

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

FRANCISCO ASSIS NASCIMENTO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DA
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith EM LINHAGEM CELULAR DE
CÂNCER DE OVÁRIO**

São Luís-MA

2019

FRANCISCO ASSIS NASCIMENTO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DA
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith EM LINHAGEM CELULAR DE
CÂNCER DE OVÁRIO**

Monografia apresentada ao departamento de Farmácia do
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade
Federal do Maranhão, como parte da obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa Cristina Aranha Batista

São Luís-MA

2019

FRANCISCO ASSIS NASCIMENTO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DA
GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith EM LINHAGEM CELULAR DE
CÂNCER DE OVÁRIO**

Monografia apresentada ao departamento de Farmácia do
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade
Federal do Maranhão, como parte da obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia

Aprovado em: 25 de junho de 2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro (Orientadora)
Doutorado em Química Orgânica (USP)

Dra. Marisa Cristina Aranha Batista (Co-Orientadora)
Doutorado em Biotecnologia (UFMA)

Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral (1º Examinador)
Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos (UFPB)

Dra. Mayara Soares Cunha Carvalho (2º Examinador)
Doutorado em Ciências da Saúde (UFMA)

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Pereira, Francisco Assis Nascimento.

Caracterização química e atividade antitumoral in vitro da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em linhagem celular de câncer de ovário / Francisco Assis Nascimento Pereira. - 2019.

39 f.

Coorientador(a): Marisa Cristina Aranha Batista.

Orientador(a): Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Curso de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Anticâncer. 3. Composição química. I. Batista, Marisa Cristina Aranha. II. Ribeiro, Maria Nilce de Sousa. III. Título.

*Dedico este trabalho a todos os
meus amigos e familiares.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e disposição para realizar este trabalho.

Aos meus familiares por acreditarem e sempre torcerem por mim.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro, a qual tenho grande carinho e admiração, me acolheu em seu laboratório como aluno de iniciação científica e a quem devo grandes conhecimentos científicos e de vida.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Marisa Cristina Aranha Batista que se dispôs a contribuir com este trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha por ajudar a fazer a identificação dos compostos da geoprópolis.

À Profa. Dra. Ana Paula Silva Azevedo dos Santos pela ajuda nas interpretações dos resultados biológicos.

Aos doutorandos do Laboratório de Farmacognosia por me auxiliaram nos experimentos: Alberto Jorge Lopes e Josianne Rocha Barboza.

À Central Analítica/CCET por permitirem o uso do CLAE para fazer análise do extrato hidroetanólico da geoprópolis.

Ao Laboratório de Produtos Naturais, onde foi possível utilizar o rotaevaporador e o liofilizador.

A Comissão Organizadora do XI Curso de Verão de Pesquisa em Oncologia, no Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Rio de Janeiro por ter me dado a oportunidade de participar deste curso maravilhoso e aprender um pouco da área de câncer.

A Paulinha, minha monitora do curso de verão do INCA que por coincidência também trabalhava com atividade anticâncer de produtos naturais.

À Dra. Isabella Guimarães do Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto Nacional do Câncer (INCA), que criou uma parceria com nosso laboratório para fazer os testes antitumorais.

Aos meus grandes amigos da graduação: Carla, Caroline, Alanna, Victor Vieira, Victor Matheus, Andreza e Hilka. Agradeço a amizade durante esses anos na academia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelos recursos disponibilizados através dos projetos: Pólen de *Melipona fasciculata* Smith: ações antibacteriana, antioxidante, parâmetros polínicos, físico-químicos, químicos e nutricionais (Termo de Outorga nº 009748/2015) e Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em linhagens tumorais (Termo de Outorga nº 017448/2017).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica nos períodos de 10/04/2017 a 31/07/2019.

Ao seu Antônio Evilasio, meliponicultor do povoado Nova Ponta Branca, de Pinheiro, Maranhão, por doar a amostra de geoprópolis.

Agradeço também a todos que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Tudo vale a pena quando a
alma não é pequena”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Melipona fasciculata Smith, espécie nativa do Maranhão, coleta material resinoso das plantas e traz para sua colmeia, mistura com secreções salivares, cera e barro ou terra formando a geoprópolis. Estudos já demonstraram a ação antitumoral *in vitro* da geoprópolis contra câncer de ovário. Esta é a segunda neoplasia ginecológica mais incidente e em muitos casos é resistente ao tratamento medicamentoso. O trabalho objetiva avaliar atividade antitumoral *in vitro* de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em linhagem celular de câncer de ovário (ES2) e identificar sua composição química. A geoprópolis de *Melipona fasciculata* foi coletada no município de Pinheiro, Maranhão. Foi extraída por maceração com etanol 70% por 48 horas, filtrada e concentrada em evaporador rotativo, sendo posteriormente liofilizada, obtendo-se o extrato hidroetanólico de geoprópolis de Pinheiro (EHGP). Foram quantificados polifenóis e flavonoides totais. Avaliou-se a atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (Poder antioxidante de redução férrica). A composição química foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta visível (CLAE/UV-Vis) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/EM/EM). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5 difenil tetrazólio). O EHGP apresentou rendimento extrativo de 12,60%, com teores de fenóis e flavonoides, respectivamente, $7,27 \pm 0,26\%$ e $0,13 \pm 0,01\%$, atividade antioxidante pelo DPPH com CE_{50} de $265,91 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ e capacidade de redução férrica de $1,10 \pm 0,25 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$. A composição química por CLAE/UV-Vis demonstrou a predominância de compostos de baixa polaridade. A CCD revelou a presença de triterpenos. Foram identificados cinco compostos por CLAE/EM/EM: ácido glucônico e quatro flavonoides glicosilados: S-eriodictiol-6-C- β -D-glucopiranosídeo, narigenina-C-glicosídeo, isômero da narigenina-C-glicosídeo e hesperetina-7-O-ramnosídeo. O EHGP apresentou citotoxicidade dose-dependente e tempo-dependente na linhagem tumoral de câncer de ovário (ES2). Sendo assim, a geoprópolis é um produto natural promissor na busca de moléculas bioativas com potencial anticâncer. Estudos de isolamento e identificação de biomoléculas relacionados com a atividade antitumoral e toxicológicos são necessários para determinar a segurança desse produto que pode ser uma terapia alternativa/complementar para o tratamento do câncer de ovário.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão. Anticâncer. Composição química.

ABSTRACT

Melipona fasciculata Smith, a native species from Maranhão, collects resinous material from the plants and brings to its hive, a mixture with salivary secretions, wax and clay or earth forming the geopropolis. The objective of this work is to investigate the *in vitro* antitumor activity of the hydroethanolic extract of the geometry of *Melipona fasciculata*, the cellular molecule of ovarian cancer (ES2) and its chemical composition. The geopropolis of *Melipona fasciculata* was collected in the municipality of Pinheiro, Maranhão. It was extracted by maceration with 70% ethanol for 48 hours, filtered and concentrated in a rotary evaporator, and then lyophilized, obtaining the hydroalcoholic extract of Pinheiro geopropolis (EHGP). Polyphenols and total flavonoids were quantified. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) method. The chemical composition was evaluated by thin layer chromatography (CCD), high performance liquid chromatography coupled to visible ultraviolet detector (HPLC/UV-Vis) and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer (HPLC/MS/MS). Cytotoxicity was assessed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay. The EHGP presented extractive yield of 12.60%, with contents of phenols and flavonoids, respectively, $7.27 \pm 0.26\%$ and $0.13 \pm 0.01\%$, antioxidant activity by DPPH with EC_{50} of $265.91 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$ and ferric reduction capacity of $1.10 \pm 0.25 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$. The chemical composition by HPLC/UV-Vis demonstrated the predominance of low polarity compounds at the retention times from 40 min. The CCD revealed the presence of triterpenes. Five compounds were identified by LC/MS/MS: gluconic acid and four phenolic compounds: S-eriodictiol-6-C- β -D-glucopyranoside, narigenin-C-glycoside, isomer of narigenin-C-glycoside and hesperetin-7-O-rhamnoside. The EHGP presented dose-dependent and time-dependent cytotoxicity in the ovarian cancer tumor line (ES2). Thus, the geopropolis is a promising natural product in the search for bioactive molecules with anticancer potential. Isolation studies and identification of biomolecules related to antitumor activity and toxicology are required to determine the safety of this product which may be an alternative/complementary therapy for the treatment of ovarian cancer.

