Alternative Medicine*, 16 (367): 2-9.

Borges KS, Brassesco MS, Scridel CA, Soares AEE, Tone LG (2011). Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 34 (2): 310-314.

Boyle P, Lavin B (2008). World cancer report. IARC Nonserial Publication.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie, 28: 25-30.

Brandão HN (2010). Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Química Nova, 33 (6): 1359-1369.

Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology, 36: 347-363.

Calor AR (2009). Insecta. Museu de Zoologia Virtual, Universidade Federal da Bahia. Disponível em: <http://www.mzufba.ufba.br/insetos.html>. Acesso em: 24 mar. 2017.

Camargo JMF, Pedro SRM (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure JS, Urban D, Melo GAR (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apidae) in the Neotropical Region – versão online. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 28 jan. 2017.

Campos JF, Santos UP, Benitez LF, Macorini LFB, Felipe de Melo AMM, Balestieri JBP, Paredes-Gamero EJ, Cardoso CAL, Souza KP, Santos EL (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). Food and Chemistry Toxicology, 65: 374–380.

Campos JF, Santos UP, da Rocha PS, Damião MJ, Balestieri JBP, Cardoso C AL, Paredes-Gamero EJ, Estevinho LM, Souza KP, Santos EL (2015). Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015: 1-11.

Castaldo S, Capasso F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73 (1): S1-S6.

Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S, Koo H (2007). Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, 30 (7):1512-1516.

Carvalho JE (2006). Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. *Multiciência*, 1-18.

Cavaliere V, Papademetrio DL, Lombardo T, Costantino SN, Blanco GA, Alvarez EMC (2014). Caffeic acid phenylethyl ester and MG132, two novel nonconventional chemotherapeutic agents, induce apoptosis of human leukemic cells by disrupting mitochondrial function. *Targeted Oncology*, 9 (1): 25–42.

Chang WC, Hsieh CH, Hsiao MW, Lin WC, Hung YC, Ye JC (2010). Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan Journal of Obstetrics Gynecology*, 49(4): 419-424.

Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, Tsai TH, Wang SY (2001). Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11): 5615–5619.

Chen MF, Wu CT, Chen YJ, Keng PC, Chen WC (2004). Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *Journal of Radiation Research*, 45 (2): 253-260.

Chen MJ, Chang WH, Lin CC, Liu CY, Wang TE, Chu CH, Shih SC, Chen YJ (2008). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology*, 8 (6): 566-576.

Chen CN, Hsiao CJ, Lee SS, Guh JH, Chiang PC, Huang CC, Huang WJ (2012). Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. *Natural Product Research*, 26 (2): 116–124.

Choudharia MK, Punekara SA, Ranadeb RV, Paknikara KM (2012). Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 363– 367.

Circu LM, Aw TY (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 48 (6), 749–762.

Cotinguiba GG, Silva JR do N, de Sá Azevedoa RR, Rocha TJM, dos Santos A. F (2013). Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. *Journal of Health Sciences*, 15 (3): 231-237.

Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MOA (2010). Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Universidade Federal do Ceará. *Revista: Virtual Química*, 2 (1):47-58.

Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, Dollin A, Heard T, Aguilar I, Venturieri GC, Eardley C, Nogueira-Neto P (2006). Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37 (2): 275-292.

Daleprane JB, Schmid T, Dehne N, Rudnicki M, Menrad H, Geis T, Ikegaki M, Ong TP, Brüne B, Abdalla DS (2012). Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. *Journal of Nutrition*, 142 (3): 441–447.

Daugsch A, Moraes CS, Fort P, Pacheco E, Lima IB, Abreu JÁ, Park YK (2006). Própolis vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce*, 89, disponível em:

<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>. Acesso em: 09 mar. 2016.

Diet, Nutrition, and Cancer. National academy press Washington, D. C . 1982. 496p. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK216644/pdf/Bookshelf_NBK216644.pdf Acesso em: 23 jan. 2017.

Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues das Dores RG, Santos AF, Nagem TJ (2007). Flávonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 28 (3): 241-249.

