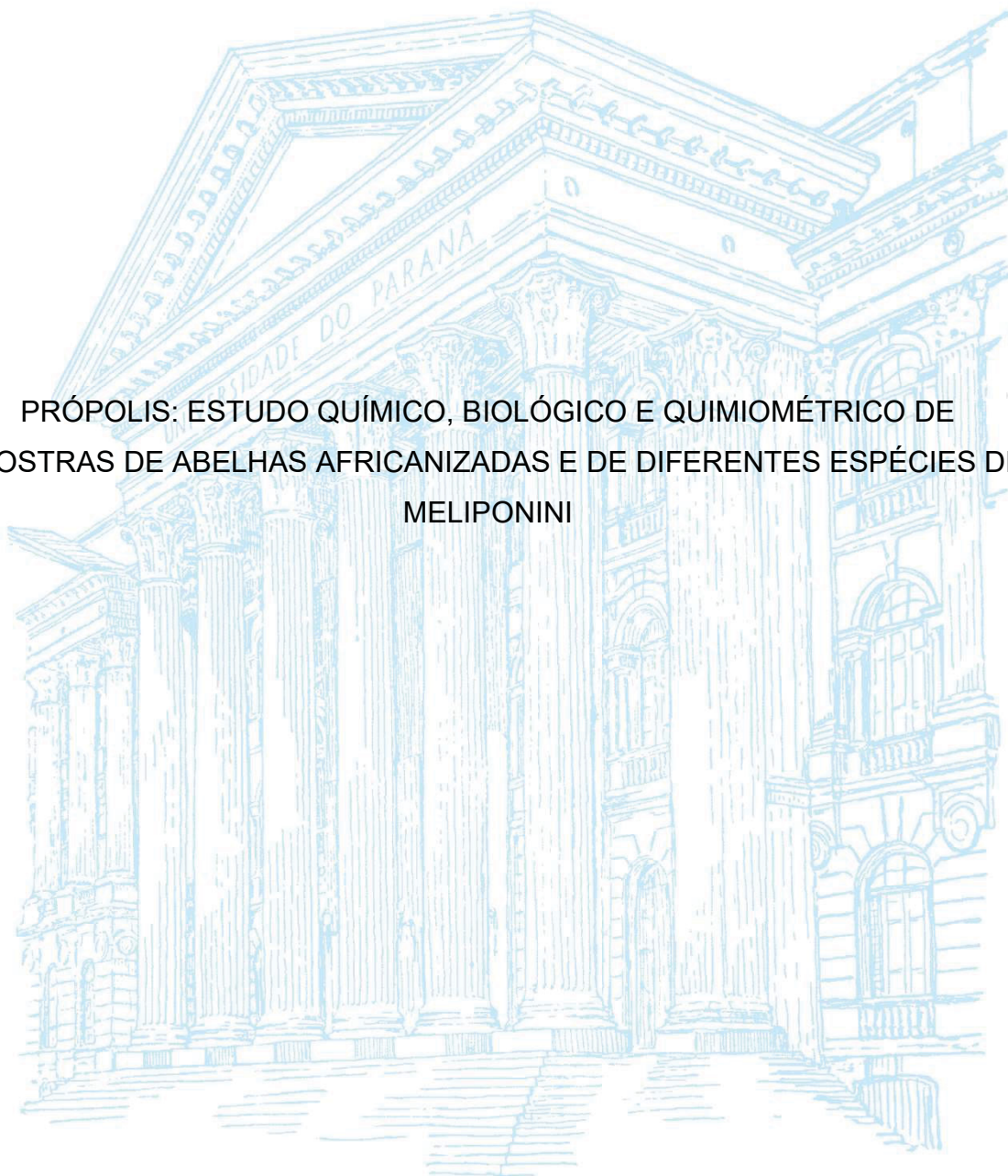


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONICA SUREK

PRÓPOLIS: ESTUDO QUÍMICO, BIOLÓGICO E QUIMIOMÉTRICO DE
AMOSTRAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
MELIPONINI



CURITIBA

2023

MONICA SUREK

PRÓPOLIS: ESTUDO QUÍMICO, BIOLÓGICO E QUIMIOMÉTRICO DE
AMOSTRAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
MELIPONINI

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, no curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza
Coorientadora: Profa. Dra. Karina Bettega Felipe
Coorientadora: Profa. Dra. Amanda Rabello Crisma

CURITIBA

2023

Surek, Monica

Própolis [recurso eletrônico] : estudo químico, biológico e quimiométrico de amostras de abelhas africanizadas e de diferentes espécies de meliponini / Monica Surek – Curitiba, 2023.

1 recurso online: PDF.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza

Coorientador: Profa. Dra. Karina Bettega Felpe

Coorientador: Profa. Dra. Amanda Rabelo Crisma

1. Abelhas. 2. Própolis. 3. Quimiometria. 4. Legislação. I. Souza, Wesley Mauricio de. II. Felpe, Karina Bettega. III. Crisma, Amanda Rabelo. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 595.799



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECTOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 43001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição de tese de Doutorado de **MONICA SUREK** intitulada: **PRÓPOLIS: ESTUDO QUÍMICO, BIOLÓGICO E QUIMIOMÉTRICO DE AMOSTRAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MELIPONINI**, sob orientação do Prof. Dr. **WESLEY MAURICIO DE SOUZA**, que após terem inquirido a autora e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A colação do título de doutora está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pelo banca e ao pleno atendimento das normas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2023.



WESLEY MAURICIO DE SOUZA
Presidente da Banca Examinadora




LAURO MERA DE SOUZA
Avaliador Externo (INSTITUTO PÉLÉ PELOUEN) PRÍNCIPE)



THAIS MARTINS GUIMARÃES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



PAULO CÉSAR GASPARINO
Avaliador Externo



JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família, que me deram forças durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus orientadores, pelo apoio, compreensão e ensinamentos;

Ao meu amigo e colega Alexandre de Fátima Cobre, pelo desenvolvimento dos modelos quimiométricos, amizade, apoio e incentivo;

Aos meliponicultores Harold Brand, Miguel Tarcizo Marques, Antônio Bataer Filho, Tony Teixeira de Lima, Célia Dreschel, Marcos Aparecido Gonçalves, Elwino Oscar Näser e demais presentes nas reuniões da Câmara Técnica de Meliponicultura do Estado do Paraná pelas contribuições, fornecimento de amostras, fotografias, transmissão de conhecimentos, amizade e incentivo;

Ao professor Roberto Pontarolo (UFPR), pela parceria nas análises cromatográficas e espectrométricas;

À professora Favízia Freitas de Oliveira (UFBA), pela parceria na identificação da espécie das abelhas;

À professora Thalita Gilda Santos (UFPR), por ter disponibilizado o laboratório de Farmacognosia para a análise dos compostos fitoquímicos;

Às professoras Márcia Beux (UFPR) e Wilma Aparecida Spinosa (UEL), pela amizade, apoio e incentivo;

Enfim, a todos que não foram mencionados e de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Os extratos de própolis são tradicionalmente utilizados na medicina popular e apresentam propriedades como antitumoral e antimicrobiana. No entanto, esses produtos são pouco explorados em associação com medicamentos utilizados na prática clínica. Ademais, a composição química complexa dificulta o controle de qualidade e autenticação desses produtos. Este estudo teve como objetivos avaliar a composição química de extratos de própolis de *Apis mellifera scutellata* e diferentes espécies de Meliponini e caracterizar sua citotoxicidade frente a células tumorais, efeitos antibacterianos e interferências nas ações da doxorrubicina e gentamicina. Além disso, objetivou investigar o potencial da espectroscopia de infravermelho médio (MIR) e análises quimiométricas para a autenticação das amostras de própolis. As análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Extratos de própolis foram submetidos à avaliação de citotoxicidade e sinergismo utilizando o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo e o sinergismo pelos ensaios *checkerboard* e *time-kill*. Os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais foram utilizados como parâmetros de qualidade de acordo com as diretrizes da legislação brasileira. Foi realizada espectroscopia de infravermelho acoplada à refletância total atenuada (ATR-IR) e um modelo quimiométrico foi desenvolvido e validado para discriminar e classificar as quatro amostras de própolis. A caracterização química revelou a presença de 63 compostos. Os extratos apresentaram citotoxicidade seletiva contra linhagens de células tumorais humanas. Extratos de própolis de mandaçaia e plebeia exerceram citotoxicidade sinérgica seletiva associada à doxorrubicina. Com exceção da tubuna, todos os extratos avaliados exibiram efeitos antibacterianos em cepas gram-positivas. Os extratos de mandaçaia e plebeia exerceram efeito sinérgico com a gentamicina, entretanto, apenas o extrato de mandaçaia exerceu efeito seletivo. O modelo de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostrou-se sensível e específico, podendo ser usado para o controle de qualidade dessas amostras de própolis para fins de autenticação. O própolis de plebeia apresentou o menor teor de fenólicos totais e flavonoides. Conforme sugerido pelo ATR-IR e confirmado pela determinação de fenólicos totais e flavonoides, apenas própolis verde, tubuna e mandaçaia atenderam aos critérios estabelecidos pela legislação brasileira para comercialização. Esses produtos naturais podem reduzir a ocorrência de efeitos adversos, resistência ou ambos, relacionados à doxorrubicina e gentamicina. O modelo quimiométrico desenvolvido neste estudo pode ser implementado como ferramenta para a autenticação das classes de própolis estudadas.

Palavras-chave: própolis; citotoxicidade; antibacteriano; quimiometria; legislação.

ABSTRACT

Propolis extracts are traditionally used in folk medicine and have properties such as antitumor and antimicrobial. However, these products are little explored in association with drugs used in clinical practice. In addition, the complex chemical composition makes quality control and authentication of these products difficult. This study aimed to evaluate the chemical composition of propolis extracts from *Apis mellifera scutellata* and different species of Meliponini and to characterize their cytotoxicity against tumor cells, antibacterial effects and interference in the actions of doxorubicin and gentamicin. Furthermore, to investigate the potential of mid-infrared spectroscopy (MIR) and chemometric analyzes for the authentication of propolis samples. Chromatographic and spectrometric analyzes were performed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Propolis extracts were evaluated for cytotoxicity and synergism using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Antimicrobial activity was performed by the broth microdilution technique and synergism by checkerboard and time-kill assays. The levels of phenolic compounds and total flavonoids were used as quality parameters according to the guidelines of Brazilian legislation. Infrared spectroscopy coupled to attenuated total reflectance (ATR-IR) was performed and a chemometric model was developed and validated to discriminate and classify the four propolis samples. Chemical characterization revealed the presence of 63 compounds. The extracts showed selective cytotoxicity against tumor cell lines. Mandaçaia and plebeia propolis extracts exerted selective synergistic cytotoxicity associated with doxorubicin. With the exception of tubuna, all extracts evaluated exhibited antibacterial effects on gram-positive strains. Mandaçaia and plebeia extracts had a synergistic effect with gentamicin; however, only the mandaçaia extract exerted a selective effect. The partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) model proved to be sensitive, specific and accurate, and can be used for quality control of these propolis samples for authentication purposes. Plebeia propolis had the lowest content of total phenolics and flavonoids. As suggested by the ATR-IR and confirmed by the determination of total phenolics and flavonoids, only green propolis, tubuna and mandaçaia met the criteria established by Brazilian legislation for commercialization. Propolis can be a source of antineoplastics and antibiotics. These natural products may reduce the occurrence of adverse effects, resistance, or both, related to doxorubicin and gentamicin. The chemometric model developed in this study can be implemented as a tool for the authentication of the studied propolis classes.

Keywords: propolis; cytotoxicity; antibacterial; chemometrics; legislation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ABELHAS ABORDADAS NESTE ESTUDO	26
FIGURA 2 - CROMATOGRAMAS DE INTENSIDADE DE PICO DE BASE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE EM UPLC/QTOF ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) EM IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i> EM MODO NEGATIVO (ESI-) E POSITIVO (ESI+)	50
FIGURA 3 – ÁCIDOS CINÂMICOS PRENILADOS DETECTADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E TUBUNA (CONTINUA)	54
FIGURA 4 – ÁCIDOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE, TUBUNA E MANDAÇAIA	56
FIGURA 5 – FLAVONOIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE, TUBUNA E MANDAÇAIA (CONTINUA)	57
FIGURA 6 – ÁCIDOS GRAXOS DETECTADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA E PLEBEIA (CONTINUA).....	59
FIGURA 7 – DITERPENOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA E PLEBEIA (CONTINUA)	61
FIGURA 8 – TRITERPENOS DETECTADOS NO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA.....	63
FIGURA 9 – LIPÍDIOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA E MANDAÇAIA (CONTINUA).....	64
FIGURA 10 - EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS HELA E MCCOY.....	71
FIGURA 11 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS MCF-7 E MCCOY	73
FIGURA 12 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS HELA E MCCOY.....	75

FIGURA 13 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS MCF-7 E MCCOY	77
FIGURA 14 - EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA, GENTAMICINA OU AMBOS COMBINADOS CONTRA <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) E <i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	87
FIGURA 15 - EFEITOS DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA, GENTAMICINA OU AMBOS COMBINADOS CONTRA <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) E <i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	88
FIGURA 16 - EFEITOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA OU MANDAÇAIA, OXACILINA, OU DOS EXTRATOS COMBINADOS COM O OXACILINA CONTRA <i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	90
FIGURA 17 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA OU MANDAÇAIA, VANCOMICINA, OU DOS EXTRATOS COMBINADOS COM VANCOMICINA CONTRA <i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	91
FIGURA 18 - EFEITOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA, VANCOMICINA, OU AMBOS COMBINADOS CONTRA <i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)	93
FIGURA 19 - ESPECTROS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE (EPM) NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) EM cm^{-1} OBTIDOS POR REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR)	117
FIGURA 20 - GRÁFICO DE <i>EIGENVALUE VERSUS</i> NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS	120
FIGURA 21 - GRÁFICO DE <i>SCORES</i> (AMOSTRAS) DO MODELO PCA PARA DISCRIMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS	121
FIGURA 22 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DE PC1 <i>VERSUS</i> NÚMERO DE ONDA NO MODELO PCA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	122
FIGURA 23 - GRÁFICO DE <i>LEVERAGE VERSUS</i> RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE <i>OUTLIER</i> DAS AMOSTRAS DE MANDAÇAIA	123

FIGURA 24 - GRÁFICO DE <i>LEVERAGE VERSUS</i> RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE <i>OUTLIER</i> DAS AMOSTRAS DE PLEBEIA	123
FIGURA 25 - GRÁFICO DE <i>LEVERAGE VERSUS</i> RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE <i>OUTLIER</i> DAS AMOSTRAS DE TUBUNA	123
FIGURA 26 - GRÁFICO DE <i>LEVERAGE VERSUS</i> RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE <i>OUTLIER</i> DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS VERDE.....	124
FIGURA 27 - ESCOLHA DO NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES NO MODELO PLS-DA DE ACORDO COM O MENOR RMSEC E RMSECV.....	124
FIGURA 28 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE MANDAÇAIA.....	126
FIGURA 29 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE PLEBEIA	126
FIGURA 30 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE TUBUNA	127
FIGURA 31 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS VERDE	127
FIGURA 32 - GRÁFICO DE VARIÁVEIS (NÚMERO DE ONDAS DO ESPECTRO MIR-ATR) IMPORTANTES RESPONSÁVEIS PELA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS NO MODELO PLS-DA.....	128
FIGURA 33 - GRÁFICO DE VARIÁVEIS (NÚMERO DE ONDAS DO ESPECTRO MIR-ATR) IMPORTANTES RESPONSÁVEIS PELA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS NO MODELO PLS-DA.....	129
FIGURA 34 - GRÁFICO DE VARIÁVEIS (NÚMERO DE ONDAS DO ESPECTRO MIR-ATR) IMPORTANTES RESPONSÁVEIS PELA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS NO MODELO PLS-DA.....	129
FIGURA 35 - CURVAS ROC DOS MODELOS PLS-DA PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	130

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DAS ABELHAS ANALISADAS NESTE ESTUDO (CONTINUA)	28
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS	37
TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR <i>ELECTROSPRAY</i> EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONTINUA)	42
TABELA 3 - ATIVIDADE CITOTÓXICA [CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (CI ₅₀)] ^a E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) ^b DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE.....	66
TABELA 4 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS.	81
TABELA 5 - RESULTADOS DO ENSAIO DE CHECKERBOARD COM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (CIF) E ÍNDICES CIF DA COMBINAÇÃO DE DOIS COMPOSTOS ENTRE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E ANTIBIÓTICOS CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS	86
TABELA 6 - AMOSTRAS USADAS PARA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE PLS-DA.....	110
TABELA 7 - PRINCIPAIS PICOS NA REGIÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) EM cm ⁻¹ DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE OBTIDOS VIA ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR) CONTENDO OS POSSÍVEIS GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS (CONTINUA).....	115
TABELA 8 - PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA RELATIVA E ACUMULADA DAS CINCO VARIÁVEIS LATENTES SELECIONADAS PARA A CALIBRAÇÃO DO MODELO PLS-DA	125
TABELA 9 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MODELO PLS-DA PARA A CLASSIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	131

TABELA 10 – TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS E PRÓPOLIS BRUTO (PB) DAS QUATRO ESPÉCIES DE ABELHAS.....	134
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PRÓPOLIS OBTIDOS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MELIPONINI	16
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 CÂNCER: DEFINIÇÃO, CAUSAS E TRATAMENTO	17
3.2 SINERGISMO DE QUIMIOTERÁPICOS COM PRODUTOS NATURAIS	19
3.3 INFECÇÃO BACTERIANA: DEFINIÇÃO, CAUSAS E TRATAMENTO	20
3.4 SINERGISMO DE ANTIMICROBIANOS COM PRODUTOS NATURAIS	22
3.5 ABELHAS	23
3.6 PRÓPOLIS	26
3.6.1 Composição química	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 PRODUTOS QUÍMICOS, SOLUÇÕES E MEIOS	33
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	33
4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS	34
4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR	35
4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo	35
4.4.2 Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazólio (MTT)	35
4.4.3 Avaliação do sinergismo entre extratos de própolis e a doxorubicina	36
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
4.5.1 Microrganismos	37
4.5.2 Ensaios antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo	38
4.5.3 Avaliação do sinergismo entre extratos de própolis e antimicrobianos	38
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	41
5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SELETIVA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM LINHAGENS CELULARES TUMORAIS	65

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SINÉRGICA SELETIVA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS COM DOXORRUBICINA	69
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS	80
5.5 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INTERAÇÃO EXERCIDO PELAS COMBINAÇÕES DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS A AGENTES ANTIMICROBIANOS	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA E POTENCIAL USO NA INDÚSTRIA DE PRÓPOLIS OBTIDOS DE ABELHAS-SEM-FERRÃO E PRÓPOLIS DO TIPO VERDE	97
7 OBJETIVOS.....	97
7.1 OBJETIVO GERAL	97
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	97
8 REVISÃO DE LITERATURA	98
8.1 CONTROLE DE QUALIDADE DO PRÓPOLIS E TÉCNICAS A SEREM APLICADAS PARA ESTA FINALIDADE	98
8.2 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	101
8.3 REGULAMENTAÇÃO DO USO E COMERCIALIZAÇÃO DO PRÓPOLIS.....	104
9 MATERIAL E MÉTODOS	107
9.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	107
9.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	107
9.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS.....	108
9.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	108
9.4.1 Pré-processamento e análise exploratória dos dados.....	108
9.4.2 Modelo PLS-DA e determinação da <i>Variable Importance in Projection</i> (VIP).....	109
9.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS.....	111
9.5.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais.....	111
9.5.2 Determinação do conteúdo de conteúdo de flavonoides.....	111
9.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	112
9.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	113
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
10.1 ANÁLISE QUÍMICA E ESPECTROSCÓPICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS	

10.2 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	119
10.2.1 Modelo PCA	119
10.2.2 Modelo PLS-DA.....	122
10.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	131
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
REFERÊNCIAS.....	138
ANEXO 1 – INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 03, DE 19-01-2001	160

1 INTRODUÇÃO

O câncer e as infecções bacterianas são considerados um grande desafio para a medicina. As células tumorais e bacterianas compartilham características muito semelhantes, como altas taxas de replicação, disseminação e rápido desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Os fármacos antitumorais são frequentemente usados em combinações como estratégia para superar os mecanismos de resistência e reduzir a toxicidade para as células não tumorais (SOO *et al.*, 2017). Além disso, a combinação de antibacterianos torna-se uma estratégia importante devido à escassez de novos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado (LIU *et al.*, 2017).

Ressalta-se, de maneira geral, que não existem muitos avanços com respeito às propriedades físico-químicas e atividades biológicas do própolis de abelhas-sem-ferrão (Meliponini), quando comparado ao vasto potencial biológico e econômico de própolis proveniente de abelhas melíferas (LAVINAS *et al.*, 2019).

Além disso, outros problemas estão relacionados à industrialização e comercialização de produtos apícolas e meliponícolas, incluindo o própolis, devido a ausência de legislações atuais e/ou falta de fiscalização para cumprimento das mesmas, além de questões relacionadas ao controle de qualidade desses produtos.