Keywords: Stingless bee. Anticancer. Chemical composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	16
Figura 2 – Mapa do município de Pinheiro onde foi coletada a geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	21
Figura 3 – A. Caixa da colmeia de <i>Melipona fasciculata</i> com a geoprópolis na parte superior indicada pela seta vermelha. B. Geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith coletada no Povoado Nova Ponta Branca, no município de Pinheiro, Maranhão	22
Figura 4 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith	28
Figura 5 – Cromatograma obtido por CCD de extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith de Pinheiro	28
Figura 6 – Viabilidade celular de câncer de ovário (ES2) depois da incubação da geoprópolis (15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 e 48h, determinado pelo teste do MTT .	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	26
Tabela 2 – Compostos tentativamente identificados no extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> por CLAE/EM/EM	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Meliponinae	15
2.2	Atividade antitumoral <i>in vitro</i> da geoprópolis	16
2.3	Composição química da geoprópolis	17
2.4	Câncer	18
2.4.1	Câncer de ovário	19
2.4.2	Relação entre o câncer e radicais livres.....	20
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Coleta da amostra da geoprópolis	21
4.2	Obtenção do extrato hidroetanólico da geoprópolis	22
4.3	Determinação do teor de polifenóis totais	22
4.4	Determinação do teor de flavonoides totais	22
4.5	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	23
4.5.1	Ensaio de sequestro de radical livre	23
4.5.2	Ensaio da capacidade redutora de ferro	23
4.6	Composição química	24
4.6.1	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de ultravioleta.....	24
4.6.2	Cromatografia em camada delgada	24
4.6.3	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas.....	24
4.7	Ensaio de citotoxicidade	25
4.8	Análise estatística	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26

6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão ou meliponíneos são insetos sociais de grande diversidade e ampla distribuição geográfica. Ocorrem em grande parte nas regiões tropicais da Terra, ocupando praticamente toda a América Latina e África, além do sudeste asiático e norte da Austrália. Entretanto, é nas Américas que grande parte da diversidade de espécies ocorre, são aproximadamente 400 tipos descritos, conforme catalogação recente (VILLAS-BÔAS, 2018).

A criação de meliponíneos ou meliponicultura é uma prática bastante antiga, desenvolvida há muitos séculos, cujos relatos dessa atividade remonta aos primórdios das civilizações antigas, no Egito Antigo (PALAZUELOS-BALLIVIÁN, 2008). Inicialmente desenvolvida pelos índios, a meliponicultura brasileira, foi ao longo do tempo sendo praticada de forma tradicional por pequenos e médios produtores, principalmente por aqueles que usavam mão de obra familiar nas atividades agropecuárias, sendo considerada uma atividade econômica complementar (COLETTTO-SILVA, 2005). Esta prática ainda é muito comum, sendo especialmente mantida por povos indígenas, mas também por comunidades tradicionais e camponesas, em diversas regiões do Brasil (ALVES et al., 2007).

Melipona fasciculata Smith é uma espécie de abelha sem ferrão, popularmente conhecida como tíuba, que é tradicionalmente cultivada no estado do Maranhão para produção de mel (VILLAS-BÔAS, 2018).

Apesar do cultivo de tíuba no estado Maranhão ser voltado principalmente para a produção de mel, há outros produtos meliponículas que podem ser aproveitados, como a cera, o pólen e o geoprópolis. Segundo Freire et al., (2012) a exploração de um meliponário com 250 colônias de *Melipona fasciculata*, gerariam cerca de R\$ 115.000,00 de receita bruta anual, somente com a produção de mel, valor esse pode ser aumentado com a comercialização de outros produtos meliponículas, como a geoprópolis produzida pela abelha.

A geoprópolis é o resultado da coleta de resinas vegetais que a abelha leva para sua colmeia e mistura com secreção de glândulas, cera, pólen e adiciona terra ou barro à sua composição, sendo produzida para a calafetação da colônia, manutenção da temperatura, ventilação do ninho e defesa contra inimigos (FREITAS et al., 2008; CARVALHO-ZILSE et al., 2011).

Na literatura são descritas algumas atividades biológicas da geoprópolis: ação antinoceptiva (FRANCHIN et al., 2012), antioxidante (DUTRA et al., 2014; BATISTA et al., 2016; SILVA et al., 2016 ; DOS SANTOS et al., 2017; FERREIRA et al., 2017), leishmanicida (DUTRA et al., 2019), antiviral (COELHO et al., 2015), gastroprotetora (RIBEIRO-JUNIOR

et al., 2015), antimicrobiana (LIBERIO et al., 2011; ARAÚJO, 2013; DA CUNHA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2017a, b; DE SOUSA et al., 2015, SILVA et al., 2016), anti-inflamatória (DOS SANTOS et al., 2017a), antitumoral (CINEGAGLIA et al., 2013; DA CUNHA et al., 2013; BARTOLOMEU et al., 2016, CUNHA, 2017), anti-helmíntica (BATISTA, 2016) entre outras.

Vale ressaltar que as atividades biológicas da geoprópolis produzidas pelas abelhas sem ferrão têm sido atribuídas à sua composição química que é constituída de classes de compostos químicos, como ácidos fenólicos, fenilpropanoides, benzofenonas, taninos hidrolisáveis, flavonoides, cumarinas, diterpenos, triterpenos, esteroides, ácidos graxos, compostos voláteis e açúcares (BANKOVA; POPOVA, 2007; DUTRA et al., 2014; BATISTA et al., 2016; TORRES-GONZÁLEZ et al., 2016; LAVINAS et al., 2018).

Alguns estudos sobre a atividade antitumoral *in vitro* da geoprópolis têm demonstrado resultados promissores. O extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona. scutellaris* apresentou potente atividade contra tumores de próstata e de ovário e exibiu perfil não tóxico contra linhagens celulares normais (DA CUNHA et al., 2013).

O câncer se apresenta hoje como uma das grandes preocupações da era moderna e é considerado um problema de saúde pública mundial e é uma das principais causas de morte em muitos países.

Estima-se para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. Nas Regiões Norte e Nordeste, os cânceres de próstata e mama feminina estão entre os principais, mas a incidência do câncer de ovário também tem bastante impacto, sendo a segunda neoplasia ginecológica mais incidente. No estado do Maranhão, há incidência de 110 novos casos e na capital, São Luís, 40 novos casos de neoplasia ovariana, com 3.536 número de óbitos no ano de 2015 (BRASIL, 2018).

O tratamento do câncer de ovário pode ser feito através de cirurgia citorrredutora e quimioterapia, entretanto, esta neoplasia pode se tornar recidiva, podendo ocorrer o desenvolvimento de resistência ao tratamento medicamentoso, sendo as taxas ainda muito frequentes. Cerca de 80% das pacientes com câncer epitelial avançado de ovário recaem durante ou após a quimioterapia adjuvante com taxano/composto de platina. Desses pacientes, um quarto é resistente ao composto de platina, embora todos os pacientes com doença recorrente cedo ou tarde desenvolvam resistência ao medicamento (LEDERMANN; KRISTLEIT, 2010).

Considerando a resistência do tratamento do câncer de ovário e a necessidade de buscar compostos bioativos da geoprópolis, este trabalho tem como propósito avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em

linhagem celular de câncer de ovário e identificar sua composição química, considerando que esta abelha é nativa no estado do Maranhão e os estudos podem estimular o desenvolvimento econômico da meliponicultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Meliponinae

As abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) são conhecidas como abelhas sem ferrão, por possuírem ferrão atrofiado e, sendo assim, não possuem capacidade de ferroar. Esta característica lhes permitem um comportamento mais dócil que facilitou sua domesticação por indígenas. Entretanto, não são indefesas, pois criaram mecanismos de defesas, como, a ação de enrolarem-se nos cabelos e pelos do agressor, a construção dos ninhos com entrada estreita, para permitir acesso a poucas abelhas e a capacidade de se camuflarem, como disfarce protetivo. Além disso, a presença de abelhas guardiãs na passagem e a oclusão da entrada com cera e resina em caso de ameaça são outros mecanismos utilizados (FREITAS, 1999; CAMARGO, OLIVEIRA; BERTO, 2017).