Dornelas CA, Fechine-Jamacaru FV, Albuquerque IL, Magalhães HIF, Dias TA, Faria MHG, Alves MKS, Rabenhorst SHB, Carvalho de Almeida PR, de Lemos TLG, de Castro JDV, Moraes MEA, Moraes MO (2012). Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. Acta Cirurgica Brasileira, 27 (8): 529–536.

Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews, 82: 47–95.

Dueñas-García IE, Heres-Pulido ME, Arellano-Llamas MR, Cruz-Núñez JI, Cisneros-Carrillo V, Palacios-López CS, Acosta-Anaya L, Santos-Cruz LF, Castañeda-Partida L, Durán-Díaz A (2017). Lycopene, resveratrol, vitamin C and FeSO₄ increase damage produced by pro-oxidant carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in *Drosophila melanogaster*: Xenobiotic metabolism implications. Food and Chemical Toxicology. Food Chemical and Toxicology, 2-48.

Dziedzic A, Kubina R, Kabała-dzik A, Tanasiewicz M (2017). Induction of cell cycle arrest and apoptotic response of head and neck squamous carcinoma cells (detroit 52) by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester derivative. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017: 1-10.

Duthie GG, Gardner PT, Kyle JAM (2003). Plant polyphenols: are they the newmagic bullet? Proceedings of the Nutrition Society, 62 (3): 599–603.

El-Hady AKA, El Awdan SA, Ibrahim AM (2013). Anti-Ulcerative Potential of Egyptian propolis against oxidative gastric injury induced by indomethacin in rats. Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Researches, 3 (2): 35-42.

Fabris SM, Bertelle O, Astafyeva O, Gregoris E, Zangrando R, Gambaro A, Lima GPP, Stevanato R (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis, Pharmacology & Pharmacy, 4 (1): 46–51.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics, 1757 (9-10): 1371–1387.

Ferreira MG, Manente-Balestieri FCD, Balestieri JBP (2010). Pólen coletado por *Scaptotrigona depilis* (Moure) (Hymenoptera, Meliponini), na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de entomologia, 54 (2): 258-262.

Ferreira ALA, Matsubara LS (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira, 43 (1): 61-68.

Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T (2008). Imunomodulação pela própolis. Arquivos do Instituto Biológico, 75 (2): 247-253.

Fokt H, Pereira A, Ferreira AM, Cunha A, Aguiar C (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology, 481-493.

Franchi Jr. GC, Moraes CS, Toreti VC, Daugsch A, Nowill AE, Park YK (2012). Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012: 1-6.

Freire LHM, dos S, Alves F (2014). Ação de extratos naturais sobre o câncer natural extracts of action on cancer. Periódico científico do núcleo de biociências, 4 (8): 7-14.

Funari CS, Ferro VO (2006). Análise de Própolis. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26 (1): 171-178.

Geier DA, Kern JK, Garver CR, Adamse JB, Audhyaf T, Natafg R, Geieret MR (2009). Biomarkers of environmental toxicity and susceptibility in autism. Journal of the Neurological Sciences, 280: 101–108.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007). Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia, 53 (3): 335-343.

Guerra MR, Moura Gallo CV, Mendonça GAS (2005). Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. Revista Brasileira de Cancerologia, 51 (3): 227-234.

Halliwell B (2005). Free Radicals and other reactive species in Disease. Encyclopedia of life sciences, 1-7.

Hamerschlak N (2012). As leucemias no Brasil. Onco& - hematologia, 20-23.

Hattori H, Okuda K, Murase T, Shigetsura Y, Narise K, Semenza GL, Nagasawa H (2011). Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 19 (18): 5392–5401.

Havermann S, Chovolou Y, Humpf HU, Wätjen W (2014). Caffeic acid phenethyl ester increases stress resistance and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulation of the insulin-like daf-16 signalling pathway. Plos One, 9 (6): 1-11.

Hosnute M, Gurel A, Babuccu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. Burns, 30 (2): 121–125.

Huang S, Zang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. Molecules, 19:19610-19632.,

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis, 12: 1543–1568.