No Brasil, existem duas normativas que regulamentam a comercialização e industrialização do própolis: a Instrução Normativa nº 3 (2001) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta a identidade e as características necessárias para que o própolis bruto e extratos de própolis de *A. mellifera* possam ser comercializados em nível nacional e internacional (BRASIL, 2001) e a RDC Nº 24, de 14 de junho de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que regulamenta os produtos à base de própolis com finalidade terapêutica (BRASIL, 2011). Apesar da Instrução Normativa nº 3 (2001) não ser específica para a comercialização e industrialização de produtos meliponícolas, pode ser aplicada para este fim. Ainda, é importante salientar que, muitos produtos apícolas e meliponícolas, até mesmo aqueles destinados para fins terapêuticos, acabam sendo livremente comercializados apenas com a aprovação do MAPA, mediada pela Instrução Normativa nº 3 (2001), a qual está desatualizada e não leva em consideração aspectos relacionados à possível toxicidade destes produtos, assunto de extrema relevância, visto que muitos desses produtos são destinados para consumo humano.

Ainda, como mencionado anteriormente, outro problema relacionado à comercialização e industrialização de própolis é a realização de um controle de qualidade efetivo para os mesmos, devido à dificuldade de padronização dos extratos a serem comercializados. Própolis se tratam de misturas complexas, cuja composição química qualitativa e quantitativa varia não apenas conforme as fontes botânicas usadas para sua produção, como também em relação às características das espécies produtoras. Logo, uma grande variabilidade pode ser observada, até mesmo em relação ao mesmo tipo de própolis, dificultando a padronização do controle de qualidade (KASOTE, BANKOVA, VILJOEN, 2022).

Desta forma, faz-se necessária a realização de estudos mais aprofundados sobre a qualidade, potencial biológico e de produção, coleta e manejo de própolis de abelhas-sem-ferrão, possibilitando a implementação de seu uso (CORDEIRO; MENEZES, 2014). Além disso, salienta-se que estes estudos devem ser associados a elaboração de uma legislação adequada, que permita a comercialização e industrialização dos mais diversos tipos de produtos obtidos a partir do própolis, sem comprometer a saúde da população. Assim, este trabalho tem como objetivos: 1- caracterizar a ação de própolis de abelhas da tribo Meliponini sobre a ação citotóxica e antimicrobiana de fármacos usados na clínica para o tratamento do câncer e de infecções; 2- a partir da caracterização química dos própolis desenvolver um método quimiométrico para validação e autenticação com finalidade de uso industrial, além de verificar sua possível comercialização e industrialização a partir dos critérios que utilizam parâmetros de doseamento fenólicos e flavonoides totais presentes na legislação brasileira.

Para melhor compreensão por parte dos leitores, este trabalho foi dividido em dois capítulos. No CAPÍTULO 1 a amostra de própolis verde de abelha africanizada (*Apis mellifera*) e amostras de três espécies diferentes de Meliponini (abelhas-sem-ferrão) foram caracterizadas quimicamente. Foram avaliadas também a citotoxicidade em células tumorais humanas e em uma linhagem celular não tumoral murina e os potenciais efeitos sinérgicos com o agente quimioterápico doxorrubicina, além da atividade antibacteriana e dos potenciais efeitos sinérgicos com antimicrobianos usados na terapêutica. No CAPÍTULO 2 foi apresentada a caracterização dos extratos de própolis pelo método de espectroscopia de infravermelho acoplada à reflectância total atenuada (ATR-IR), o doseamento do teor de fenólicos e flavonoides totais e dados da capacidade antioxidante para verificar seu potencial uso industrial de acordo

com a legislação brasileira para comercialização e industrialização, além do desenvolvimento e validação de um método quimiométrico com a finalidade de autenticar os extratos de própolis.

CAPÍTULO 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PRÓPOLIS OBTIDOS DE ABELHAS AFRICANIZADAS E DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MELIPONINI

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química, a citotoxicidade e a atividade antibacteriana de diferentes própolis obtidos de abelhas africanizadas e das espécies *Scaptotrigona bipunctata*, *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Plebeia remota* pertencentes à tribo Meliponini.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente os extratos de própolis;
- Avaliar a citotoxicidade seletiva dos extratos de própolis em diferentes linhagens celulares, incluindo linhagens tumorais e não tumorais;
- Determinar o tipo de efeito (sinérgico, aditivo ou antagônico) exercido pelos extratos de própolis associados ao quimioterápico doxorubicina na viabilidade celular;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis;
- Avaliar o tipo de efeito (sinérgico, aditivo ou antagônico) induzido pelos extratos de própolis combinados a agentes antimicrobianos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER: DEFINIÇÃO, CAUSAS E TRATAMENTO

O câncer, também chamado de neoplasia ou tumor maligno, compreende um grande grupo de doenças que podem começar em diversos órgãos ou tecidos do corpo. Ocorre quando células anormais crescem descontroladamente além de adquirirem capacidade invasiva e se espalharem para outros órgãos. Esse processo é chamado de metástase e constitui uma das principais causas de morte por câncer (WHO, 2022a).

O câncer é uma das principais causas de mortalidade, tendo sido responsável por cerca de 10 milhões de mortes, ou um em cada seis óbitos, no ano de 2020 (WHO, 2022b). Os tumores de pulmão, próstata, câncer de cólon e reto, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto tumores de mama, cólon e reto, pulmão, colo do útero e tireoide são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2022a). As causas são multifatoriais, podendo ser hereditárias e ambientais. Famílias com múltiplos casos de câncer de início precoce e que afetam várias gerações, fornecem evidências claras de que fatores hereditários são importantes causas de câncer. No entanto, a maioria dos cânceres são causados por exposições a fatores ambientais, tais como: agentes ocupacionais, tabaco, infecções virais, fatores naturais e agentes infecciosos não virais (BLACKADAR, 2016).

O desenvolvimento do câncer é controlado por alterações genéticas e epigenéticas. O acúmulo de defeitos genéticos como translocações, mutações, deleções e amplificações são as principais causas de transformação de células não tumorais em células neoplásicas. Por outro lado, a epigenética abrange uma ampla gama de mudanças hereditárias na expressão gênica que não resultam de uma alteração na própria sequência de DNA, como metilação e a modificação de histonas. No entanto, há evidências que demonstram que a epigenética desempenha um papel fundamental na carcinogênese e na progressão do tumor (SACHAN; KAUR, 2015).

Três classes de genes estão intimamente envolvidas no desenvolvimento do câncer: proto-oncogenes, oncogenes e genes supressores de tumor. Na célula não tumoral, existem os proto-oncogenes, que podem ser transcritos como fatores de crescimento, transdutores de sinais e fatores de transcrição nucleares. As mutações em proto-oncogenes podem promover sua ativação em oncogenes, os quais são

responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular. Na célula não tumoral, além dos proto-oncogenes, existem também os genes supressores de tumor, que desempenham um papel importante no crescimento normal e diferenciação da célula e bloqueiam o desenvolvimento do câncer. A falta ou a inativação desses genes, devido a ocorrência de mutações nos mesmos, acarretam em câncer (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020).

Diferentes insultos agem continuamente nas células levando a alterações genéticas, epigenéticas, nos números e arranjos cromossômicos e em interações heterotípicas que, ao longo da carcinogênese, passam por ciclos de seleção clonal evolutiva levando ao desenvolvimento de células tumorais competentes, que são traços característicos do câncer. Várias características ou *hallmarks* definem o câncer, sendo eles: crescimento seletivo e vantagem proliferativa; resposta ao estresse alterada, favorecendo a sobrevivência, vascularização, invasão e metástase; alterações metabólicas; criação de um microambiente inflamatório que favorece o desenvolvimento e progressão tumoral, além da modulação imune. Tal é a importância desses *hallmarks* na biologia tumoral, que estes são potenciais alvos específicos para o tratamento do câncer (FOUAD; AANEI, 2017).

Atualmente, há diversas modalidades de tratamento para o controle do câncer, citadas a seguir: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia direcionada, transplante de células-tronco e medicina de precisão. Historicamente, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são as principais formas de tratamento (CHAMBERLIN *et al.*, 2019; AMJAD; CHIDHARLA; KASI, 2022).

O uso de agentes quimioterápicos é comumente associado a indução de efeitos colaterais, devido a ação inespecífica desses fármacos. Apesar dos quimioterápicos terem como alvo a síntese de DNA e a expressão de proteínas em células tumorais, acabam atuando também em células não tumorais. Assim, o índice terapêutico que leva à toxicidade é muito estreito. Dentre os principais tipos celulares não tumorais atingidos pela ação de agentes quimioterápicos, merecem destaque aqueles que se multiplicam rapidamente, como por exemplo, de células da medula óssea, do trato gastrointestinal e dos folículos pilosos (AMJAD; CHIDHARLA; KASI, 2022).

Os efeitos colaterais mais comuns associados ao uso desses agentes incluem: mielossupressão, mucosite, náusea, vômito, diarreia, alopecia, fadiga, esterilidade, infertilidade e reações à infusão. Além disso, há um risco aumentado de infecções devido à imunossupressão (AMJAD; CHIDHARLA; KASI, 2022).

Outro problema, relacionado à quimioterapia, refere-se ao desenvolvimento de resistência, que se trata da capacidade inata e/ou adquirida das células tumorais de se evadirem dos efeitos promovidos pelos quimioterápicos (HOLOHAN *et al.*, 2013; HOUSMAN *et al.*, 2014).

A resistência à quimioterapia pode surgir devido a vários fatores relacionados ao hospedeiro ou ao tumor, como mutações alvo adquiridas durante o tratamento, aumento da expressão das proteínas alvo, inativação de vias pró-apoptóticas, inibição de mecanismos de reparo de DNA, transição epitelial-mesenquimal, ativação de vias relacionadas à sobrevivência e proliferação celular, e regulação positiva de transportadores de efluxo presentes na superfície de células tumorais (HOLOHAN *et al.*, 2013; HOUSMAN *et al.*, 2014).

3.2 SINERGISMO DE QUIMIOTERÁPICOS COM PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais podem ser amplamente definidos como qualquer composto derivado de uma fonte viva. Estes, ou seus derivados, são fontes de 33% dos medicamentos desenvolvidos contra o câncer entre os anos de 1981 e 2014 (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Com potencial efetivo de direcionamento a tumores e menor toxicidade em tecidos não tumorais, os produtos naturais surgiram como potenciais agentes antineoplásicos, podendo ser administrados isoladamente ou em combinação com agentes quimioterápicos (TUORKEY, 2015; LAW *et al.*, 2016). Na sua maioria, atuam como agentes quimiopreventivos e sinérgicos, potencializando a atividade antitumoral e ao mesmo tempo, diminuindo a toxicidade associada à quimioterapia (SAK, 2012; PATRA *et al.*, 2021). Ainda, em vários estudos que demonstram o sinergismo de produtos naturais *in vitro* e *in vivo* com medicamentos contra o câncer, tem sido observada seletividade e/ou diminuição da resistência tumoral (COTE *et al.*, 2015; CHENG; YANG; SHYUR, 2016).

A curcumina e o resveratrol são polifenóis provenientes da dieta, que surgiram como potentes candidatos quimioterápicos durante os últimos anos devido às suas fortes propriedades antioxidantes. Além da grande quantidade de investigações que demonstram sua atividade citotóxica e antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*, esses compostos são uns dos poucos que foram submetidos a ensaios clínicos (CHOUDHARI *et al.*, 2020; PATRA *et al.*, 2022). Em combinação com agentes

quimioterápicos como docetaxel, paclitaxel, doxorubicina e cisplatina, esses dois compostos mostraram um grande potencial antineoplásico sem demonstrar efeitos colaterais significativos (SINGH *et al.*, 2019). Além disso, a curcumina e o resveratrol mostraram ação quimioprotetora e redução da resistência aos medicamentos (CHOUDHARI *et al.*, 2020; PATRA *et al.*, 2021; PATRA *et al.*, 2022).

No entanto, ressalta-se a importância de se avaliar com cautela se a associação de produtos naturais com agentes antineoplásicos será benéfica, uma vez que o uso de combinações não aprovadas de medicamentos e remédios não comprovados pode levar à indução de efeitos colaterais graves e toxicidade que pode comprometer a vida do paciente em tratamento (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018).

3.3 INFECÇÃO BACTERIANA: DEFINIÇÃO, CAUSAS E TRATAMENTO

Infecção é o termo que define a entrada e desenvolvimento de um agente infeccioso (por exemplo, bactéria) em um ser humano ou animal, quer esta entrada e instalação se transforme ou não em uma doença. Já por doença infecciosa entende-se o processo causado por um agente infeccioso específico ou seu produto tóxico que resulta da transmissão desse agente ou de seus produtos de uma pessoa, animal ou reservatório infectado para um hospedeiro susceptível. Tal transmissão pode ocorrer de maneira direta ou indireta, sendo esta última mediada por um hospedeiro intermediário vegetal ou animal, vetor ou ambiente inanimado (BARRETO; TEIXEIRA; CARMO, 2006).

Os patógenos bacterianos podem causar doenças em seus hospedeiros através de vários mecanismos. A maneira mais comum é por dano tecidual ou celular durante a replicação, geralmente com o auxílio da produção de toxinas. Isso permite que a bactéria patogênica possa alcançar novos tecidos ou se evadir das células em que se multiplicou. Algumas toxinas bacterianas estão entre os venenos mais mortais conhecidos e incluem a toxina botulínica e a tetânica. Alguns patógenos bacterianos se beneficiam da reação imune do hospedeiro para se espalhar dentro de um hospedeiro infectado ou aumentar sua transmissão para outros não infectados. *Vibrio cholerae*, por exemplo, desencadeia uma forte resposta inflamatória na mucosa intestinal, levando à diarreia aquosa e garantindo sua liberação no ambiente e, portanto, infecção de outros hospedeiros (BALLOUX; VAN DORP, 2017).

O ambiente externo geralmente é o local onde o agente bacteriano e o hospedeiro interagem, e a infecção é adquirida. Como mencionado anteriormente, as bactérias podem ser transmitidas aos seres humanos através do ar, água, alimentos ou vetores vivos. Os macros ou microambientes também podem desempenhar um papel na disseminação de bactérias. Certos ambientes, como hospitais e prisões, abrigam tipos específicos de organismos. Algumas bactérias são endêmicas em certas regiões geográficas e raras ou inexistentes em outras (DORON; GORBACH, 2008).

A maioria das bactérias são classificadas como gram-positivas ou gram-negativas, com base nas características de sua parede celular, observadas ao microscópio ótico após a aplicação de colorações, um procedimento chamado coloração de gram, que foi desenvolvido em 1882 por Hans Christian Gram (DORON; GORBACH, 2008).

As bactérias gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática cercada por uma malha resistente e rígida chamada parede celular. Em contraste, as bactérias gram-negativas possuem uma parede celular fina que é cercada por uma segunda membrana lipídica chamada membrana externa (ME). O espaço entre a ME e a membrana citoplasmática é denominado periplasma. A ME é uma camada protetora adicional em bactérias gram-negativas e impede que muitas substâncias entrem na bactéria. No entanto, essa membrana contém canais chamados porinas, que permitem a entrada de várias moléculas, como alguns fármacos (HAUSER, 2015). A parede celular é uma camada resistente que dá à bactéria uma forma característica e a protege de estresses osmóticos e mecânicos. A membrana citoplasmática impede que os íons fluam para dentro ou para fora da célula e mantém os componentes citoplasmáticos e bacterianos em um espaço definido. Clinicamente, uma das principais diferenças entre organismos gram-positivos e gram-negativos é que as bactérias gram-negativas tendem a produzir uma endotoxina que pode causar destruição tecidual, choque e morte. As duas classes de bactérias também diferem em suas suscetibilidades a antibióticos (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017), substâncias que atuam inibindo o crescimento microbiano ou levando à morte do microrganismo. Os antibióticos são amplamente utilizados não apenas no tratamento de infecções agudas e crônicas, mas também como profilaxia (KIRMUSAOĞLU; GAREAYAGHI; KOCAZEYBEK, 2019).

Um agente antimicrobiano ideal deve atuar no organismo infectante, mas não nas células hospedeiras, ou seja, deve ser seletivo para o patógeno. Quatro locais principais na célula bacteriana são alvos de antibióticos porque são suficientemente diferentes das células humanas. Estes são: a parede celular, a membrana celular, a via sintética do ácido nucleico e o ribossomo. (ENGELKIRK; BURTON, 2006; DORON; GORBACH, 2008).

Algumas bactérias são naturalmente resistentes a certas classes de antibióticos, seja porque não apresentam seu alvo de atuação, seja porque são impermeáveis ao medicamento. Outras são naturalmente susceptíveis a estes fármacos, porém desenvolvem resistência por meio de uma variedade crescente de mecanismos dentre os quais podem se citar: alteração no sítio alvo; alteração no acesso ao local alvo (pela diminuição da permeabilidade ou bombeamento do antibiótico para fora da célula) e produção de enzimas que inativam o antibiótico (DORON; GORBACH, 2008).

O uso de antibióticos pode gerar diversos efeitos adversos, incluindo reações alérgicas, efeitos tóxicos em órgãos-alvo, infecção subsequente por organismos resistentes a antibióticos e infecções por *Clostridioides difficile* (BASSETTI *et al.*, 2013). Por fim, é importante ressaltar que a toxicidade relacionada aos antimicrobianos resulta principalmente da administração de alta dose desses fármacos, do uso a longo prazo dos antibióticos ou da baixa tolerabilidade a esses medicamentos. Normalmente ela ocorre em pacientes com determinadas condições especiais, tais como disfunção renal (ROUVEIX, 2003).

3.4 SINERGISMO DE ANTIMICROBIANOS COM PRODUTOS NATURAIS

A resistência antimicrobiana emergiu como uma das principais ameaças à saúde pública do século XXI e representa uma grande ameaça à saúde humana em todo o mundo. Houve uma estimativa de 4,95 milhões de mortes associadas à resistência antibacteriana em 2019, incluindo 100 mil mortes atribuíveis somente ao *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Estima-se que a resistência antimicrobiana poderá levar a óbito 10 milhões de pessoas por ano até 2050 (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). Portanto, a utilidade dos antibióticos disponíveis no mercado para o tratamento de infecções bacterianas está cada vez mais precária, visto o aumento das taxas de resistência, aliada a taxas reduzidas do desenvolvimento de novos antimicrobianos. Como resultado, cepas

bacterianas multirresistentes, extensivamente resistentes e pan-resistentes a antibióticos agora são frequentemente encontradas. Isso leva a temores de uma “era pós-antibiótica”, na qual muitas infecções bacterianas serão intratáveis (HAUSER; MECSAS; MOIR, 2016).

Nesse sentido, as interações sinérgicas de produtos naturais e fitoquímicos com antibióticos e outros medicamentos clinicamente importantes é uma ferramenta recente e eficaz para o manejo da multirresistência bacteriana. Os benefícios da utilização de uma “terapia combinada”, que usa uma associação de um produto natural e um antibiótico contra patógenos resistentes objetiva não apenas reduzir a resistência aos antibióticos, bem como aumentar a eficácia dos antibióticos existentes, tratar infecções mistas e prevenir o surgimento de microrganismos resistentes (MARZOOG, 2013; SADEER; MAHOMOODALLY, 2021).

Corroborando as informações supracitadas, tem sido demonstrado que agentes fitoquímicos, como artemisina, resveratrol e berberina, quando coadministrados com antibióticos de diversas classes, e por diversos mecanismos, têm evitado a manifestação do fenótipo de resistência contra diferentes tipos de bactérias (CHEESMAN *et al.*, 2017).

3.5 ABELHAS

As abelhas são domesticadas pelo ser humano desde a Antiguidade. É um dos grupos de animais domesticados mais economicamente importantes. Além da importância econômica associada à produção de mel, geleia real e própolis, as abelhas possuem papel determinante na polinização de muitas espécies vegetais, preservando a diversidade de plantas floríferas e assegurando a produção mundial de alimentos (TAUTZ, 2010).

As abelhas pertencem ao filo Arthropoda e estão inseridas na classe Hexapoda (Insecta). Dentro dessa classe, estão agrupadas na ordem Hymenoptera. Entre os animais que também compõem essa ordem, estão as vespas e formigas, caracterizadas também pela organização social. Atualmente, a classificação biológica das abelhas segue a seguinte sequência: subordem Apocrita, superfamília Apoidea, família Apidae, subfamília Apinae, com as espécies sociais distribuídas nas tribos Apini, Meliponini e Bombini (NOLL, 2002; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). A tribo Apini compreende as conhecidas abelhas melíferas, cujas espécies do gênero *Apis*

são as principais representantes (SFORCIN *et al.*, 2017). A tribo Meliponini compreende as abelhas-sem-ferrão e a tribo Bombini as mamangavas (ENGEL; RASMUSSEN, 2020).