As abelhas estão divididas em dois grupos distintos: as Meliponini e as Trigonini. De maneira geral, as Meliponini espécies unicamente do gênero *Melipona* são abelhas maiores, com aspecto robusto, de tamanho médio a grande (variando de 7 a 15 mm). São popularmente conhecidas como, uruçus, jandaíras, tiúbas, mandaiaias e equivalentes. Já as Trigonini espécies de todos os outros gêneros que não são *Melipona* são abelhas menores, de aspecto mais esbelto, de tamanho pequeno a médio (variando de 2 a 11 mm). São popularmente conhecidas como: jataís, irais, mirins, canudos e outras. A principal diferença entre os dois grupos, entretanto, reside no processo de formação de rainhas (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2018).

A meliponicultura significa, o cultivo das abelhas indígenas sem ferrão. É uma atividade que pode ser integrada à vegetação natural, a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto e, em muitos casos, pode contribuir para o aumento da produção agrícola, originando frutos maiores e em maior quantidade, através do serviço de polinização prestado pelas abelhas (VENTURIERI, 2004).

A meliponicultura no Brasil é o resultado da fusão entre o conhecimento tradicional sobre os recursos naturais dos povos indígenas com a predileção europeia de domesticar animais, cuja cultura foi incorporada pelos colonizadores. Gradativamente, a criação das

abelhas nativas se difundiu, tornando-se uma tradição popular principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (VILLAS-BÔAS, 2018).

A espécie *Melipona fasciculata* ocorre no Nordeste da Região Amazônica, nos estados do Pará e Maranhão. É conhecida, popularmente, como “tiúba” e “tiúba do Maranhão”, pertence a Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Apinae e Tribo Meliponini (VENTURIERI; RAIOL; PEREIRA, 2003).

No estado do Maranhão, *Melipona fasciculata* tem uma importante inserção no mercado local, produzindo um mel de qualidade e com amplas possibilidades para exploração em escala econômica. Outros produtos meliponículas se destacam como a geoprópolis (Figura 1) que é formado por material resinoso coletado das plantas pela abelha que traz para sua colmeia, misturando com secreções salivares, cera e adicionando barro ou terra (HOLANDA et al., 2012).

Figura 1 – Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith



Fonte: DUTRA (2014)

2.2 Atividade antitumoral *in vitro* da geoprópolis

O uso de produtos elaborados por abelhas sem ferrão foi herdado de povos indígenas, que os utilizavam para muitas finalidades. Esse uso foi propagado ao longo de gerações e hoje faz parte da cultura popular do país. O mel, o pólen, própolis, geoprópolis e cera de abelhas sem ferrão têm sido utilizados pelos índios e comunidades rurais no combate às doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, fortificantes e agentes bactericidas (DOS SANTOS; ANTONINI, 2008).

Nos últimos anos, a geoprópolis tem chamado atenção devido aos resultados promissores publicados na literatura relacionados a atividade anti-cancerígena. Da Cunha et al. (2013) observaram que em baixas concentrações, o extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* inibiu o crescimento total das linhagens tumorais de glioma (U251),

melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovários resistentes a múltiplas drogas (NCI / ADR-RES), rim (786-10), pulmão (NCI- H460) próstata (PC-3) e ovário (OVCAR-3), quando em comparação com linhagens de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos normais murinos (3T3).

Bartolomeu et al. (2016) demonstraram que a combinação de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith com doxorrubicina levou a uma maior atividade citotóxica inibindo o crescimento de células HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe), consequentemente, induzindo a apoptose.

Dos Santos (2017) e colaboradores testaram a atividade antiproliferativa de extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* contra carcinoma hepatocelular humano (HepG2), leucemia promielocítica humana (HL-60) e leucemia mielocítica crônica humana (K562) e verificaram que as CI_{50} (concentração média que inibe 50% da proliferação celular) dessas linhagens tumorais foram inferiores quando comparadas às células normais (linfoblastos humanos).

Oliveira et al. (2019) investigaram se o agente quimioterápico doxorrubicina em combinação com extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith poderia afetar células imunes não tumorais, avaliando seus efeitos imunomoduladores em monócitos humanos. Os resultados mostraram que a associação diminuiu a secreção de IL-6, estimulando a produção de TNF- α e IL-10, e a expressão de TLR-4 e CD80, através da via NF- κ B e autofagia. A abordagem quimioterápica usando doxorrubicina simultaneamente com geoprópolis não afetaram a viabilidade dos monócitos humanos e exerceu efeitos imunomoduladores, favorecendo funções celulares.

2.3 Composição química da geoprópolis

Os flavonoides (5,7,4'-tri-hidroxi-flavona, 3,5,6,7,4'-penta-hidroxi-flavonol, naringenina-4'-O- β -D-glucopiranosídeo e miricetina-3-O-p-D-glucopiranyl) foram isolados e identificados por análises espectroscópicas da geoprópolis de *Melipona interrupta* (SILVA et al., 2013).

O extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* submetido ao fracionamento biomonitorado por Da Cunha et al. (2016), permitiram o isolamento e elucidação de duas novas cumarinas: 5,7-di-hidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-propil-cumarina e 5,7-di-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcumarina e identificação de cinco cumarinas (mammeigina, hidroximammeigina, mammeisina, cinamoiloxi-mamisina e mammeína) e uma benzofenona (ent-nemorosona).

Batista et al. (2016), identificaram por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM): ácidos graxos (palmítico, esteárico, linoleico, melíssico, octenóico), ácidos orgânicos (glicólico, glicônico e quínico), açúcares (glicose, frutose, manose, arabinose, galactose, fucose, sorbose, xilose, ribose e aucubina), álcoois (eritritol, arabitól, sorbitol, glicerol, xilitol e inositol), ácidos fenólicos (ácido protocatecuico, ácido gálico e ácido elágico), triterpenos (cicloartano, clicoursano e β -amirina) e esteroides (lanosterol e acetato de lanosterol) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.

Dutra et al. (2014) identificaram da geoprópolis de *Melipona fasciculata*, coletada no Cerrado maranhense, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray (CLAE/ESI/EM/EM), 11 compostos pertencentes as classes dos ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos), como ácido gálico, ácido elágico, galoil-HHDP-glicose, glicose HHDP, di-HHDP-glicose, trigaloil-glicose, di-HHDP-galoil-glicose, isômero de di-HHDP-galoil-glicose, dilactona do ácido valoneico, di-HHDP-galoil-glicose e trigaloil-HHDP-glicose e sugerem que a atividade antioxidante do extrato está relacionada a essas classes de compostos.

Souza et al. (2018) identificaram por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com detector de arranjo de díodos, 51 compostos da geoprópolis de *Melipona subnitida* Ducke sendo quatro glicosídeos de galoil, 11 acil-hexosídeos, 23 acil-galoil-hexosídeos, ácido elágico e 12 flavonoides.

2.4 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (BRASIL, 2018).

O câncer surge a partir de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no DNA da célula, que passa a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas (BRASIL, 2018).

Essas células alteradas passam então a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. (SPENCE; JONHSTON, 2001; CHABNER; LONGO, 2011; BRASIL, 2018).

2.4.1 Câncer de ovário

O câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum, atrás apenas do câncer do colo do útero. A quase totalidade das neoplasias ovarianas (95%) é derivada das células epiteliais (que revestem o ovário). O restante provém de células germinativas (que formam os óvulos) e células estromais (que produzem a maior parte dos hormônios femininos). Para o Brasil, estimam-se 6.150 casos novos de câncer do ovário, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 5,79 casos a cada 100 mil mulheres e o oitavo mais incidente. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer do ovário é o sétimo mais incidente nas Regiões Centro-Oeste (5,83/100 mil), Nordeste (5,04/100 mil) e Norte (2,96/100 mil). Nas demais Regiões, Sul (7,12/100 mil) e Sudeste (6,40/100 mil), ocupa a oitava posição (BRASIL, 2018).