Inca - Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p. : il. col., mapas.

Inca. Estimativa 2016/2017. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2017.

Inca. Leucemias: subtipos. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/sutipos>. Acesso em: 7 mar. 2017.

Jordan MA, Wilson L (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. Nature reviews cancer, 4: 253-265.

Kai H, Obuchi M, Yoshida H, Watanabe W, Tsutsumi S, Park YK, Matsuno K, Yasukawa K, Kurokawa M (2014). *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). Journal of Functional Foods, 8:214–223.

Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T (2012). Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (44): 11065–11070.

Kasai H, Kawai K (2006). Oxidative DNA damage: mechanisms and significance in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8: 981–983.

Khoo BY, Chua SL, Balaram P (2010). Apoptotic Effects of Chrysin in Human cancer cell lines. *International Journal of Molecular Science*, 11: 2188-2199.

Kubina R, Kabała-Dzik A, Dziedzic A, Bielec B, Wojtyczka RD, Bułdak RJ, Wyszyńska M, Stawiarska-Pięta B, Szaflarska-Stojko E (2015). The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or proapoptotic effect on HCT 116 colon cancer and me45 malignant melanoma cells in vitro conditions. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24 (2): 203–212.

Kimoto T, Aga M, Hino K, Koya-Miyata S, Yamamoto Y, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M (2001). Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, 21 (1): 221-228.

Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva YU, Bankova V, Christov R, Popov S (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235–240.

Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Yamada N, Ohta S, Ichihara K, Akao Y (2014). Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. *Phytomedicine*, 21 (8-9): 1070–1077.

Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, Tseng TH (2006). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and *in vivo*. *Cancer Letters*, 234 (2): 199–208.

Kuo YY, Lin HP, Huo C, Su LC, Yang J, Hsiao PH, Chiang HC, Chung C J, Wang HD, Chang JY, Chen YW, Chuu CP (2013). Caffeic acid phenethyl ester suppresses proliferation and survival of TW2.6 human oral cancer cells via inhibition of Akt signaling. International Journal of Molecular Sciences, 14 (5): 8801–8817.

Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki JSM, Sosada M, Swierczek-Zieba G (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. Molecules, 19 (1): 78–101.

Kustiawan PM, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Palaga T, Arung ET, Chanchao C (2015). Propolis from the Stingless bee *Trigona incisa* from East Kalimantan, Indonesia, induces in vitro cytotoxicity and apoptosis in cancer Cell lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16 (15): 6581-6589.

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. Progress in Lipid Research, 46: 244-282.

Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS (2005). Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations. American Journal Clinican Nutrition, 81 (supl.): 284S-291S.

Li H, Kapur A, Yang JX, Srivastava S, Mcleod DG, Paredes-guzman JF, Daugsch A, Park YK, Rhim JS (2007). Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. International Journal of Oncology, 31 (3): 601–606.

Lira AF, Sousa JPLM, Lorenzon MC, Vianna CAFJ, Castro RN (2014). Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponídeos. Acta Veterinaria Brasilica, 8 (3): 169-178.

Liou GY, Storz P (2010). Reactive oxygen species in cancer. Free Radical Research, 44 (5): 1-29.

Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL (2007). Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17 (3): 388-395.

Lopes M, Ferreira JB, Santos GS (2005). Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. Agriculturas, 2 (4): 7-9.

Lopes AA, Ferreira TS, Nesi RT, Lanzetti M, Pires KM, Silva AM, Borges RM, Silva AJ, Valença SS, Porto LC (2013). Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 21 (24): 7570–7577.

Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ (2008). Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Revista Brasileira de Farmacognosia. 18 (3): 447-454.

Ma X, Guo Z, Shen Z, Liu Y, Wang J, Fan Y (2015). The Anti-Porcine Parvovirus Activity of Nanometer Propolis Flavone and Propolis Flavone *in vitro* and *in vivo*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015: 1-10.

Machado BAS, Cruz LS, Nunes SB, Guez MAU, Padilha FF (2012). Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no brasil. Geintec, 2 (3): 221-235.