A abelha africanizada *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (FIGURA 1 – A), é um polihíbrido obtido pelo cruzamento da subespécie europeia *A. mellifera mellifera* Linnaeus, 1758, originalmente introduzida no Brasil para a produção de mel em meados do século XIX e a subespécie africana *A. mellifera scutellata* Lepeletier, 1836, importada em 1956 para melhorar a produtividade (PEDRO, 2014).

Os meliponídeos, também conhecidos como abelhas-sem-ferrão ou indígenas, são o maior grupo de abelhas eussociais do mundo. Mais de 600 espécies foram descritas e estão distribuídas por todas as áreas tropicais e subtropicais do globo. Eles são encontrados na América do Sul, América Central, sul da América do Norte, África, Sudeste Asiático e no norte da Oceania (HRNCIR *et al.*, 2016). Mais de 200 espécies em 29 gêneros estão distribuídas em todo o Brasil. Segundo Pedro (2014), cerca de 89 espécies são endêmicas no Brasil, o que corresponde a aproximadamente 20% do número total de abelhas-sem-ferrão neotropicais. Entre os gêneros com maior número de espécies conhecidas estão: *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona*, *Scaptotrigona* e *Trigonisca* (LAVINAS *et al.*, 2019).

A *Plebeia remota*, conhecida popularmente como mirim-guaçu, é uma abelha pequena e não agressiva, que mede aproximadamente de 6 a 7 mm de tamanho e possui a coloração do corpo escura, com pilosidade clara. Evolutivamente, localiza-se em um ramo filogenético mais primitivo, em relação às outras abelhas sociais. Produz própolis de consistência muito viscosa, acumulada em montículos, e usado emergencialmente, quando ameaçada, para imobilizar os invasores. É encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná (WITTER; BLOCHTEIN, 2009; CPT, 2022a).

A mirim-guaçu nidifica em ocos de árvores e em barrancos e o ninho é construído com discos de cria dispostos horizontalmente. Para fixar as estruturas, a abelha constrói pilares de cerume, formando uma interessante trama (FIGURA 1 – B). No inverno, nas regiões frias, costuma interromper a postura e entrar em estado de diapausa (dormência). Os potes de alimento que elas produzem são semelhantes a um grão de uva, onde é armazenada pequena quantidade de mel bem fluido e ácido, além de pólen (WITTER; BLOCHTEIN, 2009; CPT, 2022a).

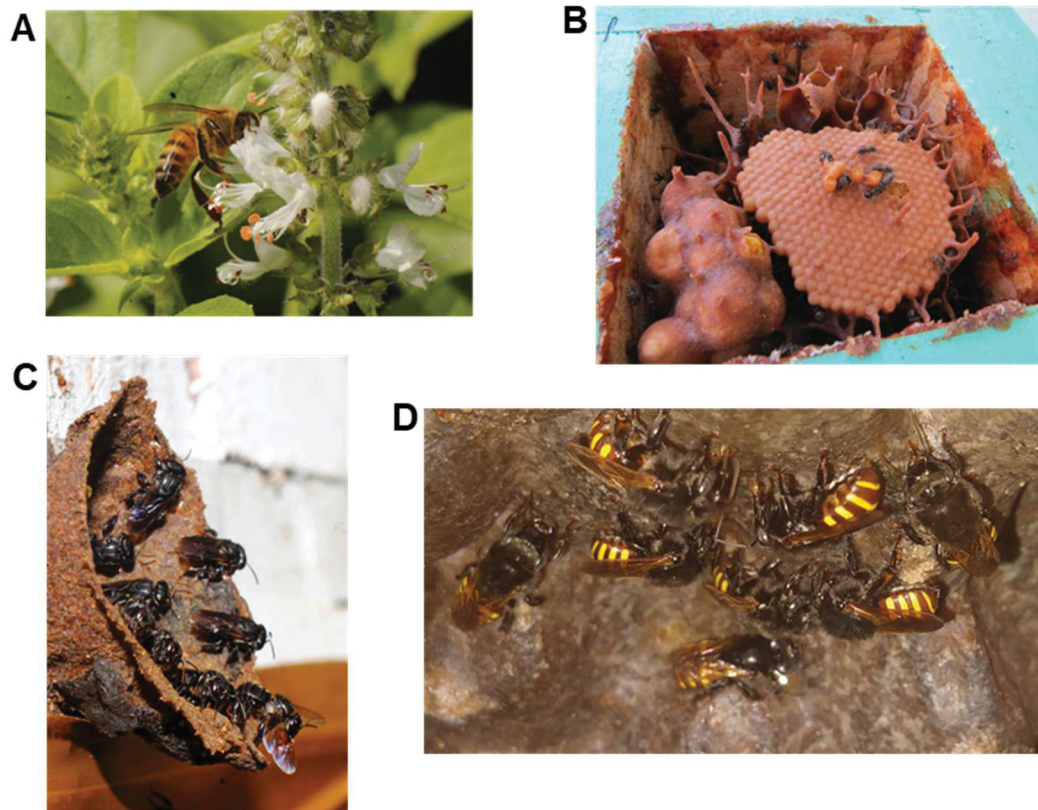
A *Scaptotrigona bipunctata* é popularmente conhecida como tubuna. É uma abelha bastante agressiva que, ao ser ameaçada, mordisca sua vítima com suas mandíbulas. Essa espécie possui coloração negra e brilhante, com o abdômen com 2 pontos ou uma listra na cor prata. No Brasil, é encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (WITTER; BLOCHTEIN, 2009; CPT, 2022b).

A entrada do ninho da abelha tubuna possui forma de funil ou trombeta e é construída com cerume escuro (FIGURA 1 – C). Os discos de cria são construídos helicoidalmente ou horizontalmente, podendo ser estes circundados com potes de mel e pólen que atingem em torno de 2,5 a 3,0 cm de altura. A colônia de *S. bipunctata* pode alcançar uma população de 2.000 a 50.000 abelhas (WITTER; BLOCHTEIN, 2009; CPT, 2022b).

A *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* é popularmente conhecida como mandaçaia. Apesar de ser considerada uma abelha mansa, costuma repelir os intrusos com um movimento bastante intenso ao redor do possível inimigo, chegando a mordiscá-lo. É uma abelha de cor negra, tendo em seu abdômen quatro listras amarelas brilhantes transversais contínuas e mede de 8 a 12 mm (FIGURA 1 – D). Devido ao seu tamanho robusto, possui melhor controle da temperatura corpórea, o que lhe permite viver em regiões mais frias. No Brasil, é encontrada nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (WITTER; BLOCHTEIN, 2009; MONTEIRO, 2022).

A mandaçaia constrói seus ninhos em ocós de troncos de árvores, numa altitude mediana. A entrada do ninho é construída com geoprópolis e geralmente na parte externa do orifício de entrada, podem ser observados sulcos radiais convergentes, os quais tem como função controlar a entrada das abelhas no ninho, fazendo com que apenas uma abelha por vez, seja capaz de adentrar por este orifício. O ninho geralmente tem a forma de discos de cria sobrepostos e é construído no sentido horizontal. Estas abelhas constroem também potes ovais para armazenar mel e pólen, os quais medem cerca de 3 a 5 cm de altura, por 2,5 cm de diâmetro, e são ligados entre si. Sua colmeia possui uma população bem menor, não chegando a ultrapassar 2.000 abelhas (WITTER; BLOCHTEIN, 2009; MONTEIRO, 2022).

FIGURA 1 - ABELHAS ABORDADAS NESTE ESTUDO.



NOTA: A – *A. mellifera scutellata*; B – colmeia de *P. remota* com abelhas, disco de cria, potes de mel e pólen e pilares de cerume; C – entrada em forma de trombeta da colmeia de *S. bipunctata*; D – abelhas *M. quadrifasciata quadrifasciata* com as características quatro listras amarelas transversais contínuas. FONTE: Elwino Oscar Näser (A – C); Tony Teixeira de Lima (D) – Acervo pessoal.

3.6 PRÓPOLIS

O própolis é um material resinoso, e que possui uma composição *in natura* complexa: 30% de ceras; 55% de resinas e bálsamos; 10% de óleos voláteis e 5% de pólen. Trata-se de um material de forte propriedade adesiva, sendo produzido a partir de secreções de galhos, flores e folhas (WOISKY; SALATINO, 1998). Algumas espécies de Meliponini acrescentam fibras vegetais, sementes e terra ao própolis, formando o produto conhecido como geoprópolis, o qual é incorporado na estrutura da colméia, como previamente descrito (CUNHA *et al.*, 2009), sendo adicionado na construção das células de cria para evitar a perda da resistência mecânica causada pelo aumento de temperatura. A temperatura no interior da colmeia também é controlada pela utilização do própolis na vedação de locais em que passam correntes de ar. Por possuir propriedades antissépticas, o material resinoso também pode ser usado nas células para garantir a proteção das larvas contra infecções fúngicas e

bacterianas. Ainda, com o objetivo de se protegerem de um invasor que não pode ser retirado da colméia, bem como evitarem a contaminação da mesma com microrganismos, as abelhas podem realizar um processo chamado de "mumificação". Neste processo, após matarem tal invasor com ferroadas ou imobilizá-lo, as abelhas utilizam o própolis para revestir o corpo do invasor, evitando dessa forma que microrganismos derivados da decomposição possam contaminar a colmeia (TAUTZ, 2010).

O própolis não traz apenas benefícios para as abelhas. Em relação ao seu uso em seres humanos, existem relatos de que tal produto era utilizado pelo homem como remédio desde 300 a.C., sendo suas atividades curativas identificadas por médicos romanos e gregos. Os primeiros egípcios também utilizavam o própolis para preservar seus cadáveres da decomposição e para curar feridas. Na China, o própolis era reconhecido como um remédio anticancerígeno e anti-infeccioso, além de ter sido utilizado de maneira eficaz para o tratamento de feridas durante a Segunda Guerra Mundial. O própolis é utilizado popularmente como um agente anti-inflamatório, anticancerígeno ou imunomodulador na medicina asiática e como agente antimicrobiano na América do Sul (MORENO *et al.*, 1999; PADMAVATHI *et al.*, 2006; NINA *et al.*, 2015). No Brasil, comunidades indígenas como os Tapirapés, Xavantes e Karajás usam o própolis para tratar problemas de pele, garganta e dores gástricas (MODRO *et al.*, 2009).

Dentre as propriedades biológicas já estudadas e comprovadas estão as atividades: antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral), antitumoral, imunomoduladora, anti-inflamatória e cicatrizante (SFORCIN, 2016).

Salienta-se que a escolha do solvente para preparação do extrato de própolis é muito importante, pois diferentes solventes solubilizam e extraem compostos distintos, influenciando diretamente na atividade biológica do produto. Logo, diversos extratos de própolis estão disponíveis comercialmente, mas os mais utilizados popularmente são o hidroetanólico, o etanólico, o aquoso e o metanólico (CUNHA *et al.*, 2004).

Maiores detalhes sobre a composição química, bem como aspectos da atividade antibacteriana e citotóxica do própolis, focos desse trabalho, estão descritos a seguir.

3.6.1 Composição química

Quanto à composição química, o própolis verde de *A. mellifera* já foi bastante caracterizado (CARVALHO *et al.*, 2011; SZLISZKA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2016), enquanto que em relação ao própolis (geoprópolis) de abelhas-sem-ferrão ainda há poucos estudos relatados.

No QUADRO 1 estão apresentados os principais compostos químicos já encontrados em amostras de própolis verde de *A. mellifera*, propolis de *S. bipunctata* e geoprópolis de *M. quadrifasciata*. Quanto ao própolis de *P. remota*, até o presente momento, não foi encontrado nenhum estudo que relate a caracterização química.

QUADRO 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DAS ABELHAS ANALISADAS NESTE ESTUDO (CONTINUA).

Tipo de própolis e abelha	Classe química	Compostos identificados	Referências
Própolis verde de <i>A. mellifera</i>	Ácidos fenólicos	Ácido <i>p</i> -cumarico, ácido cafeico, ácido ferúlico	MACHADO <i>et al.</i> , 2016; SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
		Ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquinico	MACHADO <i>et al.</i> , 2016;
		Ácido cafeoilquinico, ácido dicafeoilquinico, ácido tricafeoilquinico, ácido dimetilcafeoilquinico, ácido dimetildicafeoilquinico	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
	Flavonoides	Canferida, isoramnetina	MACHADO <i>et al.</i> , 2016; SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
		Diidrocanferida, (3S)-Vestitona, Pinobancsina-5-metil-eter, Quercetina-dimetil-eter, Betuletol	MACHADO <i>et al.</i> , 2016;
		Naringenina, canferol, hesperitina, sacuranetina, isosacuranetina, pinocembrina	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013

QUADRO 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DAS ABELHAS ANALISADAS NESTE ESTUDO (CONTINUAÇÃO).

	Ácidos prenilados cinâmicos	Artepilina C, drupanina	MACHADO <i>et al.</i> , 2016; SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
		2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano; ácido 3,4-Dihidroxi-5-prenilcinamico, ácido (3-4-Hidroxi-3-metil-2-butenil-4-hidroxi-5-prenil) cinâmico, ácido 3-Hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromane-6-propenoico, ácido 3-Prenyl-4-dihidrocinamoiloxicinâmico, ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenilfenil}-2-propenoico	MACHADO <i>et al.</i> , 2016;
		Bacarina	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
	Terpenoides	Ácido agático; ácido agático 15-metil éster; ácido 15-Acetoxi cupressico	MACHADO <i>et al.</i> , 2016;
Própolis de <i>S. bipunctata</i>	Flavonoides	Vicenina-2; Vicenina-1; Vicenina-3	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
	Terpenoides	Ácido (4R,5R,9R,10R)-13-hidroxipodocarp-8(14)-en-19-oico	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
	Triterpenoides	Triterpeno relacionado a α -amirina ou β -amirina	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
	Ácidos graxos	Não identificado	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
	Alcaloides	Lelobanonolina; 2-[6-(2-hidroxi-propil)-1-metil-[2]piperidil]-1-feniletanona; Norlobelanidina; Norlobelina; Lobelina ; Lobelanidina	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018

QUADRO 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DAS ABELHAS ANALISADAS NESTE ESTUDO (CONTINUAÇÃO).

Geoprópolis de <i>M. quadrifasciata</i>	Ácidos fenólicos	Ácido gálico, ácido <i>p</i> -cumárico	RUBINHO <i>et al.</i> , 2019; TORRES <i>et al.</i> , 2018
		Ácido elágico	RUBINHO <i>et al.</i> , 2019
		Ácido- <i>p</i> -hidroxi-benzoico, ácido siríngico	DOS SANTOS, C. M. <i>et al.</i> , 2017
	Flavonoides	Rutina, quercetina	TORRES <i>et al.</i> , 2018
		Aromadendrina, naringenina, metil-aromadendrina,	DOS SANTOS, C. M <i>et al.</i> , 2017; RUBINHO <i>et al.</i> , 2019
		Metil-naringenina, Luteolina-metil-eter, Quercetina-3-metil-eter	RUBINHO <i>et al.</i> , 2019
		2 -hidroxinaringenina, 7-O-metil aromadendrina; naringenina	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018; TORRES <i>et al.</i> , 2018
		5-hidroxi-4,7-dimetoxiflavona	TORRES <i>et al.</i> , 2018
	Ácidos prenilados cinâmicos	Artepilina C metil éter	TORRES <i>et al.</i> , 2018
	Terpenoides	ácido abieta-8,11,13,15-tetraen-18-oico; ácido abiético; ácido hidroxidehidroabietico; ácido 7-oxidehidroabietico, pinusecarp, Nemorosina ou Inumaquiol D	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018

QUADRO 1 - PRINCIPAIS COMPOSTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DAS ABELHAS ANALISADAS NESTE ESTUDO (CONCLUSÃO).

		Ácido junicedrico ou salvicina; inumaquiol D; ácido isocuprêssico; ácido agatálico; ácido 15-oxolabda-8(17), 13Z-diene19-oico ou ácido (15-oxolabda- (17),13E-dien-19-oico; ácido 15-agatico metil ester; ácido trans-comúnico ou pimárico; hinoquiol ou 3b-hidroxitotarol ou totara-8,11,13-triene-7a,13-diol; ácido angustanoico A	TORRES <i>et al.</i> , 2018
		Ácido kaurenoico, ácido ent-15 β -(3- metilbutanoiloxi)-16-kauren-19-oico, ácido ent-15 β -hidroxi-16-kauren19-oico	VELIKOVA <i>et al.</i> , 2000
	Polifenólicos	Cumaroilgaloil-hexosideo, Digaloilcumaroil-hexosideo, Cinamoilgaloil-hexosideo; Digaloilcinamoil-hexosideo; Dicumaroil-hexosideo; Dicumaroilgaloil-hexosideo; Cinamoilcumaroil-hexosideo; Cinamoilcoumaroilgaloil-hexosideo	RUBINHO <i>et al.</i> , 2019; TORRES <i>et al.</i> , 2018
		4-O-(6"-O-p-cumaroil-d-glucopiranosil)-p-ácidocumarico, 6-O-cinamoil-1-O-p-cumaroil-d-glucopiranosideo	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
		Galocatequina; Epigalocatequina, Epicatequinagalato, Epigalocatequinagalato	TORRES <i>et al.</i> , 2018
	Estilbenos	(E)-4-(3-metil-2-buten-1-il)- 3,30 ,5-trihidroxi-40 -methoxistilbeno ou (E)-2- (3-metil-2-buten-1-il)-30 ,40 , 5-trihidroxi-3-methoxistilbeno	TORRES <i>et al.</i> , 2018

FONTE: A autora (2022).

A atividade antibacteriana do própolis pode estar relacionada com a ação direta deste produto sobre o microrganismo, bem como com a estimulação do sistema imunológico do indivíduo contra o patógeno em questão (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Existem vários mecanismos através dos quais própolis podem exercer efeito antimicrobiano ao atuarem diretamente sobre bactérias: aumentando a permeabilidade da parede celular do microrganismo e causando ruptura da mesma, interferindo na produção de trifosfato de adenosina (ATP) e diminuindo a mobilidade bacteriana (SFORCIN, 2016; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Já foi demonstrado que tanto os extratos de própolis quanto compostos isolados dos mesmos podem afetar os processos-chave relacionados ao desenvolvimento e progressão do câncer, como proliferação celular, apoptose, angiogênese, invasão e metástase. Além disso, tem sido relatado que própolis e seus componentes podem afetar o microambiente tumoral, bem como sensibilizar as células neoplásicas a ação de quimioterápicos. Por fim, ensaios clínicos têm demonstrado que própolis podem ser utilizados por pacientes em quimioterapia e radioterapia para reduzir os efeitos colaterais dessas abordagens terapêuticas (FORMA; BRYŚ, 2021).

Embora tenham sido descritos efeitos benéficos de própolis em células tumorais e em pacientes, a utilização desses extratos demonstra algumas limitações que devem ser consideradas, uma vez que apresentam potencial alergênico e podem causar problemas gástricos (NYMAN *et al.*, 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUTOS QUÍMICOS, SOLUÇÕES E MEIOS

Acetonitrila e etanol (grau HPLC) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Hessen, Alemanha). Ácido fórmico (98%), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), cloridrato de doxorubicina, ampicilina sódica, oxacilina sódica e cloridrato de vancomicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água ultrapura foi preparada usando um sistema de purificação Merck Millipore Milli-Q (Bedford, MA, EUA). O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de alta glucose, meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI), soro fetal bovino (SFB), solução tampão salina fosfato (PBS 1x) e solução de penicilina-estreptomicina foram adquiridos da Gibco (Grand Island, NY, EUA). O sulfato de gentamicina foi adquirido da Amresco (Solon, OH, EUA). O ágar Mueller-Hinton, o caldo Mueller Hinton II e o caldo de infusão cérebro-coração (BHI) foram obtidos de BBL-BD (Sparks, MD, EUA).

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Amostras de própolis bruto (PB) foram coletadas em outubro de 2018 no estado do Paraná (Brasil). Própolis verde de *A. mellifera scutellata* (Lepeletier, 1836) foi coletado na cidade de Ibaiti (23°54'32" S, 50°15'18" W), enquanto as amostras de abelhas-sem-ferrão *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836 - tubuna) e *Melipona (Melipona) quadrifasciata quadrifasciata* (Lepeletier, 1836 - mandaçaia) foram coletadas em Santo Antônio da Platina (23°17'32" S, 50° 05'07" W). Por fim, o própolis de *Plebeia remota* (Holmberg, 1903 – plebeia, mirim-guaçu) foi coletado em Curitiba (25°30'35" S, 49°15'30" W).

As espécies de abelhas das quais foram coletadas as amostras de própolis foram identificadas no Laboratório de Bionomia, Biogeografia e Sistemática de Insetos (BIOSIS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), no Campus Ondina em Salvador (Bahia), sob supervisão da Dr^a Favízia Freitas de Oliveira.

Este projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) do Ministério do Meio Ambiente sob o registro nº. AABAA56, previamente à sua execução.