A incidência do câncer de ovário apresenta variação de 9,1/100 mil mulheres nas Regiões mais desenvolvidas para 4,9/100 mil mulheres nas menos desenvolvidas; enquanto a mortalidade varia de 5,0/100 mil mulheres nas Regiões mais desenvolvidas e 3,1/100 mil mulheres nas menos desenvolvidas. Em 2012, a incidência foi maior em países com altos níveis de desenvolvimento humano (55%). Observaram-se elevadas taxas de incidência e mortalidade na Europa e América do Norte (BRASIL, 2018).

Fatores genéticos como a história familiar de câncer de ovário ou de mama; mutações de alto risco dos genes BRCA1 e BRCA2; menopausa tardia; endometriose; nuliparidade (nunca engravidaram ou nunca tiveram filhos); TRH (hormônio liberador de tireotrofina), obesidade e tabagismo estão associados com o desenvolvimento do câncer ovariano. A gravidez e uso de contraceptivos orais (supressão da ovulação) são considerados fatores de proteção (BRASIL, 2018).

2.4.2 Relação entre o câncer e radicais livres

Segundo Sosa et al. (2013), o oxigênio durante o transporte de elétrons na mitocôndria durante a respiração celular pode ser reduzido parcialmente gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot). Quando ocorre a perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs, o que é chamado de estresse oxidativo, podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer.

Diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon, apresentam níveis elevados de EROs. Células tumorais estão comumente expostas a condições de estresse, como hipóxia (baixos níveis de oxigênio), perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, desbalanço no metabolismo oxidativo e diversos fatores ambientais (REUTER et al., 2010; DHILLON et al., 2011).

Alguns pesquisadores relacionaram a atividade antitumoral com a atividade antioxidante de produtos naturais, e demonstraram que a geração de radicais livres podem ser um dos fatores determinantes para o crescimento e progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em linhagem celular de câncer de ovário (ES2) e identificar sua composição química.

3.2 Objetivos específicos

Quantificar o teor de polifenóis e flavonoides totais do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;

Identificar a composição química do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do extrato hidroetanólico da geoprópolis de

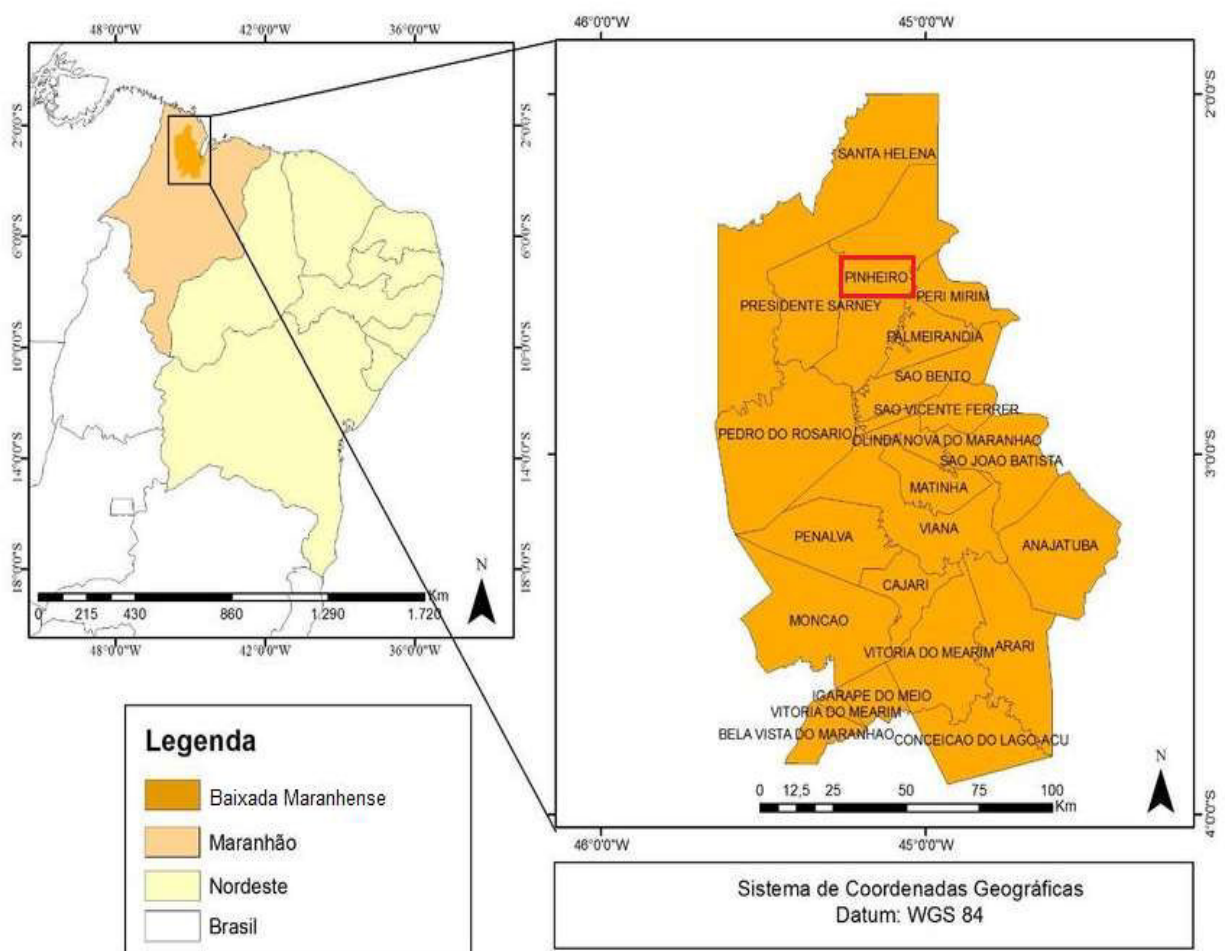
Melipona fasciculata em linhagem de câncer de ovário (ES2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta da amostra da geoprópolis

A amostra da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foi coletada no dia 29 de setembro de 2018 diretamente da colmeia do meliponário do povoado Ponta Branca, do município de Pinheiro, na região da Baixada Maranhense (Figura 2). A amostra foi retirada na parte superior da caixa da colmeia (Figura 3) e posteriormente acondicionada em saco coletor estéril e mantida sob refrigeração.

Figura 2 – Mapa do município de Pinheiro onde foi coletada a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith



Fonte: SANTOS (2016)

Figura 3 – A. Caixa da colmeia de *Melipona fasciculata* com a geoprópolis na parte superior indicada pela seta vermelha. B. Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletada no Povoado Nova Ponta Branca, no município de Pinheiro, Maranhão



Fonte: Autoria própria (2018)

4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico da geoprópolis

A amostra da geoprópolis foi triturada em moinho de facas e submetida à maceração exaustiva com etanol 70% (v/v) por 48h, utilizando a relação hidromódulo 1:5 (p/v), posteriormente a solução extrativa foi filtrada, concentrada em evaporador rotativo e liofilizada, obtendo-se o extrato hidroetanólico da geoprópolis de Pinheiro (EHGP) (CUNHA et al., 2009).

4.3 Determinação do teor de polifenóis totais

O teor de polifenóis totais foi determinado utilizando reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 20%. A mistura reacional foi mantida no escuro por 2h a temperatura ambiente e absorvância foi medida a 760 nm usando espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35. (Perkin Elmer Corporation, Massachusetts, USA). A concentração de polifenóis totais foi calculada a partir de uma curva de calibração de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata (DUTRA et al., 2014).

4.4 Determinação do teor de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados utilizando o método colorimétrico com solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5%, medidos em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, USA) a 425 nm, empregando concentrações de quercetina (Merck) como padrão. As análises foram realizadas em triplicata

(DUTRA et al., 2008, 2014).

4.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

4.5.1 Ensaio de sequestro de radical livre

A atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da geoprópolis foi avaliada pelo ensaio do radical livre DPPH[•], segundo BRAND-WILLIAMS et al. (1995) com modificações. As amostras foram diluídas em metanol, em diferentes concentrações e adicionadas a uma solução de DPPH[•] em metanol (40,0 µg/mL). Após 30 minutos de reação à temperatura ambiente, no escuro, a absorbância de cada solução foi lida a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer). O metanol foi utilizado como controle e a solução de DPPH[•] usada como branco. A porcentagem da atividade antioxidante (% AA) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AA} = (\%) = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100 / A_{\text{controle}}],$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle (solução com radical DPPH[•] e metanol) e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença das amostras.