Maciejewicz W (2001). Isolation of flavonoid aglycones frompropolis by a column chromatography method and their identification by GC-MC and TLC methods. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 24 (8): 1171–1179.

Maciel MAM, Gomes FES, Pinto AC, Cólus IMS, Magalhães NSS, Grynberg NF, Echevarria A (2007). Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos antitumorais e antimutagênicos. Revista Fitoterápicos, 3 (1): 38- 59.

Mann J (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. Nature reviews – câncer, 2: 143- 148.

Marcucci MC (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 26: 83-99.

Marcucci MC (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Química Nova, 19: 529-536.

Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, de Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology, 74: 105-112.

Markiewicz-Żukowska R, Car H, Naliwajko SK, Sawicka D, Szynaka B, Chyczewski L, Isidorov V, Borawska MH (2012). Ethanolic extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells. Advances in Medical Sciences, 57 (2): 208-216.

Materska M (2008). Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – A Review. Polish journal of food and nutrition sciences, 58 (4): 407-413.

Menezes H (2005). Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arquivos do Instituto Biológico, 72 (3): 405-411.

Messerli SM, Ahn MR, Kunimasa K, Yanagihara M, Tatefuji T, Hashimoto K, Mautner V, Uto Y, Hori H, Kumazawa S, Kaji K, Ohta T, Maruta H (2009). Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1

signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytotherapy Research*, 23 (3): 423–427.

Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (12): 3418–3423.

Michener, C. D (2007). *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press.

Mishima S, Narita Y, Chikamatsu S, Inoh Y, Ohta S, Yoshida C, Araki Y, Akao Y, Suzuki KM, Nozawa Y (2005). Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 5–11.

Mohafez OMM, Abdel-Raheem IT, Nafady AM (2010). Antioxidant, lipid peroxidation-inhibitory and antiulcer activities of brown propolis. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, 33 (2): 169-177.

Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV, Lopez-Moratalla N, Martinez-Irujo JJ (2004). Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase- and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutrition and Cancer*, 50: 90-100.

Murad AM, Katz A (1996). *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*. Guanabara; Rio de Janeiro.

Nogueira-Neto P (1997). *Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis.

Nicholson DW (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407: 810-816.

Ohta T, Kunimasa K, Ahn MR, Kobayashi T, Eguchi R, Kumazawa S, Fujimori Y, Nakano T, Nakayama T, Kaji K, Ohta T (2011). Brazilian propolis suppresses

angiogenesis by inducing apoptosis in tubeforming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011: 1-8.

Oliveira KAM, Ribeiro LS, Oliveira GV (2013). Caracterização microbiológica, físico-química e microscópica de mel de abelhas Canudo (*Scaptotrigona depilis*) e Jataí (*Tetragonisca angustula*). Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, 15 (3): 239-248.

Oliveira A. Abelhas sem ferrão descrição das espécies. Disponível em: <http://www cpt com br/cursos-criacaodeabelhas/artigos>. Acesso em: 15 fev. 2017.

Oliveira LP (2015). Tecido sanguíneo e hematopoiético. Disponível em: <https://laan.jatai.ufg.br/up/707/o/sangue.pdf?1448365978>. Acesso em: 7 mar. 2017.

Osés SM, Pascual-Maté A, Fernández-Muiño MA, López-Díaz TM, Sancho MT (2016). Bioactive properties of honey with propolis. Food Chemistry, 1 (196): 1215-1223.

Orsolic N, Basic I (2003). Immunomodulation by watersoluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. Journal of Ethnopharmacology, 84 (2-3): 265-73.

Orsolic N, Saranovic AB, Basic I (2006). Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. Planta Medica, 72: 20–27.

Oyaizu M, Ogihara H, Fujimoto Y (1999). Antioxidative activity of extracts from propolis. The Journal of Japan Oil Chemists' Society. 49: 135-138.

Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2502–2516.

Paulino N, Abreua SRL, Utoc Y, Koyamac D, Nagasawa H, Hori HI, Dirsch V M, Vollmar AM, Scremin A, Bretz WA (2008). Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 587 (1-3): 296–301.