Os extratos de própolis mole (EPM) foram preparados em triplicata por maceração de 30 g de PB com 300 mL de etanol absoluto por 72 h, tendo sido realizadas três agitações diárias. A seguir, a mistura foi centrifugada a 1800 g por 15 min e o sobrenadante armazenado a -20 °C. Os resíduos obtidos foram remacerados pela adição de 300 mL de etanol, conforme mencionado anteriormente, e uma nova centrifugação foi realizada (1800 g por 15 min). Em seguida, os resíduos foram descartados e os sobrenadantes reunidos e deixados a -20 °C *overnight* para precipitação da cera residual. Após nova centrifugação (1800 g por 15 min) para retirada da cera, os sobrenadantes foram combinados e concentrados, usando rota-evaporador a 40 °C, até completa eliminação do solvente, dando origem aos EPM. A partir dos EPM, foram preparadas soluções estoques de extratos de 1 mg/mL em etanol e 100 mg/mL em DMSO, as quais foram filtradas em membrana de 0,22 µm e armazenadas a -30 °C para a realização dos experimentos. Os experimentos químicos foram realizados a partir do estoque obtido pela diluição dos extratos em etanol, já os ensaios biológicos foram realizados com os estoques preparados pela diluição dos extratos em DMSO.

4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

A metodologia utilizada baseou-se em Cisilotto *et al.* (2018), com modificações. Os compostos presentes nos extratos de própolis mole (EPM) foram detectados utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) H-ClassAcquity (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa *time-of-flight* híbrido quadrupolo Xevo G2-S, Waters Co. (Milford, MA, EUA; UPLC - espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS)) com ionização por *electrospray* (ESI) operado em modo de ionização positiva e negativa.

A fase estacionária usada na análise foi uma coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) mantida a 40 °C, enquanto a fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A fase móvel foi eluída utilizando um modo gradiente, detalhado a seguir.

O programa de gradiente foi executado a uma taxa de fluxo de 300 µL/min no seguinte esquema: 0,0-15,0 min, 5% B; 15,0-20,0 min, 95% B; 20,0-20,1 min, 95-5% B; e 20,1-25,0 min, 5% B. O volume de injeção foi de 5 µL.

Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de m/z 100-1200 no modo MS^E e a espectrometria de massas em tandem (MS/MS). A tensão capilar foi ajustada em 3 kV e 2 kV nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente. A voltagem do cone foi de 40 kV, enquanto o nitrogênio foi usado como cone e gás de dessolvatação. Já o argônio foi usado como gás de colisão. A fonte e a temperatura do gás de dessolvatação foram fixadas em 150 °C e 500 °C, respectivamente. O fluxo do gás do cone foi de 50 L/h e do gás de dessolvatação de 800 L/h.

Todos os dados foram adquiridos utilizando-se o software MassLynx™ NT4.1 (Waters Co., Milford, MA, EUA). Massa exata foi obtida usando leucina encefalina como *lockmass* a uma taxa de fluxo de 20 μ L/min. Os compostos foram identificados com base na massa exata (erro < 5 ppm), na fragmentação característica e comparando-se os espectros com dados reportados na literatura.

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

4.4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Como modelo experimental foram utilizadas as células das linhagens MDA-MB-231 (carcinoma humano de mama triplo negativo), MCF-7 (carcinoma humano de mama responsivo a hormônios), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HRT-18 (adenocarcinoma colorretal humano) e McCoy (fibroblastos não tumorais de camundongo) comercialmente obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ - Brasil).

Todas as linhagens foram cultivadas em uma incubadora a 37 °C, atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade em meio RPMI-1640, exceto a linhagem MCF-7, que foi cultivada em meio DMEM alta glucose. Ambos os meios foram suplementados com SFB a 10%, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL.

4.4.2 Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazólio (MTT)

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) de acordo com Mosmann (1983), com modificações. As células foram semeadas em placa de 96 poços (2 x 10³ células/poço) em meio RPMI 1640 ou DMEM e incubadas por 24 h sob condições controladas (37

°C e atmosfera de 5% de CO₂) para adesão celular. Em seguida, as linhagens foram expostas ao EPM em diferentes concentrações (10-250 µg/mL) pelo período de 72 h. As células do controle negativo foram tratadas com DMSO (0,25%). O quimioterápico doxorrubicina (0,003125–1,856 µg/mL) foi usado como controle positivo.

Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS por três vezes, e incubadas com MTT (0,5 mg/mL) durante 2 h. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de DMSO (100 µL/poço). A absorbância das amostras foi mensurada a 570 nm em um leitor de microplacas (Multiskan FC -ThermoScientific, MA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes. Os resultados foram expressos como concentração inibitória média (CI₅₀), calculadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).

O índice de seletividade (IS) foi determinado conforme estabelecido por Badisa *et al.* (2009), conforme a EQUAÇÃO 1.

EQUAÇÃO 1 - $IS = CI_{50} \text{ do EPM na célula não-tumoral} / CI_{50} \text{ do EPM na célula tumoral}$

Nesse trabalho, para um extrato ser considerado seletivo, foi aceito um valor de $IS > 1$ (BADISA *et al.*, 2009).

4.4.3 Avaliação do sinergismo entre extratos de própolis e a doxorrubicina

O efeito da combinação dos extratos de própolis (EPM) com doxorrubicina sobre a viabilidade celular foi avaliado utilizando o ensaio do MTT, conforme mencionado no item 4.4.2.

Para a execução dos ensaios, foi utilizada a linhagem celular tumoral mais susceptível a cada extrato, bem como células McCoy. As células foram tratadas com diversas concentrações de doxorrubicina (0,0004–232 ng/mL) e uma única concentração do extrato de própolis, a qual variou para cada linhagem celular, uma vez que se aplicou concentração referente ao valor de CI₅₀ determinada para cada linhagem tumoral.

O efeito da interação dos extratos de própolis e o quimioterápico doxorrubicina foi avaliado pelo método de Chou e Talalay (CHOU, 2010), por meio da determinação do índice combinatório (IC) de cada tratamento, os quais foram calculados utilizando-se o *software* Compusyn (Compusyn Inc., Paramus, NJ, EUA). O tipo de interação

das combinações de cada tratamento foi definido tendo como base os seguintes valores de IC: IC < 1,0 foi considerado sinergismo, IC = 1,0 foi considerado indução de efeito aditivo e IC > 1,0 foi considerado antagonismo (CHOU, 2010).

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Microrganismos

As bactérias gram-negativas e gram-positivas usadas nos experimentos e suas respectivas características e especificações estão descritas na TABELA 1.

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS.

Espécie	ATCC	Característica
<i>Escherichia coli</i>	25922	-----
<i>Escherichia coli</i>	35218	Estirpe produtora de β -lactamase
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	-----
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	Estirpe produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-----
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	-----
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	Enterococo resistente à vancomicina (VRE) e resistente a aminoglicosídeos de alto nível (HLAR)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Estirpe sensível à meticilina (MSSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591	Estirpe resistente à meticilina (MRSA)

NOTA: ATCC – American Type Culture Collection.

FONTE: A autora (2022).

As cepas foram armazenadas em glicerol a -80 °C, reativadas em caldo BHI e cultivadas em ágar Mueller-Hinton, exceto para *E. coli* (ATCC 35218) e *K. pneumoniae* (ATCC 700603), as quais foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton acrescidos de 100 μ g/mL de ampicilina e *E. faecalis* (ATCC 51299), que foi cultivado em ágar Mueller-Hinton acrescido de 4 μ g/mL de vancomicina.

4.5.2 Ensaio antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo

A atividade antimicrobiana foi avaliada primeiramente pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (CLSI, 2012). Para a execução deste ensaio, aplicaram-se 100 µL dos EPM, diluídos em caldo Mueller Hinton II em diversas concentrações (3,9 - 1000 µg/mL), em placa de 96 poços com fundo em U. O inóculo bacteriano foi preparado em salina 0,85% a partir de uma cultura bacteriana em ágar Mueller-Hinton cultivada *overnight*, com uma turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi então diluída na proporção 1:20 ($\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL) e 10 µL da mesma foram adicionados a cada poço. Os agentes antimicrobianos gentamicina (0,03 – 1000 µg/mL), oxacilina (0,0075 - 256 µg/mL) e vancomicina (0,125 - 512 µg/mL) foram usados como controles positivos. Para obtenção do controle negativo, os microrganismos foram tratados com DMSO a 1%.

Após incubação em estufa por 18 h a 35 ± 1 °C, foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), definida como a menor concentração de EPM que inibiu o crescimento bacteriano quando observada a olho nu. Os EPMs foram classificados de acordo com sua atividade antibacteriana em: alta, quando apresentaram CIM < 100 µg/mL; moderada, quando apresentaram CIM na faixa de 100 - 500 µg/mL; baixa, quando apresentaram CIM entre 500 a 1000 µg/mL e inativos quando apresentaram CIM > 1000 µg/mL (PESSINI *et al.*, 2003).

4.5.3 Avaliação do sinergismo entre extratos de própolis e antimicrobianos

O tipo de interação resultante da combinação dos EPM aos agentes antimicrobianos foi avaliado primeiramente usando o método de *checkerboard* (WHITE *et al.*, 1996). Neste teste, os microrganismos foram tratados simultaneamente com diferentes concentrações de EPM (1 - 1000 µg/mL) e dos agentes antimicrobianos gentamicina (0,031 – 16 µg/mL), oxacilina (0,25 – 64 µg/mL) e vancomicina (0,016– 128 µg/mL) em uma placa de 96 poços, nas mesmas condições de inoculação e incubação utilizadas para a determinação da CIM (subseção 4.5.2). A concentração inibitória fracionada (CIF) e o índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) de cada combinação foram calculados de acordo com as EQUAÇÕES (2-4).

EQUAÇÃO 2 - $CIF \text{ do EPM} = CIM \text{ do EPM aplicado em combinação ao agente antimicrobiano} / CIM \text{ do EPM aplicado isoladamente}$

EQUAÇÃO 3 - $CIF \text{ do antimicrobiano} = CIM \text{ do antimicrobiano aplicado em combinação ao EPM} / CIM \text{ do antimicrobiano aplicado isoladamente}$

EQUAÇÃO 4 - $ICIF = CIF \text{ do EPM} + CIF \text{ do antimicrobiano}$

O tipo de interação exercido pelas combinações foi determinado pelos valores de ICIF, onde um $ICIF \leq 0,5$ foi indicativo de sinergismo; valores de $0,5 < ICIF \leq 4$ foi considerado ausência de interação e, por fim, valores de $ICIF > 4$ representam ocorrência de antagonismo.

O efeito sinérgico das combinações mais promissoras foi confirmado usando o método de *time-kill* (WHITE *et al.*, 1996). Neste ensaio, os EPM e os agentes antimicrobianos, isolados e em combinação, foram testados contra as bactérias, em uma concentração de um quarto da CIM de ambos.

O teste foi realizado com um inóculo de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL em um volume final de 30 mL. Os frascos de Erlenmeyer contendo os microrganismos foram agitados em uma incubadora com agitação orbital CE-725 (Cienlab, Campinas, Brasil) a 2,5 Hz e incubados a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 h.

Amostras coletadas no momento da incubação (tempo 0), bem como nos intervalos de tempo de 4, 18 e 24 h após a agitação em condições controladas, foram diluídas de forma seriada ($10^{-5} - 10^{-1}$) em solução salina 0,85%. Posteriormente, procedeu-se à semeadura de uma alíquota de 1 mL das amostras, no ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas por 24 h a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ e as colônias foram contadas em UFC/mL, sendo o número das mesmas corrigido de acordo com a diluição semeada.

Para ser considerado sinergismo, duas condições foram observadas: diminuição de 100 vezes no número de colônias após o tratamento das cepas de forma simultânea com os dois agentes (extrato de própolis e antimicrobiano) por 24 h, em comparação ao agente mais ativo sozinho, e também a mesma diminuição no número de colônias, sob as mesmas condições, em relação ao inóculo inicial. Este experimento foi realizado em triplicata em duas análises independentes.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os dados do ensaio de viabilidade celular, do ensaio antimicrobiano, áreas sob a curva (AUC), bem como dos ensaios para a determinação do tipo de interação existente entre as combinações foram analisados utilizando ANOVA *one-way* seguido do teste post-hoc de Dunnett ou teste T através do *software* GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). As comparações foram consideradas estatisticamente significativas quando apresentaram valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

As análises por UPLC-ESI-MS/MS revelaram que os EPMs são uma mistura complexa de compostos, tendo sido caracterizadas tentativamente 63 substâncias nas amostras analisadas, incluindo compostos pertencentes as classes dos ácidos cinâmicos prenilados, ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos graxos, diterpenos, triterpenos, polifenóis e lipídeos fenólicos. Os componentes químicos dos EPM identificados por tentativa estão descritos na TABELA 2 e os respectivos cromatogramas estão demonstrados na FIGURA 2 (A-H).

TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR ELECTROSPRAY EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONTINUA).

Composto	Fórmula molecular	Massa exata	Modo de ionização	Massa teórica [M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	MS/MS	TR (min)	Verde	Tubuna	Mandaçaia	Plebeia	Referências						
1	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	170,0215	169,0137	0,45	X	X	169,0140	X	RUBINHO <i>et al.</i> , 2019						
2	Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	164,0473	163(40)	3,32	163,0398	163,0400	163,0400	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008						
					119(100)							93(7)	165(20)	165,0555	165,0556	X	
3	Ácido ferúlico ou isoferúlico	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	194,0579	193(30)	3,73	X	193,0507	X	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013						
					134(100)							195(32)	177(100)	149(2)	195,0657	195,0658	X
4	Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	[M-H] ⁻	302,0063	301(100)	3,62	X	X	300,9985	300,998	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018					
					284(16)								229(18)	201(11)	185(14)	173(11)	145(15)
					229(18)								201(11)	185(14)	173(11)	145(15)	
					201(11)								185(14)	173(11)	145(15)		
5	Drapanina (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico)	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	[M-H] ⁻	232,1099	231(10)	7,29	231,1024	231,1023	X	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008						
					187(11)							132(100)	247(5)	203(16)	148(100)		
6	Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	248,1049	247,0970	6,98	247,0973	X	X	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008						
7	Liquiritigenina ou Isoliquiritigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	256,0736	255(33)	5,13	X	255,0657	X	X	MACHADO <i>et al.</i> , 2016						
					135(30)							119(100)	91(12)	255(52)	135(22)	119(100)	91(15)
8	Liquiritigenina ou Isoliquiritigenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	256,0736	255(52)	6,62	X	255,0656	X	X	MACHADO <i>et al.</i> , 2016						
					135(22)							119(100)	91(15)				

TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR ELECTROSPRAY EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONTINUAÇÃO).

9	Naringenina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	272,0685	[M-H] ⁻	271,0607	271(20)	5,91	X	271,0609	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
						177(100)					
				[M+H] ⁺	273,0763	273(15)	6,00	X	273,0771	X	
						121(22)					
						147(35)					
						153(100)					
						259(35)					
						177(27)					
10	Aromadendrina (dihidrocanferol)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	288,0634	[M-H] ⁻	287,0556	151(17)	4,45	X	287,0560	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
						125(100)					
						107(8)					
						267(50)					
11	Formononetina	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268,0736	[M-H] ⁻	267,0657	252(100)	6,85	X	267,0666	X	LÓPEZ <i>et al.</i> , 2014
						223(45)					
						195(30)					
						283(44)					
12	Biochanina A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,0685	[M-H] ⁻	283,0607	268(100)	5,41	X	283,0606	X	LÓPEZ <i>et al.</i> , 2014
						239(22)					
						211(46)					
						299(4)					
13	Canferol metil eter (Canferida)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,0633	[M-H] ⁻	299,0555	284(100)	7,97	299,0558	299,0557	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						151(33)					
14	Isosacuranetina (4-metil-naringenina)	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286,0841	[M-H] ⁻	285,0763	164(100)	7,65	285,0765	X	285,0760	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
						151(20)					
						135(15)					
						108(5)					
						301(46)					
						283(21)					
						268(6)					
						227(9)					
15	Dihidrocanferida	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,079	[M-H] ⁻	301,0712	152(100)	6,16	301,0710	301,0717	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						125(30)					
						107(14)					
						301(20)					
16	Aromadendrina 7-metil eter	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,079	[M-H] ⁻	301,0712	273(100)	6,45	X	301,0710	X	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
						240(25)					
						179(50)					
						165(90)					

TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR ELECTROSPRAY EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONTINUAÇÃO).

17	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2402	[M-H] ⁻	255,2324	255(100)	14,91	X	255,2328	X	AFROUZAN <i>et al.</i> , 2018
						282(76)					
						267(12)					
						254(42)					
18	Retusina 8-metil eter	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	298,0841	[M-H] ⁻	297,0763	239(100)	7,02	X	297,0766	X	YE <i>et al.</i> , 2012
						211(23)					
						329(88)					
						314(56)					
19	Betuletol	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,074	[M-H] ⁻	329,0661	299(100)	8,12	X	329,0659	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						271(20)					
						255(9)					
20	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559	[M-H] ⁻	281,2481	281(100)	15,11	X	281,2482	X	AFROUZAN <i>et al.</i> , 2018
21	Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,2715	[M-H] ⁻	283,2637	283(100)	16,18	X	283,2638	X	AFROUZAN <i>et al.</i> , 2018
22	Arteplina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico)	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300,1725	[M-H] ⁻	299,1647	299(4)	9,91	X	299,1657	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						255(68)					
						200(100)					
23	Ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenoico	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	316,1675	[M-H] ⁻	315,1596	315(15)	7,54	X	315,1600	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						297(5)					
						285(6)					
						271(10)					
						253(99)					
						241(100)					
						198(93)					
						186(32)					
						315(50)					
						297(5)					
						271(5)					
24	Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-5-prenil-cumárico	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	316,1675	[M-H] ⁻	315,1596	253(8)	8,86	X	315,1601	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						245(10)					
						201(100)					
						146(90)					
25	Derivado de Arteplina C	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330,1831	[M-H] ⁻	329,1753	299(100)	9,17	X	329,1749	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
						255(31)					
						301(100)					
						259(15)					
						213(5)					
26	Sugtol	C ₂₀ H ₂₆ O ₂	300,2089	[M+H] ⁺	301,2167	205(3)	10,57	X	301,2173	X	ZHOU <i>et al.</i> , 2009
						185(3)					
						171(5)					
						163(6)					

TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR ELECTROSPRAY EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONTINUAÇÃO).

36	Cinamoi-galoi-hexosídeo	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,1162	[M-H] ⁻	461,1084	461(43)	5,38	X	X	461,1086	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
						313(22)						
37	Cumaroi-galoi-hexosídeo	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478,1111	[M-H] ⁻	477,1033	271(17)	4,00	X	X	477,1044	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
						211(20)						
38	Ácido anacárdico (15:1)	$C_{22}H_{34}O_3$	346,2408	[M-H] ⁻	345,2430	169(100)	15,55	X	X	345,2430	X	ERSAN <i>et al.</i> , 2016; SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
						477(21)						
39	Ácido 15-acetoxi-cuprêssico	$C_{22}H_{34}O_4$	362,2457	[M-H] ⁻	361,2379	313(6)	11,46	X	X	X	361,2383	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
						271(31)						
40	Ácido anacárdico (15:0)	$C_{22}H_{36}O_3$	348,2664	[M-H] ⁻	347,2586	211(33)	16,54	X	X	347,2583	X	ERSAN <i>et al.</i> , 2016; SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
						106(10)						
41	Ester prenildicoumárico	$C_{23}H_{22}O_6$	394,1416	[M-H] ⁻	393,1338	361(100)	8,39	X	X	X	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
						301(30)						
42	Bacarina (ácido 3-prenil-4-(dihidrocinnamoi-oxi) cinâmico)	$C_{23}H_{24}O_4$	364,1675	[M-H] ⁻	363,1596	163(50)	11,14	X	X	X	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2000
						145(100)						
43	Polifenol não identificado	$C_{24}H_{22}O_7$	422,1366	[M-H] ⁻	421,1287	149(100)	8,14	X	X	421,1286	X	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
						119(40)						
44	Cinamoi-cumaroi-hexosídeo	$C_{24}H_{24}O_9$	456,142	[M-H] ⁻	455,1342	187(74)	6,82	X	X	455,1351	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
						149(100)						
45	Dicumaroi-hexosídeo	$C_{24}H_{24}O_{10}$	472,1369	[M-H] ⁻	471,1291	421(80)	5,36	X	X	471,1286	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
						393(100)						
46	Ácido anacárdico (17:2)	$C_{24}H_{36}O_3$	372,2664	[M-H] ⁻	371,2586	363(15)	15,80	X	X	371,2588	X	ERSAN <i>et al.</i> , 2016; SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
						299(60)						
						285(30)						

TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR ELECTROSPRAY EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONTINUAÇÃO).