A porcentagem da atividade antioxidante foi relacionada com a concentração da amostra para a obtenção da concentração efetiva (CE_{50}), definida como a concentração da amostra necessária para causar uma inibição de 50% da concentração inicial de DPPH. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Ensaio da capacidade redutora de ferro

O método descrito por BENZIE E STRAIN (1996) com algumas modificações, foi utilizado para determinar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da geoprópolis baseado na redução do ferro usando o ensaio FRAP (Poder antioxidante de redução férrica), que mede a capacidade das amostras, em meio ácido (pH 3,6), de reduzir o complexo férrico 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (Fe^{3+} - TPTZ) para a forma ferrosa de coloração azul intensa (Fe^{2+}), que absorve a luz em 593 nm. O reagente FRAP foi preparado imediatamente antes da análise através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol.L⁻¹, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mmol.L⁻¹ TPTZ em 40 mmol.L⁻¹ HCl) e 2,5 mL $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ (20 mmol.L⁻¹) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL de diferentes concentrações das amostras (1-100,0 µg/mL) foi adicionada a 300 µL de água destilada e 3,0 mL de reagente de FRAP e as misturas foram incubadas no banho de água a 37°C durante 30 minutos. A absorbância da

mistura reacional foi lida a 593 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer) utilizando a solução de FRAP como branco.

4.6 Composição química

4.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de ultravioleta

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de ultravioleta (CLAE/UV-Vis) foi realizada num cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Autosampler (Thermo) (San Jose, CA, EUA), equipado com um injetor com loop de 25 μ L, e um detector de UV-Vis. A coluna usada foi C-18 (250 x 4,6mm, 5 μ m, Hypersil BDS) fornecido por Thermo Electron Corporation (Waltham, MA), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 3mm, 5 μ m, Gemini, Phenomenex). A separação dos compostos do extrato da geoprópolis foram realizados à temperatura ambiente com um programa de gradiente de eluição a uma taxa de fluxo de 1,0mL/min. As fases móveis utilizadas foram água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B) com gradiente de 0-1 min, 5% B; 1-60 min, 5-30% B; 60-90 min, 30-100% B. As amostras antes de serem injetadas no CLAE foram diluídas em metanol e água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico e filtradas em filtro de Nylon (0,22 μ m, Allcrom). Injetou-se uma alíquota de 5mg/mL e a detecção foi realizada em 280 nm.

4.6.2 Cromatografia em camada delgada

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foi submetido à cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel 60F₂₅₄₊₃₆₆ (Merck), usando como fase móvel diclorometano e metanol (8:2). A revelação da cromatoplaça foi realizada através da borrifação de uma solução de *p*-anisaldeído sulfúrico. Esta foi preparada segundo a metodologia de WAGNER E BLADT (1996). Preparou-se uma solução contendo anisalaldeído 5% (v/v) em ácido acético glacial e adicionou-se a esta solução 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

4.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

O extrato da geoprópolis foi analisado por cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas CLAE/LC-10AD (Shimadzu), equipado com detector de arranjo de fotodiodo, acoplado com espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM) (Bruker

Daltonics Esquire 3000 Plus), com analisador tipo íon trap quadrupolo em modo tandem, com ionização por elétron ebulização (electrospray ionization, ESI). A fase móvel utilizada foi água Milli-Q (Millipore) com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e metanol (eluente B). A eluição foi realizada em gradiente linear de 0 min – 10% B, 40 min – 100% B, 60 min-100% B, 65 min – 10%, 70 min – 20% utilizando coluna analítica C18 de fase reversa (250mm x 4, 60 mm, 5 µm, Phenomenex Luna). O extrato da geoprópolis foi diluído em metanol e água Milli-Q 0,1% de ácido fórmico na concentração final de 30mg/mL e filtrada em filtro Nylon (0,22 µm, Ailcrom). O volume da amostra injetado no sistema foi de 25 µL, com fluxo de 1 mL/min e detecção UV-Vis em 254 nm. Os espectros de massas foram obtidos em modo negativo utilizando nitrogênio ultra-puro como gás de nebulização com fluxo de 12,0 L/min, pressão de 27psi, potencial de 4500V, temperatura de 325°C e fluxo para massas de 100 µl/min, em baixa resolução, na faixa de 100 a 1000 m/z. A identificação dos constituintes foi obtida com base na massa do íon molecular e dados de fragmentação.

4.7 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade pelo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil) tetrazólio) foi realizado no Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Rio de Janeiro. Para a realização dos experimentos utilizou a linhagem de câncer de ovário (ES2). A linhagem foi mantida em meio RPMI (Sigma, EUA) suplementado com 0,2% (m/v) de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen, EUA), 1% (v/v) de solução estabilizada de Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, EUA) em estufa com condições controladas de temperatura (37°C), com atmosfera de 5% de CO₂.

A linhagem foi plaqueada (1x10⁴ células/poço) em placas de 96 poços e, após 24h de cultivo, foi tratada com extrato da geoprópolis nas concentrações de 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL por 24h e 48h. Posteriormente as células foram incubadas com 20µL da solução de MTT (5 mg/mL) por 4h. As placas foram então centrifugadas a 450g e, para permitir a solubilização dos cristais de formazan, 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 538 nm, foi realizada em leitor de placas (MR-96 A, Bioclin, Brasil). Como controle negativo dos experimentos utilizou-se as células sem tratamento. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos das determinações de polifenóis, flavonoides totais e testes antioxidantes foram expressos como média e desvio padrão. A CE_{50} foi calculada por regressão linear obtida da relação entre concentração da amostra e atividade antioxidante. A viabilidade celular foi determinada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra é oriunda da Baixada Maranhense, cuja região é rica em espécies vegetais como, *Cydista aequinoctialis* (cipó-de-corda), *Desmodium incanum* (carrapicho-beiço-de-boi), *Malphigia glabra* (acerola), *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), *Mimosa pudica* (dormideira), *Pontederia cordata* (aguapé), entre outras (RIBEIRO; DE ALBUQUERQUE; DA LUZ, 2013, 2016) que são fontes de resinas vegetais utilizadas para a composição da geoprópolis.

A geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Pinheiro quando submetida a extração por maceração com etanol 70%, usando a relação hidromódulo 1:5, apresentou um rendimento extrativo de 12,60% com teores de fenóis e flavonoides, respectivamente, $7,27 \pm 0,26\%$ e $0,13 \pm 0,01\%$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Teores de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata*

Amostra*	Polifenóis Totais (%)	Flavonoides Totais (%)	DPPH CE_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	FRAP ($\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$)
EHGP	$7,27 \pm 0,26$	$0,13 \pm 0,01$	$265,91 \pm 0,29$	$1,10 \pm 0,25$

EHGP= Extrato hidroetanólico da geoprópolis da *Melipona fasciculata* Smith de Pinheiro
*resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3).

Cunha et al. (2009) encontraram rendimento de 9,89% em extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de Palmeirândia, utilizando os mesmos parâmetros de extração deste estudo, sendo inferior ao rendimento do extrato hidroetanólico de geoprópolis de Pinheiro.

O EHGP apresentou baixo teor de flavonoides. Segundo a legislação brasileira para classificação de própolis de *Apis mellífera*, é caracterizado como baixo, o teor de flavonoide até 1,0%. Em contrapartida, os teores de polifenóis excederam a quantidade mínima (0,50%) que é estabelecido pela mesma legislação (BRASIL, 2001).

Cunha et al. (2009) demonstraram variação dos teores de fenóis e flavonoides do extrato da geoprópolis da mesma espécie do município de Palmeirândia, região da Baixada Maranhense, respectivamente, de $7,36 \pm 0,003$ a $37,04 \pm 0,011$ e $0,04 \pm 0,002$ a $1,85 \pm 0,01$, corroborando com os nossos resultados.