Pedro SRM (2014). The Stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61 (4): 348-354.

Pérez-Pérez EM, Suarez E, Peña-Vera MJ, González AC, Vit P (2013). Antioxidant activity and microorganisms in nest products of *Tetragonisca angustula* from Mérida, Venezuela. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots, 1-8.

Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25: 321-326.

Philchenkov AA, Balcer-Kubiczek EK (2016). Molecular markers of apoptosis in cancer patients exposed to ionizing radiation: the post-chernobyl view. *Experimental oncology*, 38 (4): 224–237.

Pinto LMA, do Prado NRT, de Carvalho LB (2011). Propriedades, usos e aplicações da própolis. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 8 (3): 76 – 100.

Pommier Y (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6 (10): 789-802.

Prakash SV, Timasheff SN (1983). The Interaction of vincristine with calf brain tubulin. *The journal of biological chemistry Printed in U.S.A.*, 2 (3): 1689-1697.

Premratanachai P, Chancao C (2014). Review of the anticancer activities of bee products. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 4 (5): 337-344.

Rafael JA, Melo GAR, de Carvalho CJB, Casari SA, Constantino R (Eds.) (2012). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Ribeirão Preto. Holos Editora.

Ramvi GV. (2015). Importância ambiental das abelhas sem ferrão. 2(4):1-20. Disponível em: http://www.ideau.com.br/getulio/restrito/upload/revistasartigos/310_1.pdf. Acesso em: 2 jul. 2017.

Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA (2008). Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 52 (7): 1096-1105.

Ricci MS, Zong WX (2006). Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. The oncologista, 11 (4): 342–357.

Rokicki W, Zalejska-Fiolka J, Pojda-Wilczek D, Hampel A, Majewski W, Ogultekin S, Mrukwa-Kominek E (2017). Differences in serum oxidative status between glaucomatous and nonglaucomatous cataract patients. BMC Ophthalmology, 17 (1): 1-13.

Russo A, Longo R, Vanella A (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. Fitoterapia, 73 (supl. 1): S21–S29.

Safe SH, Prather PL, Brents LK, Chadalapaka G, Jutooru I (2012). Unifying mechanisms of action of the anticancer activities of triterpenoids and synthetic analogs. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 12: 1211-1220.

Sawaya ACHF, Cunha IBS, Marcucci MC, Rodrigues RF de O, Eberlin MN (2006). Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. Apidologie, 37: 398–407.

Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Simic D, Radovanovic S, Simic T (2017). Novel biomarkers of heart failure. *Advances in Clinical Chemistry*, 79: 93-152.

Saul N, Pietsch K, Menzel R, Steinberg CEW (2008). Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*, 129 (10): 611–613.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1): 215S–217S.

Seda VH, Vatansever K, Sorkun S, Ismet Deliloğlu GS, Ozdal-Kurt F, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochemica*, 112 (6): 546–556.

Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113 (1): 1–14.

Silva GC, Pilger DA, Castro SM, Wagner SC (2006). Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina*, 42 (2): 77-84.

Silva V, Genta G, Moller MN, Masner M, Thomson L, Romero N, Radi R, Fernandes DC, Laurindo FR, Heinzen H, Fierro W, Denicola A (2011). Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (12): 6430–6437.

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

Slaa EJ, Chaves LAS, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37 (2): 293-315.

Sousa LA, Moura DC, Evangelista-Rodrigues A (2016). Perfil etnofarmacológico do mel de urucú (*Melipona Scutellaris*, Latreille 1811). *Revista Ciência & Trópico*, 39 (2): 185-203.

Souza BA (2010). Caracterização dos méis de meliponíneos no Brasil: situação atual e perspectivas. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/872849/caracterizacao-dos-meis-de-meliponineos-no-brasil-situacao-atual-e-perspectivas>. Acesso em: 28 jan. 2017.