47	Ácido anacárdico (17:1)	$C_{24}H_{38}O_3$	374,2821	[M-H] ⁻	373,2743	373(8) 329(100)	16,60	X	373,2741	373,274	X	ERŞAN <i>et al.</i> , 2016; SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
48	Ácido dicafeoilquinico isômero 1	$C_{25}H_{24}O_{12}$	516,1267	[M-H] ⁻	515,119	353(40) 191(99) 171(100) 173(70) 135(20)	0,47	X	515,1196	X	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
49	Ácido dicafeoilquinico isômero 2	$C_{25}H_{24}O_{12}$	516,1267	[M-H] ⁻	515,119	353(22) 191(100) 179(57)	4,23	X	515,1198	X	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
50	Ácido dicafeoilquinico isômero 3	$C_{25}H_{24}O_{12}$	516,1267	[M-H] ⁻	515,119	353(30) 191(18) 179(58) 173(100) 135(7)	4,49	X	515,1196	X	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013
51	Ácido anacárdico não identificado	$C_{26}H_{42}O_3$	402,3134	[M-H] ⁻	401,3056	401(13) 357(100)	17,69	X	X	401,3056	X	SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
52	Vicenina-2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594,1585	[M-H] ⁻	593,1506	593(100) 503(9) 473(28) 383(30) 352(49)	0,46	X	593,1507	X	X	CISIOTTO <i>et al.</i> , 2018
53	Ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamilo xil)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil)-2-propenoico	$C_{28}H_{32}O_5$	448,225	[M-H] ⁻	447,2171	297(19) 197(8) 149(100)	10,99	X	447,2177	447,2176	X	MARCUCCI <i>et al.</i> , 2008
54	Digaloil-cinamoil-hexosídeo	$C_{28}H_{26}O_{15}$	614,1272	[M-H] ⁻	613,1193	613(33) 597(2), 465(100) 401(2) 313(40) 271(26) 211(14) 169(60)	5,43	X	X	613,1196	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018

TABELA 2 - COMPOSTOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLES (EPM) IDENTIFICADOS POR TENTATIVA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAPERFORMANCE (UPLC)/TIME OF FLIGHT QUADRUPOLO (QTOF) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) POR ELECTROSPRAY EM MODOS DE IONIZAÇÃO POSITIVO, NEGATIVO OU AMBOS (CONCLUSÃO).

55	Digaloi- cumaroi- hexosideo	$C_{29}H_{26}O_{16}$	630,1221	[M-H] ⁻	629,1143	4,15	X	629,1147	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
56	Ácido mangiferônico	$C_{30}H_{46}O_3$	454,3447	[M-H] ⁻	453,3369	15,03	X	453,3373	X	ZINGUE <i>et al.</i> , 2017
57	Triterpeno não identificado	$C_{30}H_{46}O_4$	470,3396	[M-H] ⁻	469,3318	14,50	X	469,3323	X	SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
58	Ácido mangiferólico ou isomangiferólico	$C_{30}H_{46}O_3$	456,3603	[M-H] ⁻	455,3525	14,24	X	455,3531	X	ZINGUE <i>et al.</i> , 2017
59	Ácido mangiferólico ou isomangiferólico	$C_{30}H_{46}O_3$	456,3603	[M-H] ⁻	455,3525	14,86	X	455,3523	X	ZINGUE <i>et al.</i> , 2017
60	Triterpeno não identificado	$C_{30}H_{46}O_4$	472,3553	[M-H] ⁻	471,3474	13,78	X	471,3480	X	SAWAYA <i>et al.</i> , 2006
61	Cinamoi- cumaroi-galoi- hexosideo	$C_{31}H_{28}O_{13}$	608,153	[M-H] ⁻	607,1452	6,98	X	607,1465	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
62	Dicumaroi- galoi-hexosideo	$C_{31}H_{28}O_{14}$	624,1479	[M-H] ⁻	623,1401	5,66	X	623,1406	X	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2018
63	Composto derivado de Artepillina C	$C_{38}H_{46}O_7$	614,3244	[M-H] ⁻	613,3165	13,52	613,3167	X	X	SZLISZKA <i>et al.</i> , 2013

NOTA: $[M-H]^-$, íon molecular negativo; $[M+H]^+$, íon molecular positivo. Os fragmentos de MS/MS são representados por m/z e abundância relativa (%). TR, tempo de retenção. ^aPresença de um composto no extrato de própolis expresso por seu m/z experimental de íon molecular negativo, positivo ou ambos (erro < 5 ppm). X, não detectado.
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 2 - CROMATOGRAMAS DE INTENSIDADE DE PICO DE BASE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE EM UPLC/QTOF ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) EM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* EM MODO NEGATIVO (ESI-) E POSITIVO (ESI+) (CONTINUA).

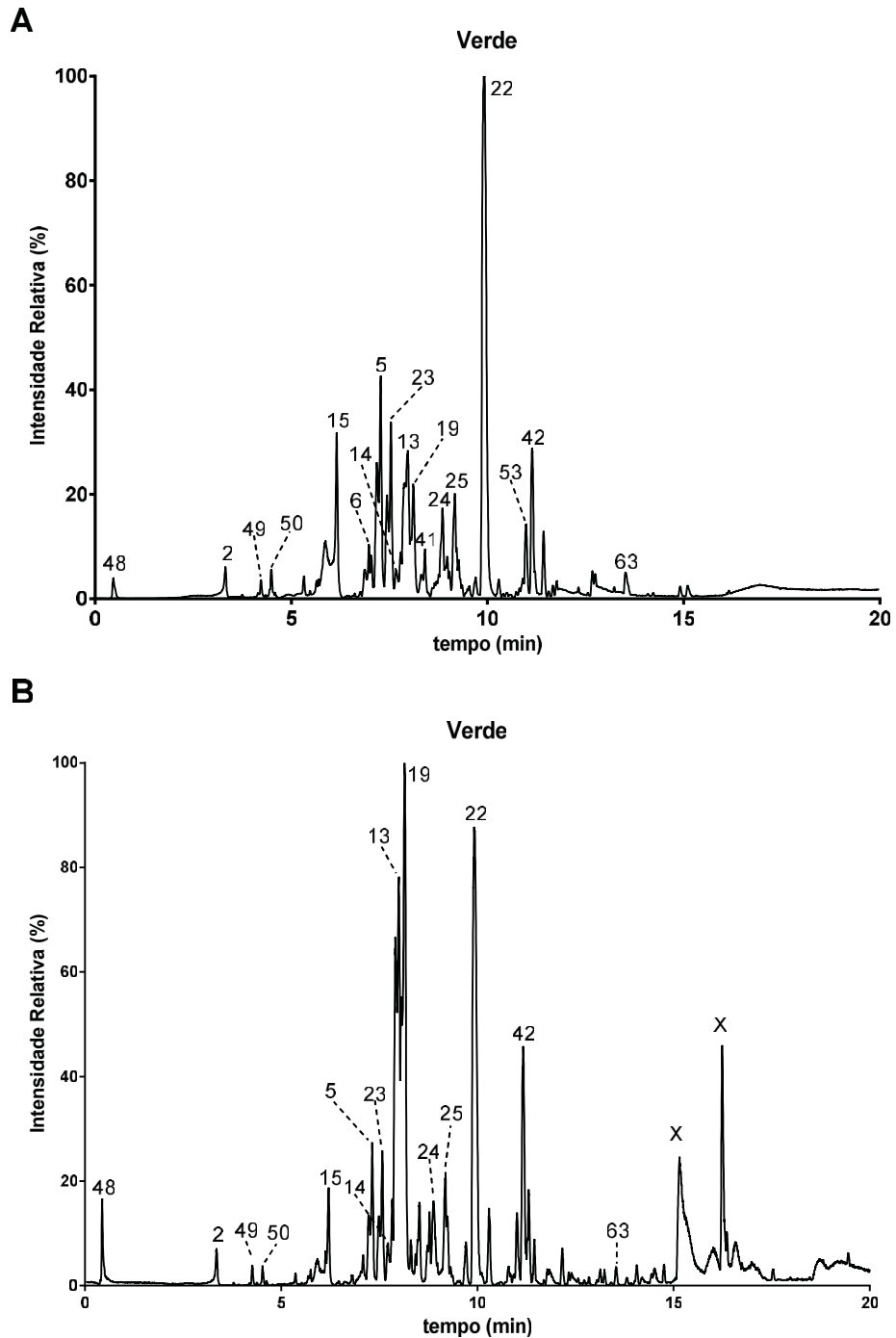


FIGURA 2 - CROMATOGRAMAS DE INTENSIDADE DE PICO DE BASE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE EM UPLC/QTOF ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) EM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* EM MODO NEGATIVO (ESI-) E POSITIVO (ESI+) (CONTINUAÇÃO).

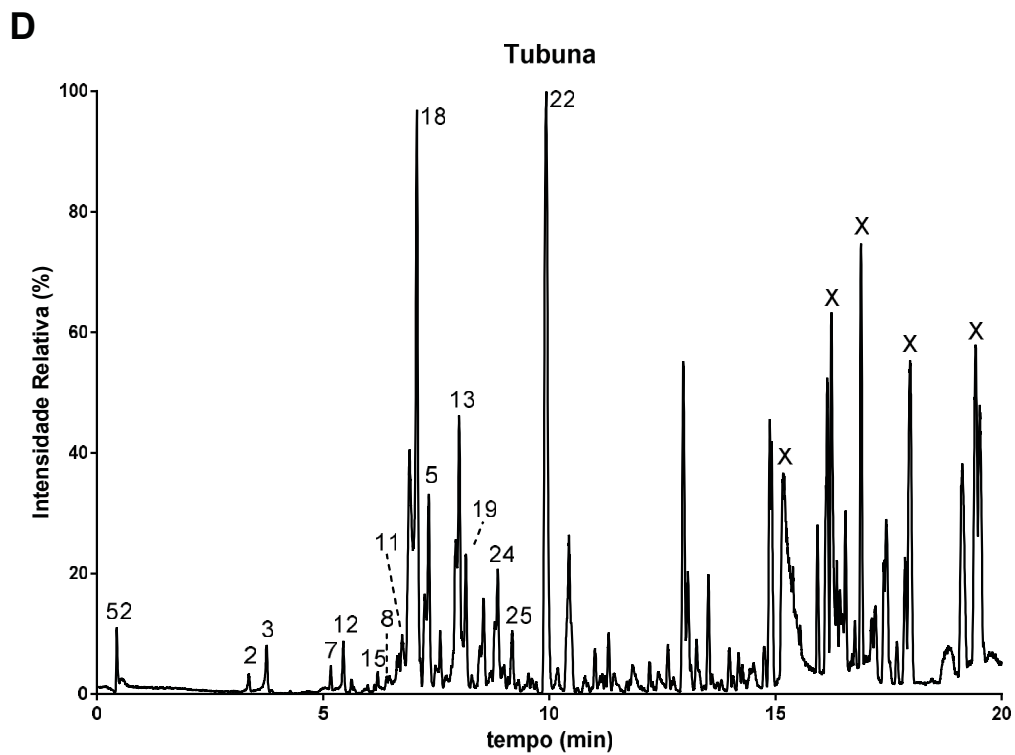
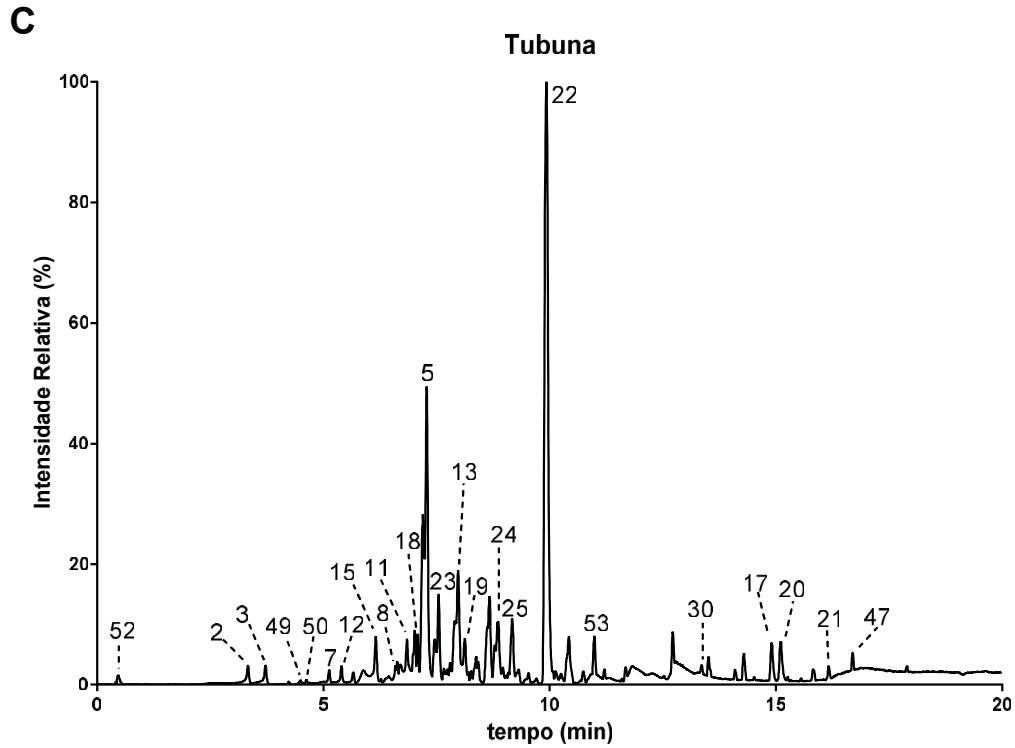


FIGURA 2 - CROMATOGRAMAS DE INTENSIDADE DE PICO DE BASE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE EM UPLC/QTOF ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) EM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* EM MODO NEGATIVO (ESI-) E POSITIVO (ESI+) (CONTINUAÇÃO).

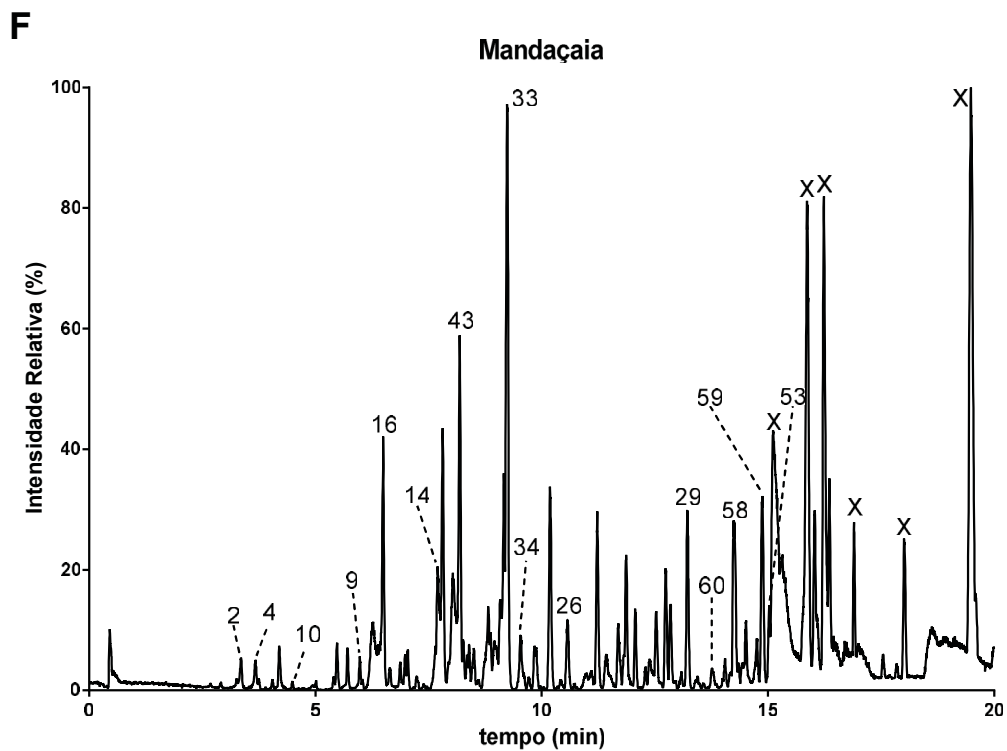
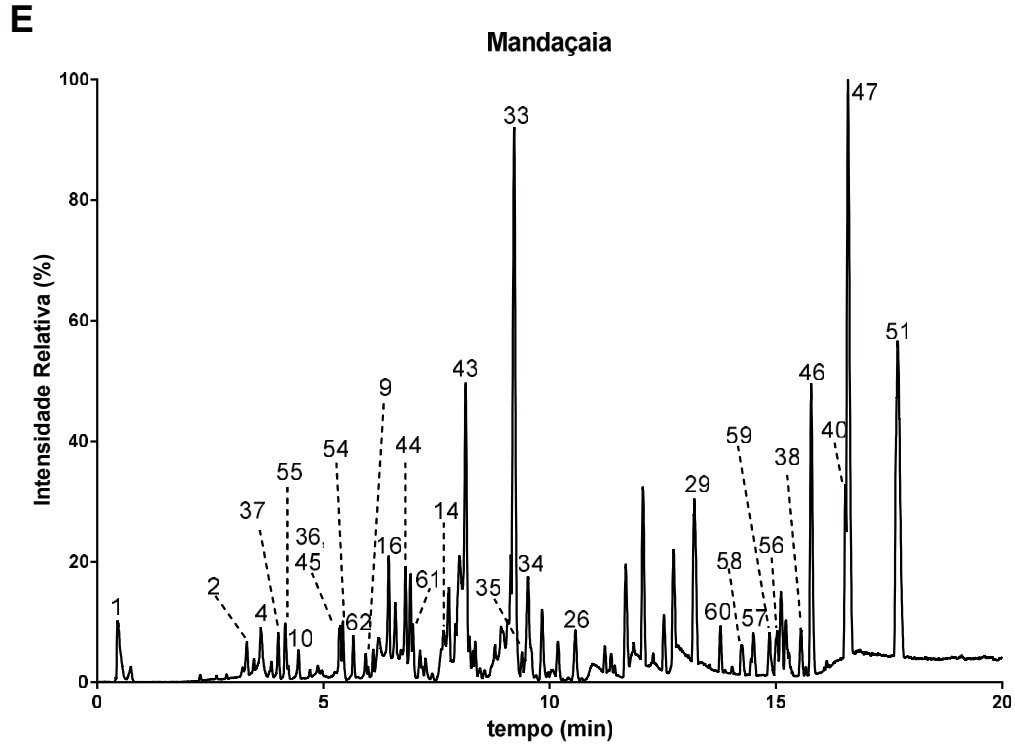
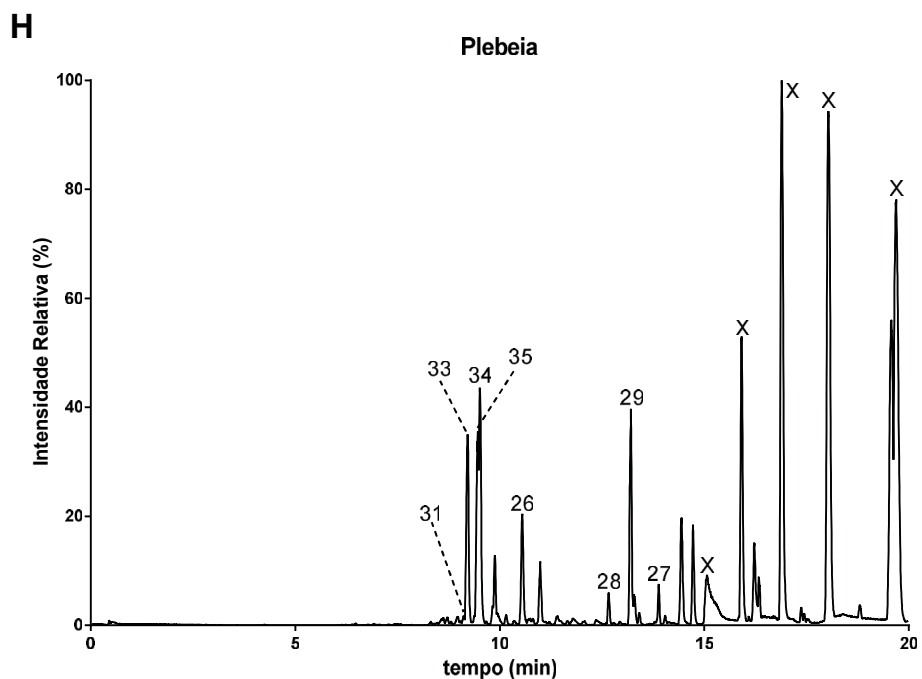
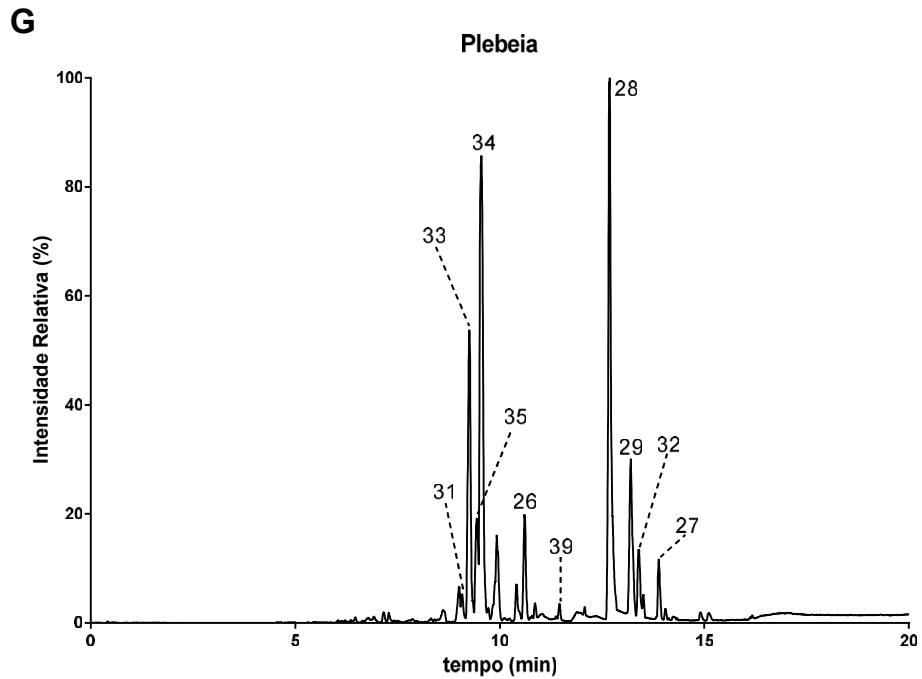


FIGURA 2 - CROMATOGRAMAS DE INTENSIDADE DE PICO DE BASE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE EM UPLC/QTOF ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (MS/MS) EM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* EM MODO NEGATIVO (ESI-) E POSITIVO (ESI+) (CONCLUSÃO).