A avaliação da atividade antioxidante do extrato através do sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi determinada por meio da concentração efetiva (CE_{50}), a concentração mínima para reduzir em 50% o DPPH inicial da reação. O EHGP apresentou atividade antioxidante pelo DPPH com CE_{50} de $265,91 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

O resultado da atividade antioxidante pelo método DPPH foi próximo ao valor de Silva et al. (2013), que avaliaram atividade antioxidante do extrato da geoprópolis de *Melipona seminigra* e encontraram CE_{50} de $234,3 \pm 4,0 \mu\text{g/mL}$.

Segundo Da Silva et al. (2013), a atividade antioxidante está diretamente correlacionada aos teores de fenóis e flavonoides totais. Os compostos fenólicos são capazes de interceptar a cadeia de oxidação de radicais livres através da doação de hidrogênio de suas hidroxilas fenólicas (RIGHI et al., 2011).

A avaliação da atividade antioxidante do extrato através do método FRAP foi determinado pela capacidade de redução do íon Fe^{3+} para Fe^{2+} na presença do TPZT em condições ácidas. A capacidade de redução férrica foi $1,10 \pm 0,25 \text{ mmol } Fe^{2+}/g$ (Tabela 1). O resultado encontrado é bem próximo de Batista et al. (2016) que tiveram resultado de $1,29 \pm 0,01 \text{ mmol } Fe^{2+}/g$ da capacidade de redução férrica de extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de Palmeirândia da região da Baixada Maranhense.

Alguns compostos fenólicos possuem a capacidade de quelar metais de transição, evitando que radicais livres se formem na presença de metais. Eles podem inibir a oxidação por metais e a formação de radicais de oxigênio, por coordenação com Fe^{2+} , aumentando a auto-oxidação de Fe^{2+} , ou formando complexos inativos, com interação mais fraca. O desencadeamento dessas reações de oxidação ocorre quando íons metálicos ativos como Cu^+ ou Fe^{2+} interagem com o H_2O_2 para formar o radical $OH\cdot$. O ferro e o cobre são metais de transição que possuem a capacidade de catalisar a formação de lesões oxidativas decorrentes da produção do radical OH (JOMOVA; VALKOB, 2011).

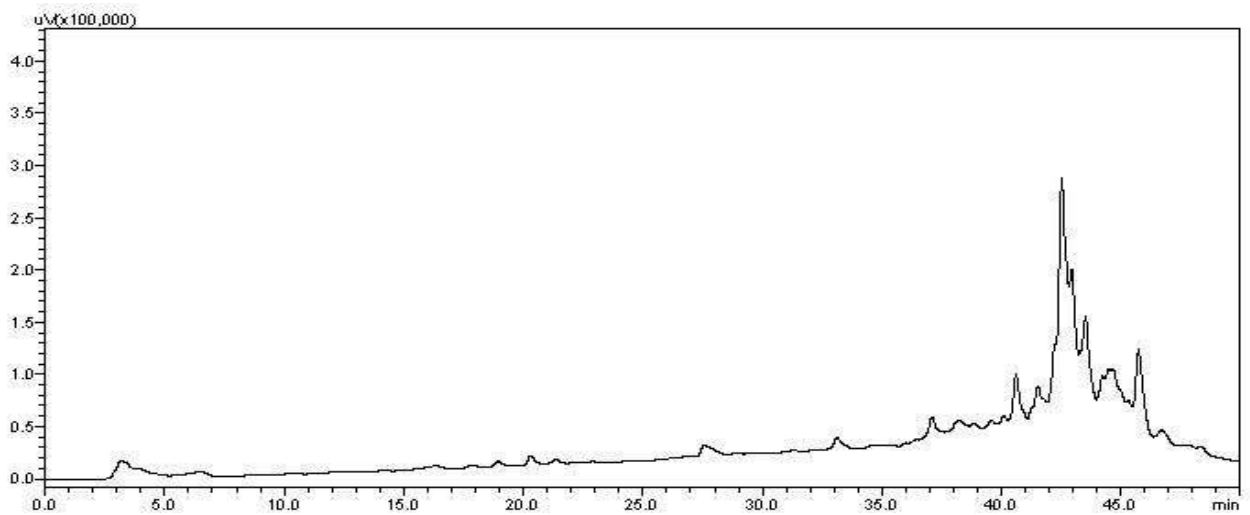
Segundo Mărghitas et al. (2009), os antioxidantes são considerados como possíveis agentes de proteção, reduzindo o dano oxidativo a importantes biomoléculas, como lipoproteína e DNA. O estresse oxidativo, consequência de um desequilíbrio entre a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) e antioxidantes no organismo, inicia uma série de eventos

bioquímicos prejudiciais que estão associados a diversos processos patológicos que podem levar a vários danos e doenças celulares.

Segundo Krishnamachary et al. (2002), as interações dos antioxidantes naturais com espécies reativas de oxigênio através da eliminação de radicais livres estão implicados no processo inflamatório, levando a um efeito profundo em processos de defesa e doenças relacionadas à angiogênese, como artrite reumatóide, psoríase, doença cardíaca ou câncer.

A análise por CLAE/UV-Vis demonstrou a predominância de compostos de baixa polaridade nos tempos de retenção a partir de 40 min (Figura 4).

Figura 4 – Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith



Também foi possível verificar a composição química do extrato hidroetanólico da geoprópolis a partir da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 5). A aplicação do anisaldeído sulfúrico revelou a presença de triterpenos através da observação de manchas em lilás (AGUIRRE et al., 2006).

Figura 5 – Cromatograma obtido por CCD de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de Pinheiro



Dutra et al. (2008) submeteram amostras da geoprópolis dos municípios de Arari, São João Batista e São Bento, da Baixada Maranhense a cromatografia em camada delgada, após revelar no UV e borrifar com AlCl_3 1%, constataram a presença de substâncias flavonoídicas.

Os constituintes do extrato da geoprópolis foram tentativamente identificados por similaridade de seus padrões de fragmentação com dados descritos na literatura (Tabela 2).

Foram identificados cinco compostos químicos: ácido glucônico e quatro compostos fenólicos do tipo flavonoides glicosilados: S-eriodictiol-6-C- β -D-glucopiranosídeo, narigenina-C-glicosídeo, isômero da narigenina-C-glicosídeo e hesperetina-7-O-ramnosídeo.

Tabela 2 – Compostos tentativamente identificados no extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* por CLAE/EM/EM

Composto	TR (min)	m/z [M-H]	MM	Fragmentos	Identificação
1	2.8	195	196	128 e 177	Ácido glucônico
2	18.2	449	450	430, 359 e 329	S-eriodictiol-6-C- β -D-glucopiranosídeo
3	19.1	433	434	313	narigenina-C-glicosídeo
4	20.2	433	434	415 e 313	isômero da narigenina-C-glicosídeo
5	22.9	449	450	303 e 405	hesperetina-7-O-ramnosídeo

Fonte: dados tratados da Central Analítica da USP (2019).

*RT=tempo de retenção. m/z= íon molecular. MM=massa molecular.

Araújo (2015) e Batista et al. (2016) conseguiram identificar ácido glucônico por cromatografia gasosa, além de outros compostos, como, carboidratos, triterpenos, ácido anarcádico e álcoois no extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* de Palmeirândia. Ribeiro (2017) identificaram ácido quínico, derivados de benzofenona, flavonoides-O-glicosilados e xantonas no extrato hidroetanólico da geoprópolis da mesma espécie do município de Santa Luzia do Paruá, Maranhão.