Sulaiman GM, Ad'hiah AH, Al-Sammarrae KW, Bagnati R, Frapolli R, Bello E, Ubaldi S, Romano M, Panini N, Scanziani E, Pezzolato M, Erba E, D'Incacci M (2012). Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (5): 1632–1641.

Szliszka E, Zydowicz G, Mizgala E, Krol W (2012). Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International journal of oncology*, 41: 818-828.

Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI (2013). Markers of oxidative stress during Diabetes mellitus. *Journal of Biomarkers*, 2013: 1-8.

Trusheva B, Popolva M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I (2006). Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3: 249-254.

Umthong S, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Chanchao C (2011). *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *Complementary and Alternative Medicine*, 11 (37) 1-8.

Tyszka-Czochara M, Konieczny P, Majka M (2017). Caffeic acid expands anti-tumor effect of metformin in human metastatic cervical carcinoma htB-34 cells: Implications of AMPK activation and impairment of fatty acids de novo biosynthesis. International Journal of Molecular Sciences, 18 (2): 1-16.

Valença I, Morais-Santos F, Miranda-Gonçalves V, Ferreira AM, Almeida-Aguiar C, Baltazar F (2013). Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer *in vitro*. Complementary and Alternative Medicine, 13 (184): 1-8.

Valente MJ, Baltazar AF, Henrique R, Estevinho L, Carvalho M (2011). Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. Food and Chemical Toxicology, 49: 86–92.

Vargas AC, Loguerio AP, Witt NM, da Costa MM, S  E, Silva M, Viana LR (2004). Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. Ciência Rural, 34:159-163.

Velikova M, Bankova V, Tsvetkova I, Kujumgiev A, Marcucci MC (2000). Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. Fitoterapia, 71: 693-696.

Venturieri GC (2013). Cria o racional de melipon eos: uma alternativa econ mica entre agricultores familiares amazônicos. APACAME – Mensagem Doce. 1-5.

Vieira DSC, Duflot RM, Schmitt FCL, Zeferino LC (2008). Carcinoma de mama: novos conceitos na classifica o. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 30 (1): 42-47.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JÁ (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. Journal of Food Science, 73 (9): R117– R124.

Volpi N, Bergonzini G (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 42: 354–361.

Wagh VD (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. Advances in Pharmacological Sciences. 2013: 1-11.

Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA (1996). Plant Antitumor Agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. Journal of the American Chemical Society, 88 (16): 3888–3890.

Wang TH, Wang HS, Soong YK (2000). Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. Cancer, 88 (11): 2619-2628.

Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, Shimizu N, Nakaki T (2004). Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. The Journal of Biological Chemistry, 279 (7): 6017–6026.

Yamoto DY, Akatsu IP, Soares AEE (2007). Quantificação da produção do mel de *Scaptotrigona aff. depilis* (hymenoptera, Apidae, Apinae) do município de Luiz Antônio. Bioscience Journal, 23 (Supl. 1): 89-93.

Yonar ME, Yonar SM, Ural MS, Silici S, Dusukcan M (2012). Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. Food and Chemical Toxicology, 50 (8): 2703–2708.

Zanichelli MA, Colturato VR, Sobrinho J (2010). Indicações em transplante de células-tronco hematopoéticas em pacientes adultos com leucemia linfóide aguda. Revista Brasileira de Hematologia, Hemoter. 32 (Supl. 1): 54-60.

Zhang T, Chen X, Qu L, Wu J, Cui R, Zhao Y (2004). Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 6097-6105.

Zhang Q, Zhao XH, Wang ZJ (2009). Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicology in Vitro*, 23: 797-807.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B697a Bonamigo, Thaliny.

Atividades antioxidantes, citotóxica e toxicidade de
própolis de duas abelhas nativas do Brasil : *Scaptotrigona*
depilis e *Melipona quadrifasciata anthidioides* . / Thaliny
Bonamigo. – Dourados, MS : UFGD, 2017.

69f.

Orientador: Dr. Edson Lucas dos Santos

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) –
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Cromatografia. 2. Estresse oxidativo. 3. Peroxidação
lipídica. 4. Células eritroleucêmicas K562. 5.
Caenorhabditis elegans. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

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