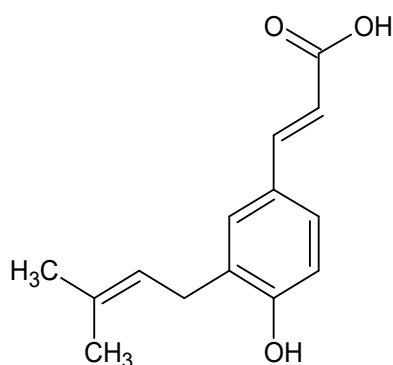


NOTA: Cromatogramas de extratos de própolis verde (A e B), tubuna (C e D), mandaçaia (E e F) e plebeia (G e H) nos modos de ionização negativo e positivo, respectivamente. Os números representam os compostos identificados e demonstrados na TABELA 2. X representa picos presentes no cromatograma branco.

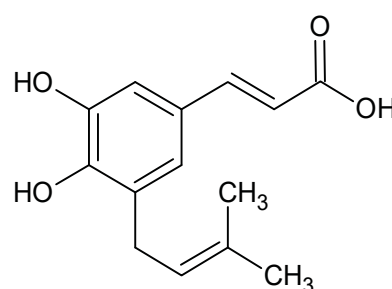
FONTE: A autora (2022).

Ácidos cinâmicos prenilados foram detectados nos extratos de própolis verde e tubuna (FIGURA 3), sendo que os compostos 5, 22, 23, 24, 25 e 53 estavam presentes em ambos os extratos. Os compostos 6, 41, 42 e 63 foram detectados apenas no extrato de própolis verde (TABELA 1 e FIGURA 2). Esses ácidos prenilados são característicos do própolis verde do sudeste brasileiro e da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* (MARCUCCI *et al.*, 2008; SZLISZKA *et al.*, 2013), sendo incomuns em própolis de abelhas-sem-ferrão (VELIKOVA *et al.*, 2000; SAWAYA *et al.*, 2007).

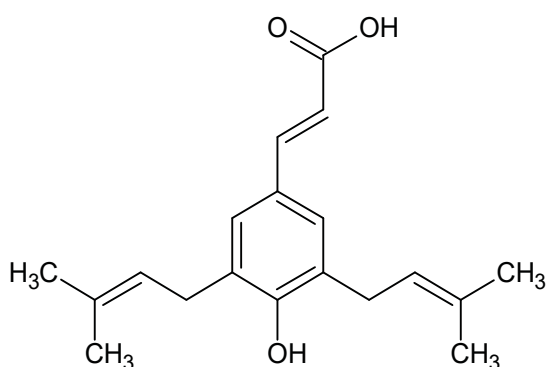
FIGURA 3 – ÁCIDOS CINÂMICOS PRENILADOS DETECTADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E TUBUNA (CONTINUA).



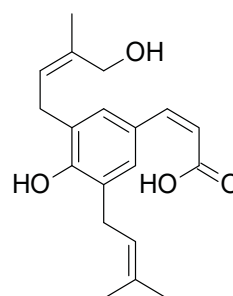
5. Drupanina



6. Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico

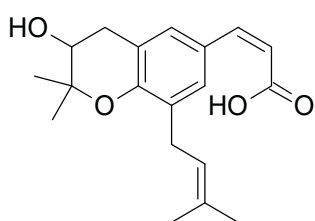


22. Artepilina C

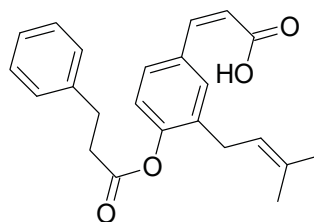


23. Ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil-2H-1-benzopiran-6-propenoico

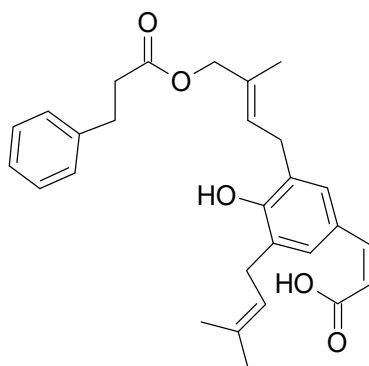
FIGURA 3 – ÁCIDOS CINÂMICOS PRENILADOS DETECTADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E TUBUNA (CONCLUSÃO).



24. Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-5-prenil-cumárico



42. Bacarina

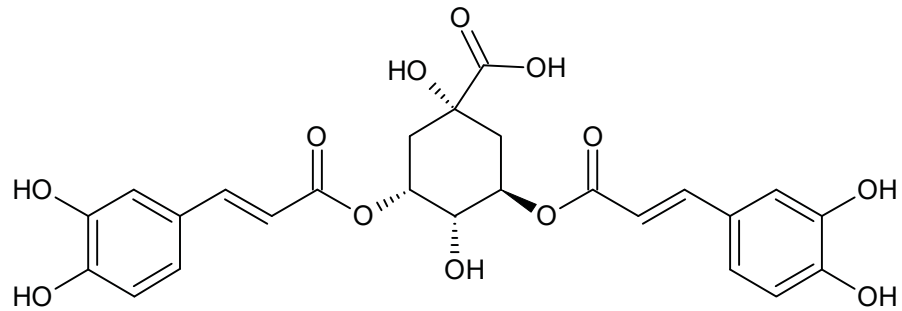


53. Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinaoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenoico

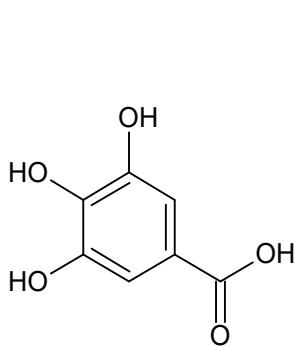
FONTE: A Autora (2022).

Ácidos fenólicos foram identificados nos extratos de própolis verde, tubuna e mandaçaia (FIGURA 4), sendo o composto 2 detectado nas três amostras. A presença dos compostos 49 e 50 foi verificada nos extratos de própolis verde e tubuna. O composto 48 foi detectado apenas no extrato verde, o composto 3 apenas no extrato de tubuna e os compostos 1 e 4 foram identificados apenas no extrato de mandaçaia (TABELA 2 e FIGURA 2).

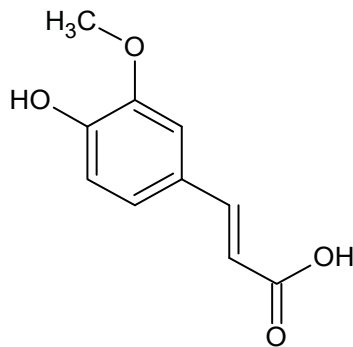
FIGURA 4 – ÁCIDOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE, TUBUNA E MANDAÇAIA.



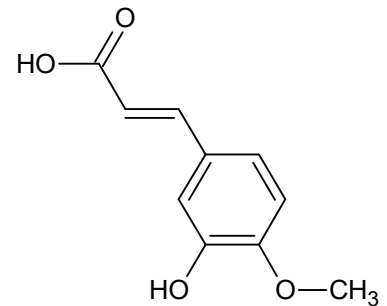
48, 49 ou 50. Ácido dicafeoilquínico



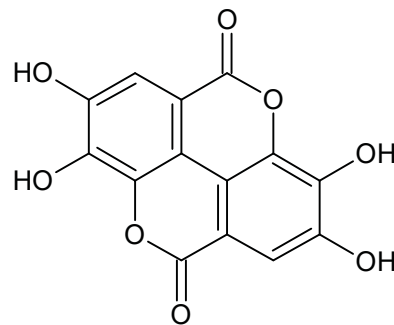
1. Ácido gálico



3.1 Ácido ferúlico



3.2 Ácido isoferúlico



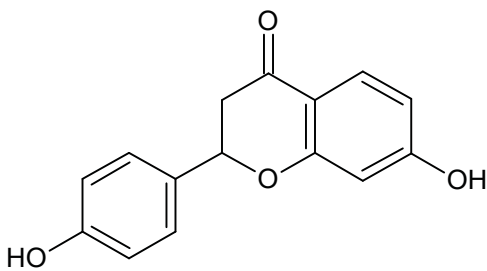
4. Ácido elágico

FONTE: A autora (2022).

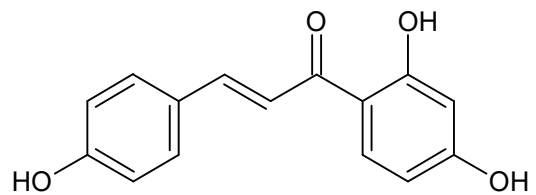
Os flavonoides foram encontrados nos extratos verde, tubuna e mandaçaia (FIGURA 5). Os compostos 13, 15 e 19 foram detectados no própolis verde e tubuna. A presença do composto 14 foi verificada nos extratos verde e mandaçaia. Os compostos 7, 8, 11, 12, 18 e 52 foram detectados apenas no extrato de tubuna,

enquanto os compostos 9, 10 e 16 foram encontrados apenas no extrato de mandaçaia (TABELA 2 e FIGURA 2). Flavonoides encontrados exclusivamente na mandaçaia também foram identificados no *kino* (resina) de *Corymbia citriodora* (FREITAS; LIMA; SILVEIRA, 2007), podendo esta ser uma possível fonte botânica desse própolis. O composto 18, que foi identificado pela primeira vez em uma amostra de própolis, foi relatado como um potente e seletivo inibidor reversível da monoamina-oxidase-B humana, sendo um promissor candidato para o tratamento de distúrbios neurológicos (OH *et al.*, 2020).

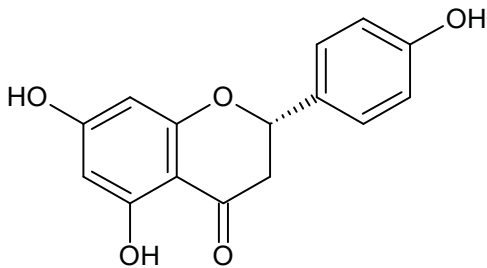
FIGURA 5 – FLAVONOIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE, TUBUNA E MANDAÇAIA (CONTINUA).



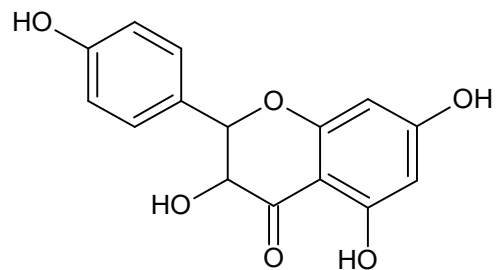
7 ou 8. Liquiritigenina



7 ou 8. Isoliquiritigenina

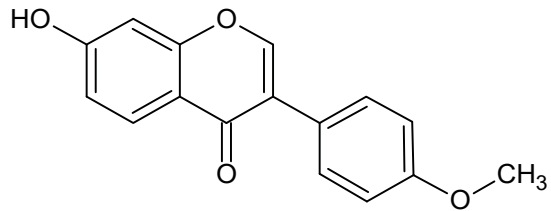


9. Naringenina

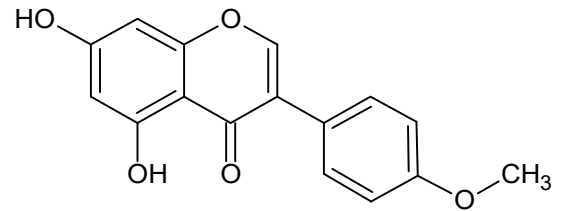


10. Aromadendrina

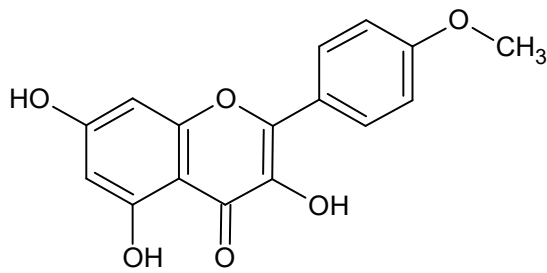
FIGURA 5 – FLAVONOIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE, TUBUNA E MANDAÇAIA (CONTINUAÇÃO).



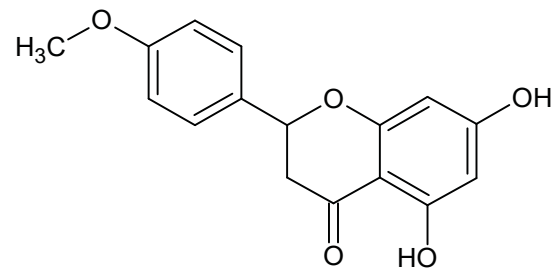
11. Formononetina



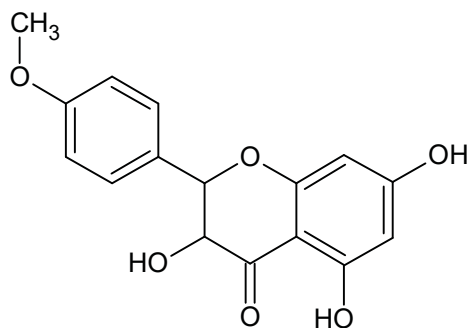
12. Biochanina A



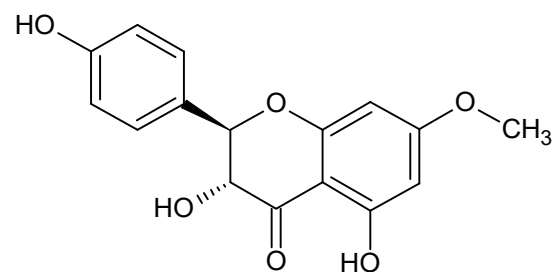
13. Canferida



14. Isosacuranetina

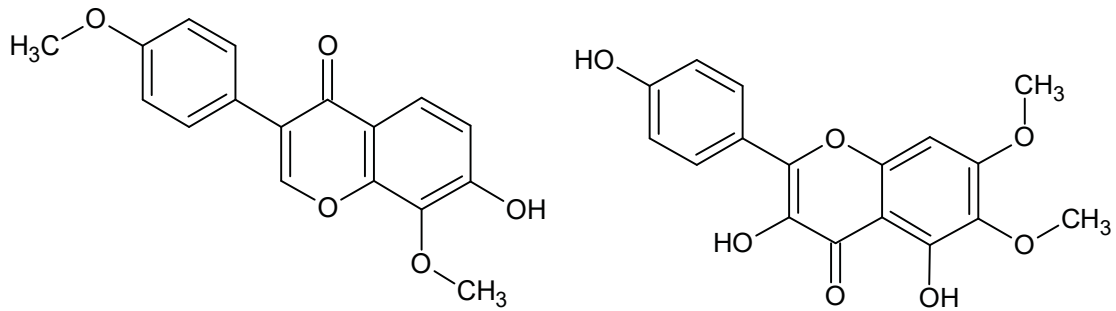


15. Dihidrocanferida



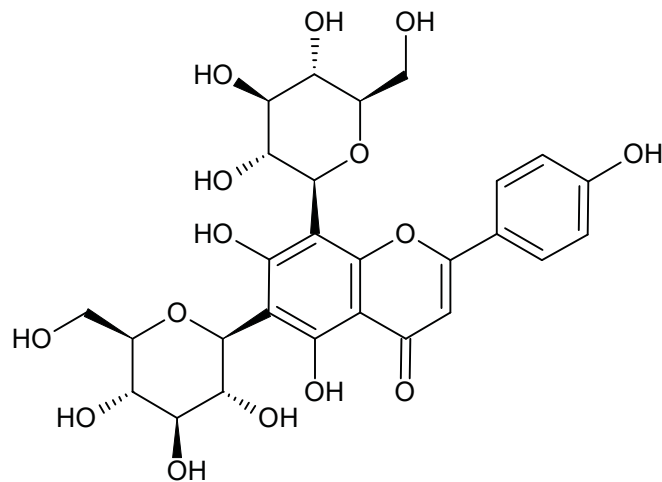
16. Aromadendrina 7-metil eter

FIGURA 5 – FLAVONOIDES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE, TUBUNA E MANDAÇAIA (CONCLUSÃO).



18. Retusina 8-metil eter

19. Betuletol

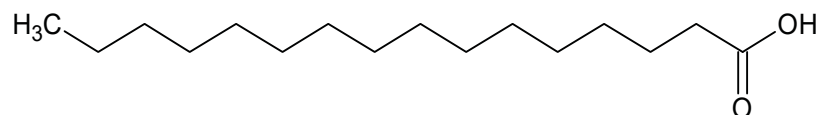


52. Vicenina-2

FONTE: A autora (2022).

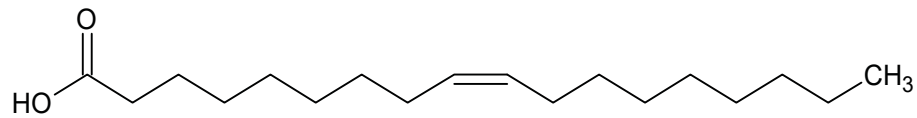
Os ácidos graxos (FIGURA 6) foram detectados apenas nos extratos de tubuna (compostos 17, 20, 21 e 30) e extrato de plebeia (composto 32) (TABELA 2 e FIGURA 2).

FIGURA 6 – ÁCIDOS GRAXOS DETECTADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA E PLEBEIA (CONTINUA).

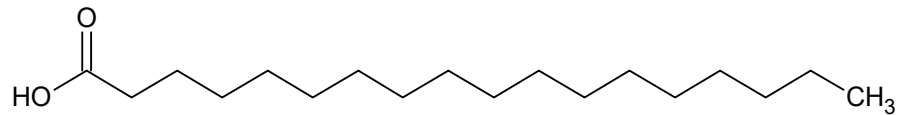


17. Ácido palmítico

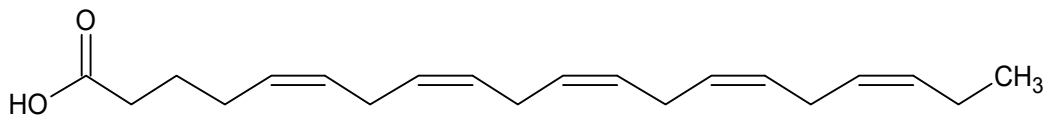
FIGURA 6 – ÁCIDOS GRAXOS DETECTADOS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA E PLEBEIA (CONCLUSÃO).



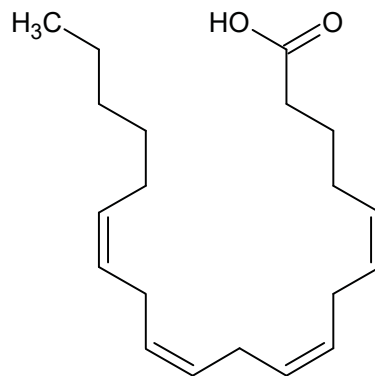
20. Ácido oleico



21. Ácido esteárico



30. Ácido eicosapentaenoico



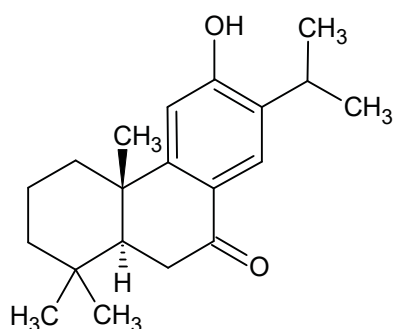
32. Ácido araquidônico

FONTE: A autora (2022).