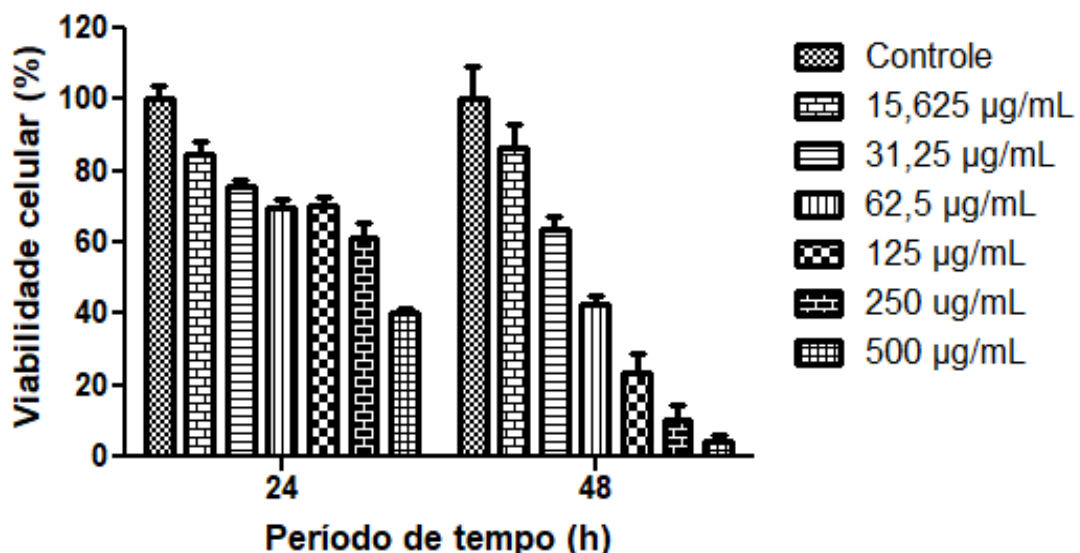
Righi et al. (2013) analisaram por cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos e de massas (CLAE/DAD/ESI/EM), a composição química de própolis produzida por *Apis mellifera* no Piauí e Goiás e demonstraram a presença de flavonas e flavonas glicosiladas, incluindo a narigenina-C-glicosídeo que também foi encontrada no extrato hidroetanólico da geoprópolis de Pinheiro.

Souza et al. (2018) identificaram compostos fenólicos na geoprópolis de *Melipona subnitida* Ducke (jandaíra), como galloil hexosídeos, ácido elágico, acil-(cinamoil/coumaroil)-hexosídeos, acil-(cinamoil/coumaroil)-galloil-hexosídeos e flavonóides (agliconas e O-glicosídeos acilados).

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* foi realizada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) que é baseado na medida do dano induzido pela droga no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT. As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ou NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) que reduzem o MTT para a formazan correspondente (MACIEL et al., 2002).

O extrato hidroetanólico da geoprópolis apresentou citotoxicidade dose-dependente e tempo-dependente na linhagem tumoral de câncer de ovário (ES2). Em 24h, a citotoxicidade foi mais expressiva na concentração de 500 µg/mL. No tempo de 48h, a viabilidade foi menor que 50% a partir de concentração de 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL (Figura 6).

Figura 6 – Viabilidade celular de câncer de ovário (ES2) depois da incubação da geoprópolis (15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL) por 24 e 48h, determinado pelo teste do MTT



Cunha (2017) avaliou a atividade antitumoral *in vitro* do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* frente às células de tumor de Erlich em todas as concentrações utilizadas e demonstrou que o extrato apresentou citotoxicidade para as células

MCF-7 nas maiores concentrações, havendo morte total das células na maior concentração (500 µg/mL) e diminuição da viabilidade celular para próximo de 50% nas concentrações de 250, 125 e 63 µg/mL.

De Mendonça et al. (2015) avaliaram a viabilidade celular de câncer de ovário (OVCAR-8) 72 h após a exposição a várias concentrações de extrato etanólico de própolis e observaram a atividade citotóxica significativa em uma concentração de 50 µg/mL. A viabilidade de OVCAR-8 exposta ao extrato não apresentou diferença significativa em comparação com aquela exposta à doxorrubicina, que é uma droga anticâncer padrão.

Os flavonoides glicosilados que foram identificados no extrato hidroetanólico da geoprópolis de Pinheiro de *Melipona fasciculata* Smith podem estar relacionados com a atividade antioxidante e antitumoral. Segundo Seydi et al. (2016), os polifenóis e flavonóides na própolis possuem efeitos antitumorais e quimiopreventivos diretos. A atividade anticarcinogênica dos flavonoides na própolis podem suprimir o crescimento do tumor inibindo angiogênese e indução de apoptose de células tumorais (SZLISZKA et al., 2011).

Os flavonoides têm sido caracterizados como inibidores de células cancerosas, por apresentarem propriedades farmacológicas conhecidas como antioxidantes, possivelmente controlando assim a proliferação celular e desempenhando o bloqueio da oncogênese por mecanismos que modulam enzimas da via metabólica carcinogênica (AMADO et al., 2011; HUNG et al., 2009).

Jansen (2015) relacionou atividade antioxidante com a atividade antitumoral e demonstrou que os extratos hidroetanólicos de própolis que apresentaram alta teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo DPPH e FRAP tiveram maior citotoxicidade em linhagem de melanoma de camundongo (B16F10). Segundo Frozza et al. (2013), os compostos fenólicos encontrados na própolis são conhecidos por possuírem capacidade antioxidante, e estas propriedades podem ter função essencial na atividade anticancerígena. Os compostos fenólicos são conhecidos por proteger a estabilidade do genoma, devido às suas diversas propriedades biológicas, incluindo a capacidade antioxidante (FERNANDES et al., 2014).

Segundo De Souza et al. (2013) e Libério et al. (2011), as atividades biológicas da geoprópolis estão relacionadas a sua composição química, que é dependente sobre a flora local, a espécie produtora de abelhas e o tipo de solo encontrado na região de produção deste produto.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Pinheiro demonstrou atividade antitumoral *in vitro* em linhagem celular de câncer de ovário (ES2).

Além disso, a geoprópolis apresentou teores de fenóis e flavonoides que podem estar relacionados com a atividade antioxidante.

Sugerimos que as classes de compostos identificadas no extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Pinheiro estão relacionados com as ações antioxidante e antitumoral

Estudos de isolamento e identificação de biomoléculas relacionados com a atividade antitumoral e ensaios toxicológicos são necessários para determinar a segurança desse produto que pode ser uma terapia alternativa/complementar para o câncer de ovário.

Sendo assim, a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith pode ser um produto natural promissor na busca de moléculas bioativas com potencial anticâncer e sua exploração pode favorecer o desenvolvimento econômico da meliponicultura no estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, M. C.; DELPORTE, C.; BACKHOUSE, N.; ERAZO, S.; LETELIER, M. E.; CASSELS, B. K.; NEGRETE, R. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 14, n. 16, p. 5673–5677. 2006.
- ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; SODRE, G. S.; FONSECA, A. A. O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. **Mensagem Doce**. v. 91, p. 2-8, 2007.
- AMADO, N. G. FONSECA, B. F.; CERQUEIRA, D. M.; NETO, V.; M.; ABREU, J. G. Flavonoids: potential wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Science**. v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.
- ARAÚJO, M. J. A. M. **Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith: ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu/SP, 2013.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; CONTI, B. J.; JÚNIOR, A. F.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**. v. 4, n. 1, p. 12-20, 2015.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 88-92, 2007.
- BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; DA SILVA, L. M.; ROMAGNOLI, G. G.; DE OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48-55, 2016.
- BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; CUNHA, M. S.; AMARAL, F. M. M.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão state, northeastern Brazil. **Acta Amazônica**, v. 46, n. 3, p. 315- 322, 2016.
- BATISTA, M. C. A. **Bioprospecção anti-helmíntica da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em testes *in vitro* com ovos e larvas de *Haemochus contortus* de pequenos ruminantes**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 3. **Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativa 2018**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal Food Technology**. v. 20, p. 1-7, 2017.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; DA SILVA, C. G. N.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. **Meliponicultura: perguntas mais frequentes sobre as abelhas sem ferrão-I**. 20 ed Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011. 41p.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**; 5. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia. p. 424-425, 2011.

CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, P. R. O.; ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, p. 1-6, 2013.

COELHO, G. R.; MENDONÇA, R. Z.; VILAR, K. D. S.; FIGUEIREDO, C. A.; BADARI, J. C.; TANIWAKI, N.; NAMİYAMA, G.; DE OLIVEIRA, M. I.; CURTI, S. P.; SILVA, P. E.; NEGRI, G. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

COLETTTO-SILVA, A. Captura de enxames de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) sem destruição de árvores. **Acta Amazônica**. v. 35, n. 3, p. 383-388, 2005.

CUNHA, M.S.; DUTRA, R.P.; BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B.; SANTOS, J.R.; NEIVA, V.A.; AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **Cadernos de Pesquisa**. v. 16, n. 3, p. 31-38, 2009.