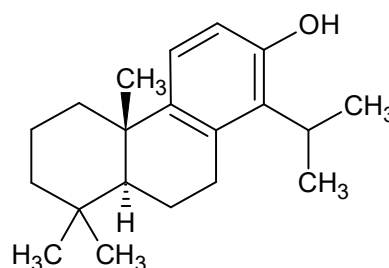
Os diterpenos (FIGURA 7) estavam presentes nos extratos de mandaçaia e plebeia e os compostos 29, 33, 34 e 35, que se tratam de diterpenos do tipo labdano, foram detectados em ambos os extratos. Outros diterpenos do tipo labdano (compostos 28, 31 e 39) foram identificados apenas no extrato de plebeia (TABELA 2

e FIGURA 2 (G-H)). O único diterpeno do tipo abietano detectado nas duas amostras avaliadas foi o composto 26. Diterpeno do tipo totarano (composto 27) foi identificado apenas na amostra de extrato de plebeia (TABELA 2 e FIGURA 2 (G-H)). Os diterpenos labdano também são encontrados no própolis do mediterrâneo. Uma provável fonte botânica desse própolis são as plantas da família Cupressaceae, onde esses compostos são comumente encontrados (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2006). No estado do Paraná (Brasil), árvores resinosas da espécie *Araucaria angustifolia* eram anteriormente consideradas representantes pertencentes a essa família botânica, e na atualidade estão alocadas na família Araucariaceae, podendo ser fonte desses compostos (CAMPELLO; FONSECA, 1975).

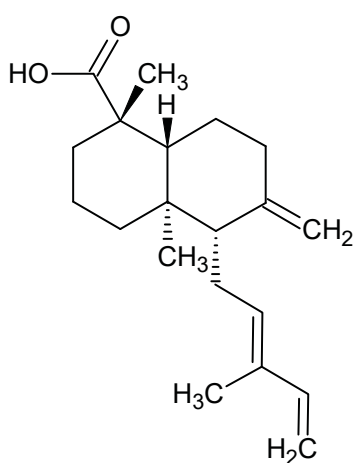
FIGURA 7 – DITERPENOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA E PLEBEIA (CONTINUA).



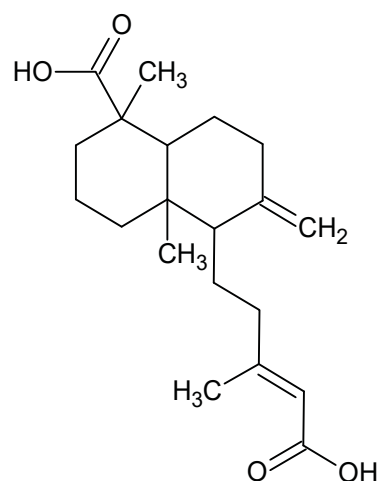
26. Sugiol



27. Totarol

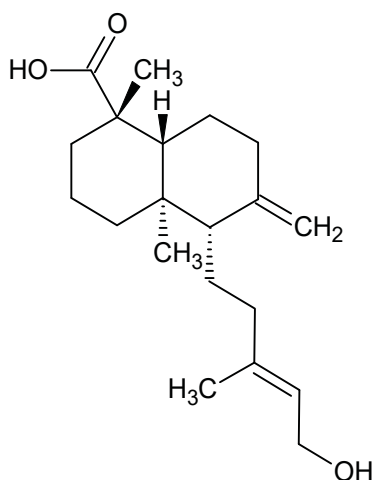


28. Ácido trans-comúnico

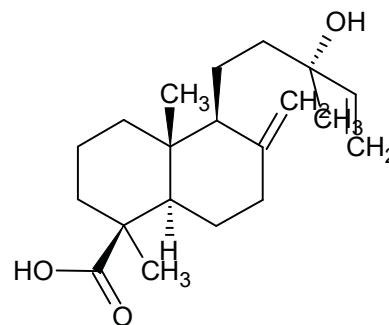


31. Ácido agático

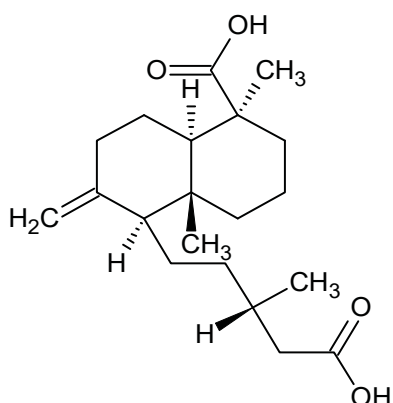
FIGURA 7 – DITERPENOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA E PLEBEIA (CONCLUSÃO).



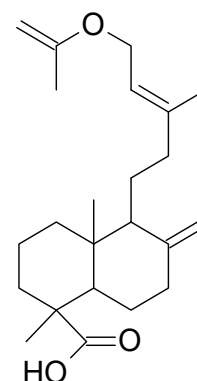
33. Ácido isocuprêssico



34. Ácido cuprêssico



35. Ácido junicédrico

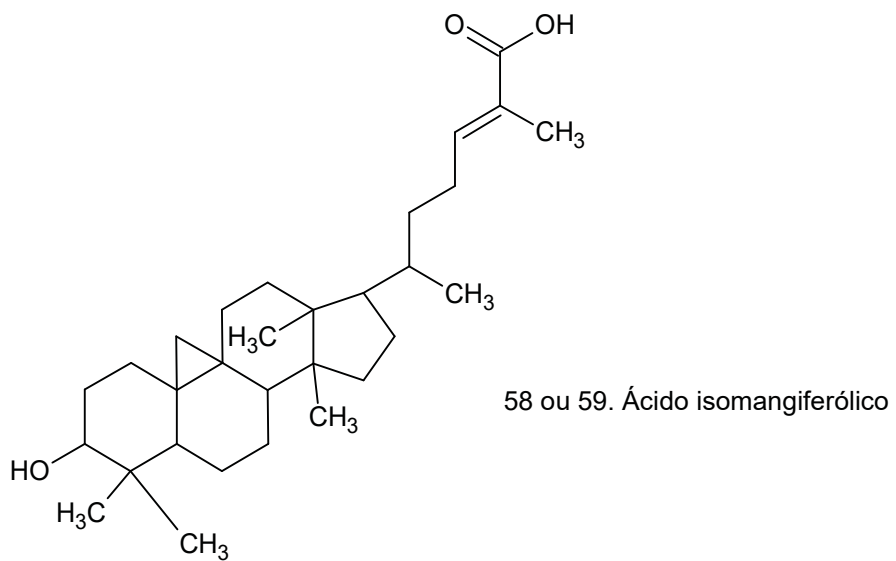
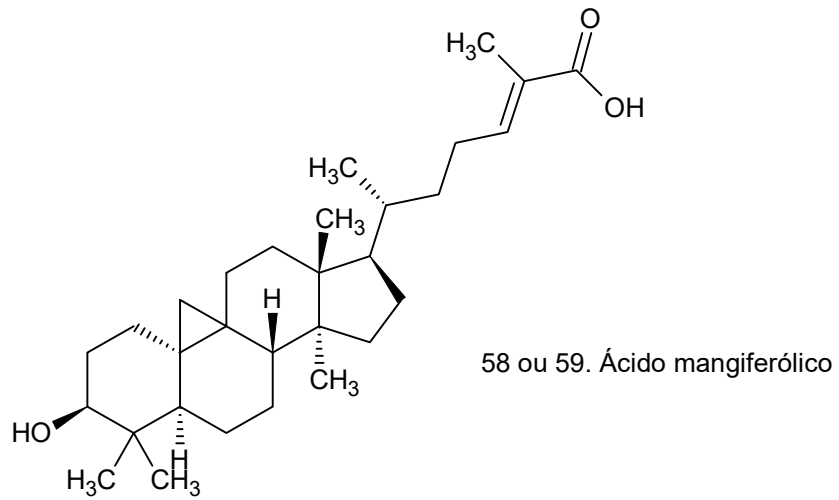
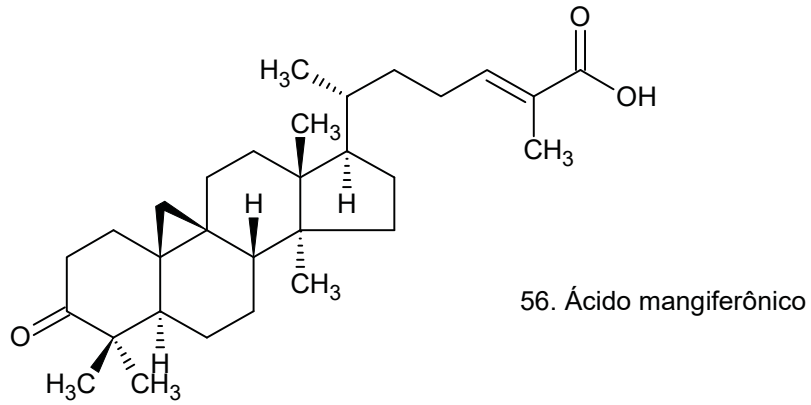


39. Ácido 15-acetoxi-cuprêssico

FONTE: A autora (2022).

Os triterpenos cicloartanos (compostos 56, 58 e 59) e os triterpenos não identificados (compostos 57 e 60) foram detectados apenas no própolis de mandaçaia [FIGURA 8, TABELA 2 e FIGURA 2 (E-F)]. Triterpenos cicloartanos já foram relatados no própolis de abelhas do nordeste do Brasil (SILVA *et al.*, 2005) e de *Tetragonula sapiens* da Indonésia (PUJIRAHAYU *et al.*, 2019). A origem botânica sugerida foi *Mangifera indica*, popularmente conhecida como manga.

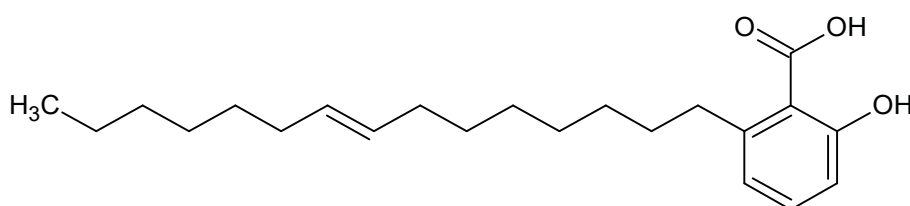
FIGURA 8 – TRITERPENOS DETECTADOS NO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA.



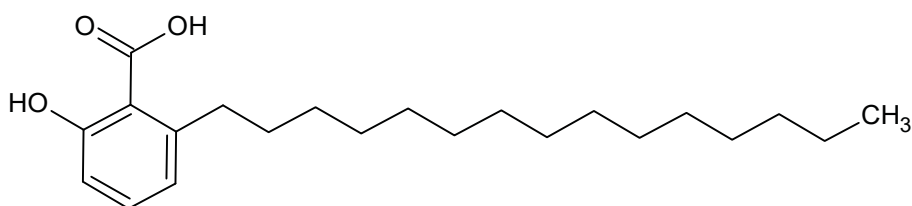
A presença de polifenóis (compostos 36, 37, 43, 44, 45, 54, 55, 61 e 62) foi verificada apenas no extrato de mandaçaia (TABELA 2 e FIGURA 2 (E-F)). Esses compostos já foram relatados em várias outras espécies de *Melipona* no Brasil e, dessa forma, poderiam se tornar possíveis marcadores químicos desse gênero no país (DOS SANTOS, HF *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2018; RUBINHO *et al.*, 2019).

A presença de lipídios fenólicos (ácidos anacárdicos) foi verificada nos extratos de tubuna e mandaçaia (FIGURA 9), e o composto 47 foi identificado em ambas as amostras. Os compostos 38, 40, 46 e 51 foram detectados apenas no extrato de mandaçaia (TABELA 2 e FIGURA 2 (E-F)). Esses compostos foram identificados previamente como componentes característicos da *Schinus terebinthifolius* (aroeira pimenta), fonte botânica para a produção de própolis por abelhas-sem-ferrão no Brasil (SAWAYA *et al.*, 2006).

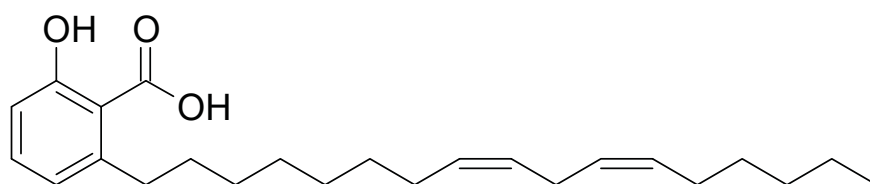
FIGURA 9 – LIPÍDIOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA E MANDAÇAIA (CONTINUA).



38. Ácido anacárdico (15:1)

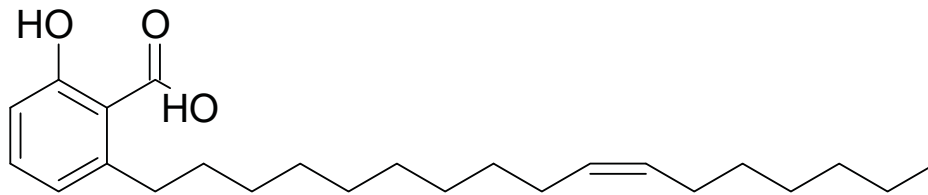


40. Ácido anacárdico (15:0)



46. Ácido anacárdico (17:2)

FIGURA 9 – LIPÍDIOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA E MANDAÇAIA (CONCLUSÃO).



47. Ácido anacárdico (17:1)

FONTE: A autora (2022).

Por fim, é pertinente ressaltar que, embora os extratos de própolis de tubuna e mandaçaia sejam do mesmo meliponário, os mesmos apresentaram composições químicas consideravelmente diferentes. Esse achado confirma que, além da origem botânica, a espécie de abelha é um fator determinante na composição do própolis.

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SELETIVA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM LINHAGENS CELULARES TUMORAIS

Os resultados relacionados a avaliação da citotoxicidade seletiva induzida pelos extratos de própolis estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - ATIVIDADE CITOTÓXICA [CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (Cl₅₀)]^a E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)^b DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE.

Extrato de própolis ou doxorubicina	McCoy			HeLa			HRT-18			HepG2			MCF-7			MDA-MB-231		
	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS	Cl ₅₀	IS
Verde	82,93±2,87	41,64±1,80	1,99	73,63±1,08	1,13	59,13±4,14	1,40	53,37±7,04	1,55	78,24±3,1	1,06							
Tubuna	95,69±2,86	63,29±1,36	1,51	112,23±2,36	0,85	75,89±4,07	1,26	54,89±5,28	1,74	68,18±3,54	1,40							
Mandaçaia	159,83±1,08	97,53±1,76	1,64	149,67±1,59	1,07	155,1±4,09	1,03	104,38±8,08	1,53	112,17±6,46	1,42							
Plebeia	53,18±4,43	46,62±3,72	1,14	76,1±2,64	0,70	51,41±3,16	1,03	41,76±4,5	1,27	70,06±2,52	0,76							
Doxorrubicina ^c	0,110±0,015	0,073±0,001	1,51	0,030±0,001	3,67	0,034±0,01	3,24	0,016±0,002	6,88	0,466±0,002	0,24							

NOTA: ^aOs valores da concentração inibitória média (Cl₅₀) dos extratos de própolis ou doxorubicina (µg/mL) são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata e expressos em média ± desvio padrão (DP). ^b O índice de seletividade (IS) foi calculado pela divisão dos valores de Cl₅₀ do extrato de própolis ou da doxorubicina nas células McCoy pelos valores correspondentes nas linhagens de células tumorais. ^cDoxorrubicina foi usada como controle positivo.

FONTE: A autora (2022).

O ensaio do MTT mostrou que todos os extratos de própolis foram citotóxicos para as linhagens celulares tumorais avaliadas, tendo efeito mais pronunciado sobre as linhagens HeLa e MCF-7. Os extratos de própolis verde e mandaçaia exerceram maior citotoxicidade sobre células da linhagem cervical, enquanto os extratos de tubuna e de plebeia foram mais citotóxicos para as células de carcinoma mamário MCF-7, e posteriormente para as células HeLa em comparação às demais linhagens tumorais analisadas (TABELA 3).

Quanto à citotoxicidade na linhagem celular McCoy, o extrato de mandaçaia apresentou-se o menos citotóxico, enquanto o extrato de plebeia apresentou a maior toxicidade entre os EPM testados. Isso indica um provável uso terapêutico mais seguro do extrato do própolis de mandaçaia em relação aos demais analisados e um uso mais cauteloso do extrato de plebeia. Em relação à seletividade, os melhores resultados foram verificados nas linhagens HeLa, MCF-7 e HEpG2, onde todos os extratos apresentaram $IS > 1$. Resultados menos promissores foram observados nas linhagens HRT-18 e MDA-MB-231, onde os extratos de tubuna e plebeia não mostraram seletividade nas células de câncer colorretal, enquanto o extrato de plebeia não foi seletivo para a linhagem de carcinoma de mama.

O potencial citotóxico de própolis é amplamente demonstrado na literatura em diversas linhagens tumorais (FORMA; BRYŚ, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021), tendo sido inclusive avaliado sobre células HeLa e MCF-7. Entretanto, quando se comparam com dados disponíveis na literatura, observa-se que estes estudos são conduzidos predominantemente com diferentes própolis produzidos por *A. mellifera*. Nesse sentido, relatos do potencial citotóxico de própolis de abelhas-sem-ferrão são mais escassos (PEREIRA *et al.*, 2021), podendo-se considerar raros aqueles reportados em células HeLa e MCF-7. Até o presente momento, nestes dois tipos celulares específicos, têm sido melhor explorados os efeitos induzidos por própolis produzidos por abelhas-sem-ferrão pertencentes ao gênero *Trigona* spp. (CHOUDHARI *et al.*, 2013; AMALIA; DIANTINI; SUBARNAS, 2020). Desta forma, o presente trabalho merece destaque, uma vez que demonstra o potencial citotóxico de extratos de abelhas-sem-ferrão nativas do Brasil e pertencentes a tribo Meliponini sobre células HeLa e MCF-7, ampliando o conhecimento acerca da toxicidade induzida por estas espécies (*S. bipunctata*, *M. quadrifasciata* *quadrifasciata* e *P. remota*) e evidenciando o potencial terapêutico dos própolis desse tipo de abelha, o qual acaba sendo negligenciado quando comparado ao potencial terapêutico apresentado por abelhas

melíferas, que é intensamente explorado, bem como já está consagrado para determinadas aplicações (ANJUM *et al.*, 2019).

Para comparação em relação a eficácia dos própolis avaliados neste estudo, deve-se levar em consideração o tipo de extração realizada, bem como as fontes botânicas presentes nos habitats das abelhas, uma vez que ambas as variáveis, juntamente com a espécie de abelha, influenciam diretamente na composição química do própolis, e conseqüentemente, na citotoxicidade induzida pelos mesmos (ALENCAR *et al.*, 2007; TAKARA *et al.*, 2007; XUAN *et al.*, 2016). Dessa forma, nesse trabalho considerou-se mais pertinente comparar os efeitos aqui demonstrados, aos induzidos por outros extratos etanólicos de própolis descritos na literatura. De forma geral, extratos etanólicos de própolis produzidos por abelhas melíferas apresentam valores de CI_{50} de 72 h na faixa de 7 a 357 $\mu\text{g/mL}$ e de 13 a 91 $\mu\text{g/mL}$, para células HeLa e MCF-7, respectivamente (ALENCAR *et al.*, 2007; THIRUGNANASAMPANDAN *et al.*, 2012; ARU *et al.*, 2019; RIVERO-CRUZ *et al.*, 2020). Já o extrato etanólico de abelhas-sem-ferrão pertencentes ao gênero *Trigona*, apresentou um CI_{50} de 250 $\mu\text{g/mL}$ após o tratamento de células MCF-7 por 24 h. Estes dados, quando comparados aos obtidos nesse estudo, demonstram que os própolis avaliados apresentaram potencial citotóxico comparável ou superior a diferentes tipos de própolis de *A. mellifera* e abelhas-sem-ferrão do gênero *Trigona*. Salienta-se a importância de se explorar melhor o potencial citotóxico de própolis de abelhas-sem-ferrão, uma vez que, considerando a composição química complexa e diferenciada dos mesmos, tal efeito pode estar relacionado a indução de diferentes mecanismos de ação, além dos que já foram relatados na literatura por diversos tipos de própolis (FRIÓN-HERRERA *et al.*, 2018).

Um dos principais objetivos das terapias antitumorais refere-se à eliminação de células neoplásicas sem danificar células não tumorais, a fim de evitar/minimizar a indução de efeitos colaterais adversos e tóxicos aos pacientes submetidos as mesmas (WACKHARD *et al.*, 2018). Em ensaios *in vitro*, tal seletividade pode ser verificada por meio da determinação do IS, onde valores de $IS > 1$ indicam que a citotoxicidade de uma substância em células não tumorais é menor do que em células tumorais (VALENCIA *et al.*, 2012). Conseqüentemente, compostos ou extratos com altos valores de IS são considerados terapias potencialmente mais seguras e eficazes.