CUNHA, M. S. **Composição química e atividade antitumoral de *Melipona fasciculata* Smith**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Maranhão. São Luís. 2017.

DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. DE C.; DE RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-9, 2013.

DA CUNHA, M.G.; ROSALEN, P.L.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J.A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**. v. 82, n. 3, p.190-194. 2016.

DA SILVA E. C. C.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ZILSE, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**. v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013.

DE MENDONÇA, I. C. G.; PORTO, I. C. C. DE M.; DO NASCIMENTO, T. G.; DE SOUZA, N. S.; OLIVEIRA, J. M. DOS S.; ARRUDA, R. E. DOS S.; MOUSINHO, K. C.; DOS SANTOS, A. F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; PAROLIA, A.; Barreto, F. S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

DE SOUSA, D. M. N.; OLINDA, R. G.; MARTINS, C. G. ABRANTES, M. R.; COELHO, W. A. C.; DA SILVA, J. B. A.; DE MORAIS, S. M.; BATISTA, J. S. Prospecção fitoquímica, toxicidade *in vitro* e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 134-40, 2015.

DE SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; DA SILVA, M. S.; SILVA, T. M. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**. v. 26, n. 22, p. 3279–3290, 2007.

DOS SANTOS, G. M.; ANTONINI, Y. The traditional knowledge on stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene-Nawe tribe in western Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p. 1-9, 2008.

DOS SANTOS, T. L. D.; QUEIROZ, R. F.; SAWAYA, C. A.; LOPEZ, B. G.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P.; RODRIGUES, A. C. B. C.; PAULA, V. F.; WALDSCHMIDT, A. M. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2247-2259, 2017.

DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; Rodrigo René de Oliveira MARQUES, M. C. P. C.; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, 2008.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal Agriculture Food Chemical**. v. 62, n. 12, p. 2549-2557, 2014.

DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; DA SILVA, M. C. P.; BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 29, p. 1-7, 2019.

FERNANDES, F. H. GUTERRES, Z. DA R. GARCEZ, W. S. LOPES, S. M. CORSINO, J. GARCEZ, F. R. Assessment of the (anti) genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v. 62, p. 20–26, 2014.

FERREIRA, J. M; FERNANDES-SILVA, C. C; SALATINO, A.; MESSAGE, D.; NEGRI, G. Antioxidant activity of a geopropolis from Northeast Brazil: Chemical characterization and likely botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-7, 2017.

FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; DE ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 709-15, 2012.

FREIRE, K.R.L.; LINS, A.C.S.; DÓREA, M.C.; SANTOS, F.A.R.; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, v. 17, p. 1652-1664, 2012.

FREITAS, B. M. Meliponíneos. In: **A vida das abelhas**. Fortaleza: Craveiro e Craveiro, 1999. (Livro em CD-ROM.).

FREITAS, M. O.; PONTE, F. A. F.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 19, n. 3, p. 532-535, 2008.

FROZZA, C. O. DA S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D. O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; PÊGAS, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**. v. 52, p. 137-142, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOLANDA, C. A.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S.; SOUZA, J. L.; ARAÚJO, M. J. A. M. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do cerrado maranhense. **Química Nova**, v. 35, p. 55-8, 2012.

HUNG, J. Y. HSU, Y. L.; KO, Y. C.; TSAI, Y. M.; YANG, C. J.; HUANG, M. S.; KUO, P. L. Didymin, a dietary flavo-noid glycoside from citrus fruits, induces fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**. v. 68, n. 3, p. 366-374, 2009.

JANSEN, C. **Própolis: fitoquímicos e atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal do Pelotas, Pelotas, 2015.

JOMOVA, K., VALKOB, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65-87, 2011.

KERR, W. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. **Informe Agropecuário**. v. 13, p. 15-27, 1987.

KRISHNAMACHARY, V.; LEVINE, L.H.; PARE, P.V. Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: a unified mechanism for quercetin radical scavenging. **Journal Agriculture Food Chemical**. v. 50, p. 4357-4363, 2002.

KWON, Y. Mecanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **OncoTargets and Therapy**. v. 9, p. 2007-2016, 2016.

LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B.C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; AZEVEDO, M. M. B.; VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; VERMELHO, A. B.; CARNEIRO, C. S.; Rodrigues, I. A. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. p. 6-8, 2018.

LEDERMANN, J. A.; KRISTELEIT, R. S. Optimal treatment for relapsing ovarian cancer. **Official Journal of the European Society for Medical Oncology**. v. 7, p. 218-222, 2010.

LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral

pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 11, n. 108, p. 1-10, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MĂRGHITAS, L.A., STANCIU, O.G., DEZMIREAN, D.S., BOBIȘ, O., POPESCU, O., BOGDANOV, S., CAMPOS, M.G. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania, **Food Chemistry**, v. 115, p. 878-883, 2009.

NOGUEIRA-NETO, P. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. São Paulo: Nogueirapes, 1997.

OLIVEIRA, L.P.G; CONTE, F.L.; CARDOSO, E.O; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; GOLIM, M.A; FELTRAN, G.S; ZAMBUZZ, W.F; SFORCIN, J.M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sciences**. v. 217, p. 81–90, 2019.

PALAZUELOS-BALLIVIÁN, J. M. P. **Abelhas nativas sem ferrão – Mýg**. São Leopoldo, Oikos, 2008.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biology Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, M. H. M.; DE ALBUQUERQUE, P. M. C.; DA LUZ, C. F. P. Pollen profile of Geopropolis samples collected of “Tiúba” (*Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith 1854) in areas of Cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 52, n. 2. p. 81-93, 2013.

RIBEIRO, M. H. M.; DE ALBUQUERQUE, P. M. C.; DA LUZ, C. F. P. Pollen profile of Geopropolis samples collected of “Tiúba” (*Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith 1854) in areas of Cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 3, p. 895–912, 2016.

RIBEIRO, M. H. M. **Caracterização química e fitogeográfica de geoprópolis das espécies de abelhas nativas do Maranhão**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

RIBEIRO-JUNIOR, J. A.; FRANCHIN, M.; CAVALLINI, M. E.; DENNY, C.; DE ALENCAR, S. M, IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-5, 2015.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the science of food and agriculture**. v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-15, 2013.

- SEYDI, E.; HOSSEINI, S.A.; SALIMI, A.; POURAHMAD, J. Propolis induce cytotoxicity on cancerous hepatocytes isolated from rat model of hepatocellular carcinoma: Involvement of ROS-mediated mitochondrial targeting. **PharmaNutrition**. v. 4, n. 4, p. 143-50, 2016.
- SILVA, J. B.; COSTA, K. M. F. M.; COELHO, W. A. C.; PAIVA, K. A. R.; COSTA, G. A. V.; SALATINO, A.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, J. S. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, n. 9, p. 874-880, 2016.
- SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390.
- SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. da C. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **Revista Fitos**. v. 3, n. 2, p. 26, 2007.
- SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. G.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A. SILVA, T. M. S. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**. v. 29, n. 6, p. 549–558, 2018.
- SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. **Oncology** (Jonhston, P. G., ed); Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132, 2001.
- SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; KRÓL, W. Ethanol extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**. v. 38, n. 4, p. 941-53, 2011.
- TORRES-GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ-RIVERA, P.; DUARTE-LISCI, G.; LÓPEZ-RAMÍREZ, Á.; CORREA-BENÍTEZ, A.; RIVERO-CRUZ, J. F. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. **Natural product research**. v. 30, n. 2, p. 237-240, 2016.
- VERA-LLONCH, M.; OSTER, G.; FORD, C. M.; LU, J.; SONIS, S. Oral mucositis and outcomes of autologous hematopoietic stem-cell transplantation following high-dose melphalan conditioning for multiple myeloma. **The Journal Supportive Oncology**. v. 5, n. 5, p. 231-5, 2007.
- VENTURIERI, G.C. **Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão**. Belém: Embrapa Amazônia: Oriental, 2004. 36p.
- VENTURIERI, G.C.; RAIOL, V.F.O.; PEREIRA, C.A.B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança-PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2003.
- VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão**. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2. ed. Brasil, 2018.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996. 384p.