Dados da literatura a respeito da citotoxicidade seletiva de própolis em células HeLa e MCF-7 são contraditórios. Alguns estudos têm demonstrado que extratos de

própolis não foram seletivos, sendo capaz de afetar células não tumorais e tumorais em uma mesma proporção (CALHELHA *et al.*, 2014; ONBAS *et al.*, 2016; AMALIA; DIANTINI; SUBARNAS, 2020). Já outros trabalhos demonstraram atividade seletiva do própolis em células neoplásicas (FROZZA *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; FALCÃO *et al.*, 2019). Desta forma, esses relatos evidenciam a importância de se ampliar a pesquisa sobre os efeitos de extratos de própolis sobre células neoplásicas e/ou tumores, levando-se em consideração a questão da seletividade.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os EPMs avaliados são eficazes na redução da viabilidade das células HeLa e MCF-7 e afetaram preferencialmente as células neoplásicas em detrimento das células não tumorais (TABELA 3).

Além disso, é importante destacar que os extratos de própolis de tubuna e de plebeia, os quais induziram perfis de citotoxicidade semelhantes, também apresentaram o mesmo perfil de seletividade, sendo mais seletivos para células MCF-7, em relação as outras linhagens celulares avaliadas. Já os extratos de própolis verde e mandaçaia apresentaram maior seletividade em células da linhagem cervical (TABELA 3).

Até o momento, não há na literatura relatos que justifiquem os padrões de seletividade encontrados no presente trabalho. Existem alguns estudos que correlacionam alguns compostos presentes no própolis com atividade citotóxica em algumas linhagens celulares tumorais (por exemplo, feniletil-éster do ácido cafeico em MCF-7) (OMENE *et al.*, 2013), no entanto, nenhuma dessas substâncias foi identificada nos extratos de própolis analisados.

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SINÉRGICA SELETIVA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS COM DOXORRUBICINA

Além da questão da seletividade, outro desafio relacionado ao sucesso das terapias antitumorais, refere-se ao desenvolvimento de resistência aos fármacos administrados para o controle do câncer (ALFAROUK *et al.*, 2015). Dentre os diversos tipos de fármacos aplicados para o tratamento dessa doença, merece destaque a doxorubicina.

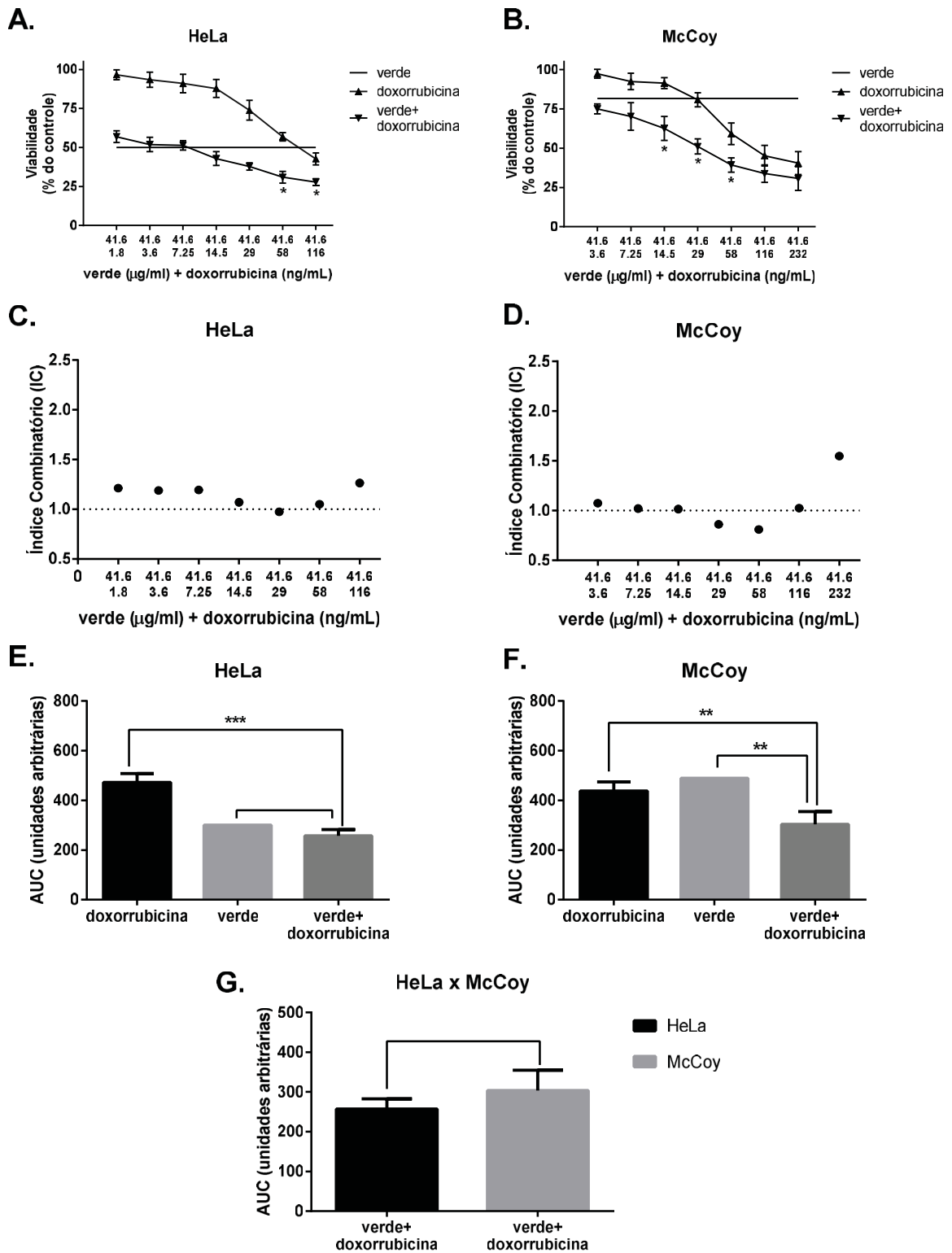
A doxorubicina é um quimioterápico de amplo espectro, sendo utilizada para o tratamento de diversos tipos de tumores, tais como: câncer de mama, de ovário, de

pulmão, de bexiga, leucemias e sarcoma de Kaposi. Também é utilizada em combinação com outros agentes no caso de osteosarcoma, câncer de útero, de colo uterino, de pâncreas, sarcoma de Ewing, mesotelioma, mieloma múltiplo, tumor de Wilms e neuroblastoma (AJAYKUMAR, 2020). Trata-se de um agente antitumoral muito eficaz, uma vez que seu mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase II do DNA, a intercalação ao DNA e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, existem algumas limitações relacionadas ao seu uso que se referem a indução de cardiotoxicidade (sendo essa a principal limitação), e ao desenvolvimento de resistência (WACKHARD *et al.*, 2018). Dessa forma, abordagens terapêuticas que potencializem a ação seletiva desse fármaco, devem ser consideradas. Nesse sentido, optou-se, nesse trabalho, em verificar se os extratos de própolis avaliados seriam capazes de potencializar a ação citotóxica da doxorubicina através da execução do ensaio do MTT. Este ensaio foi realizado sobre as linhagens tumorais para as quais cada própolis demonstrou os melhores índices de seletividade (TABELA 3), bem como nos fibroblastos não tumorais (linhagem McCoy). Além disso, como mencionado anteriormente, para a execução dos experimentos, foram utilizadas concentrações crescentes de doxorubicina (0,0004 – 232 ng/mL), bem como fixou-se a concentração dos própolis a ser testada, utilizando-se concentrações referentes às CI_{50} previamente estabelecidas.

Como mencionado na metodologia, o efeito global das associações foi analisado pela determinação da AUC; já para analisar o tipo de interação (sinérgica, aditiva ou antagônica) foi utilizado o índice combinatório (IC) calculado através do método de Chou-Talalay. Esse método para combinação de compostos é baseado na equação do efeito mediano, a qual é derivada do princípio da lei de ação das massas e engloba as equações de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch e Scatchard (CHOU, 2010).

Os resultados obtidos estão mostrados nas FIGURAS 10-13.

FIGURA 10 - EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS HELA E MCCOY.



NOTA: Curvas de crescimento nas linhagens celulares (A) HeLa ou (B) McCoy tratadas com doxorubicina, extrato de própolis verde (CI_{50}) ou combinação dos dois. * $p < 0,05$, que denota diferença estatística entre a combinação em relação ao extrato de própolis e à doxorubicina isolados. Índice combinatório (IC) do extrato de própolis verde com doxorubicina nas células (C) HeLa e (D) McCoy. $IC < 1$, $= 1$ e > 1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. A linha pontilhada separa os valores menores e maiores que 1. Área sob a curva (AUC) nas linhagens celulares (E) HeLa

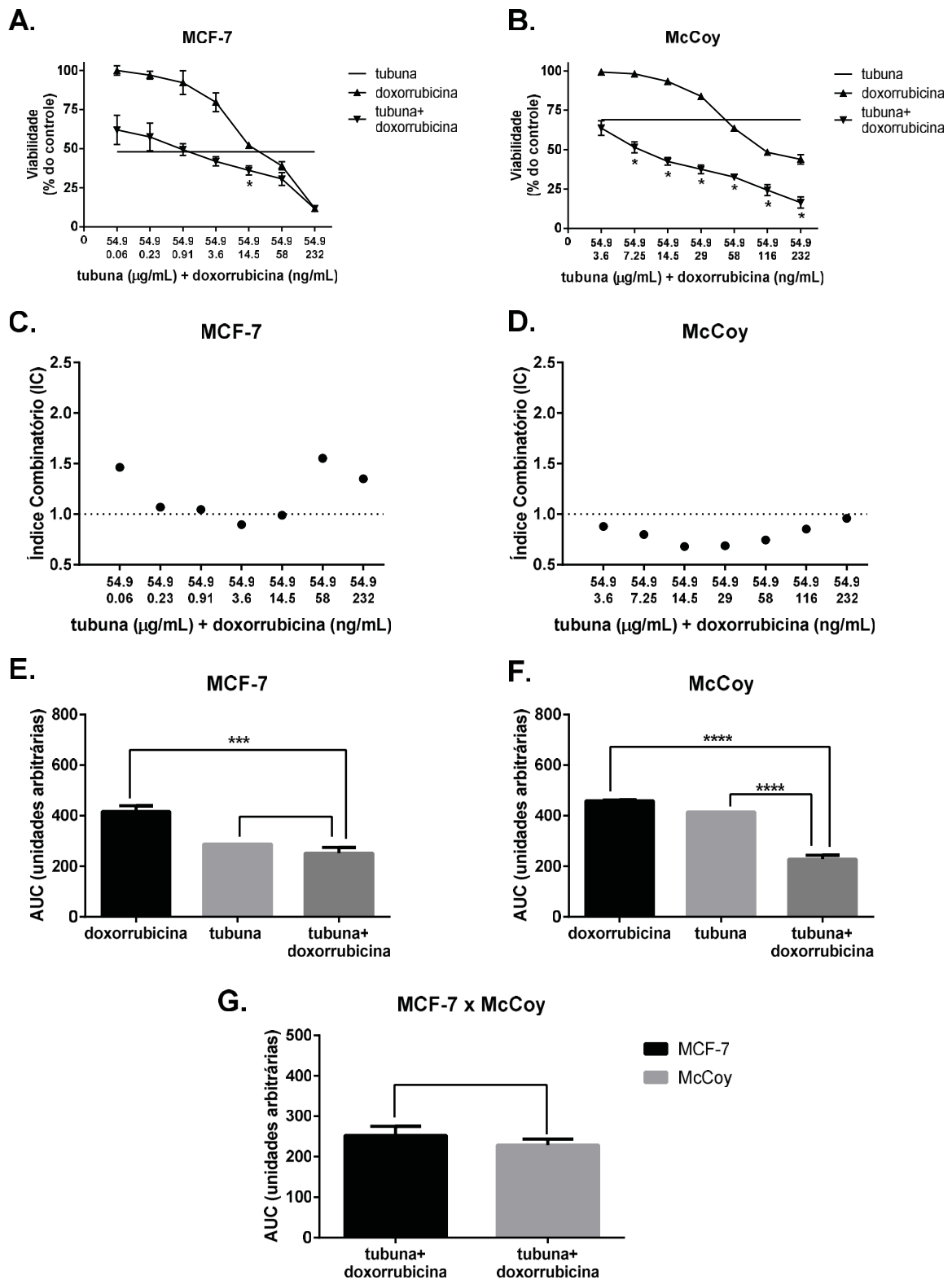
ou (F) McCoy tratadas com doxorrubicina, extrato de própolis verde (CI_{50}) ou combinação dos dois. Comparação da AUC da linhagem celular HeLa *versus* McCoy (G) da associação do extrato de própolis verde com doxorrubicina. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.
FONTE: A autora (2022).

Na linhagem celular HeLa, quando analisada a associação do extrato de própolis verde com a doxorrubicina, em relação ao tratamento apenas com o extrato ou o quimioterápico, observou-se aumento da citotoxicidade, com diferença estatística somente nos últimos dois pontos da curva, quando são utilizadas as concentrações mais elevadas da doxorrubicina (58 e 116 ng/mL), próximo a sua CI_{50} (FIGURA 10-A). Entretanto, o gráfico da AUC mostra que, ao analisar-se o efeito global induzido pela associação, observa-se redução da AUC, e conseqüentemente da viabilidade celular estatisticamente significativa somente entre a combinação e o quimioterápico, o que descarta sinergismo, visto que este é caracterizado pelo efeito combinado maior que a soma dos efeitos observados quando cada componente é administrado isoladamente (FIGURA 10-E). Por fim, o gráfico de índice combinatório (IC) da linhagem HeLa, mostra que a associação apresenta efeito essencialmente antagônico nesta linhagem celular, apresentando efeito aditivo apenas quando doxorrubicina foi aplicada na concentração de 29 ng/mL (FIGURA 10-C).

Nas células McCoy houve redução da viabilidade celular com diferença estatística nos três pontos médios da associação (14,5, 29 e 58 ng/mL de doxorrubicina). No gráfico de área sob a curva, foi possível verificar potencialização do efeito citotóxico por parte da combinação, uma vez que foi observada diferença estatística da mesma em relação a ambos tratamentos aplicados isoladamente, o que sugere que a associação apresentou efeito sinérgico nos fibroblastos. Entretanto o gráfico de IC mostra que a associação induz essencialmente efeito aditivo, tendo sido detectado efeito sinérgico quando doxorrubicina foi aplicada nas concentrações de 29 e de 58 ng/mL e efeito antagônico na concentração de 232 ng/mL.

Finalmente, quando analisado o gráfico de AUC das curvas da associação nas duas linhagens celulares (FIGURA 10-G), verificou-se que não há diferença estatística entre as mesmas, o que evidencia ausência de seletividade. Esses resultados corroboram a ausência de sinergismo da combinação nas células HeLa e a indução de efeito aditivo em relação às células McCoy.

FIGURA 11 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE TUBUNA, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS MCF-7 E MCCOY.



NOTA: Curvas de crescimento nas linhagens celulares (A) MCF-7 ou (B) McCoy tratadas com doxorubicina, extrato de própolis de tubuna (CI_{50}) ou combinação dos dois. * $p < 0,05$, que denota diferença estatística entre a combinação em relação ao extrato de própolis e à doxorubicina isolados. Índice combinatório (IC) do extrato de própolis de tubuna com doxorubicina nas células (C) MCF-7 e

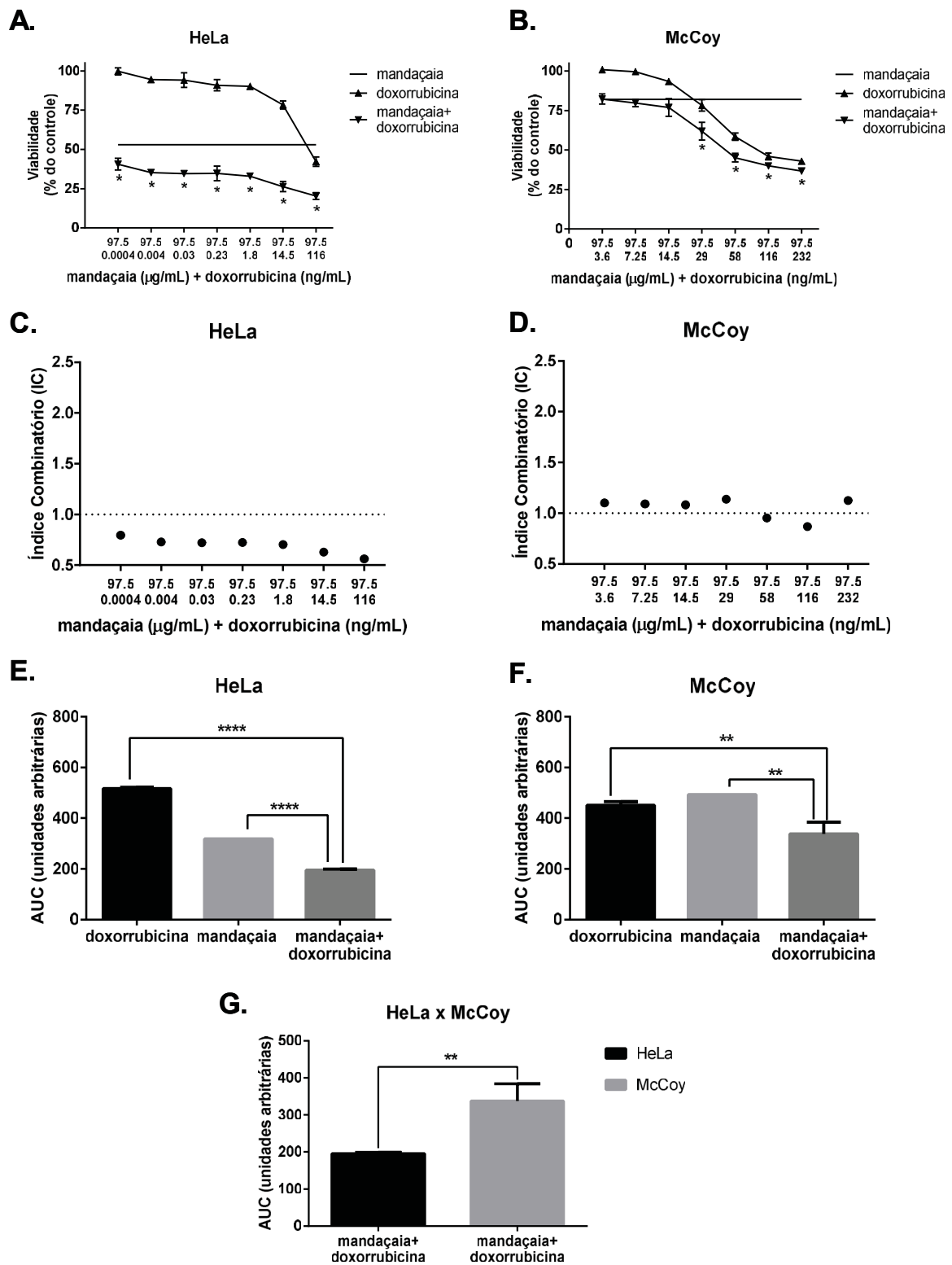
(D) McCoy. IC <1, = 1 e > 1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. A linha pontilhada separa os valores menores e maiores que 1. Área sob a curva (AUC) nas linhagens celulares (E) HeLa ou (F) McCoy tratadas com doxorubicina, extrato de própolis de tubuna (CI₅₀) ou combinação dos dois. Comparação da AUC da linhagem celular MCF-7 *versus* McCoy (G) da associação do extrato de própolis de tubuna com doxorubicina. *** p < 0,001; **** p < 0,0001
FONTE: A autora (2022).

Na linhagem celular MCF-7, quando foi analisada a curva da associação do extrato de própolis de tubuna com doxorubicina em comparação com as curvas dos tratamentos com o extrato ou o quimioterápico aplicados isoladamente, verificou-se elevação do efeito citotóxico apenas no quinto ponto da curva, ou seja, quando aplicou-se doxorubicina na concentração de 15,4 ng/mL (FIGURA 11-A). Entretanto, o gráfico de AUC mostrou que, do ponto de vista global, a associação foi capaz de reduzir a viabilidade celular apenas em relação ao tratamento com doxorubicina aplicada isoladamente (FIGURA 11-E), descartando, portanto, a indução de efeito sinérgico da associação. Por fim, o gráfico de IC mostra que o efeito induzido pela combinação é predominantemente antagônico, sendo aditivo e sinérgico apenas quando doxorubicina foi aplicada nas concentrações de 14,5 e 3,6 ng/mL, respectivamente (FIGURA 11-C).

Na linhagem McCoy, ao contrário, a curva de crescimento mostra que, com exceção do primeiro ponto, onde a concentração utilizada de doxorubicina na combinação é de 3,6 ng/mL, a associação foi capaz de reduzir de forma significativa a viabilidade celular tanto em relação à doxorubicina, quanto em relação ao extrato de própolis aplicados isoladamente (FIGURA 11-B). Em relação ao efeito global, pode-se verificar elevação significativa da citotoxicidade promovida pela combinação, em relação aos dois tratamentos aplicados isoladamente, o que sugere a indução de efeito sinérgico pela combinação nos fibroblastos (FIGURA 11-F). Tal indução de efeito sinérgico foi confirmada pela determinação do IC, onde obteve-se valores inferiores a 1, mostrando a ocorrência de sinergismo em todas as concentrações de doxorubicina aplicadas (FIGURA 11-D).

Por fim, pode-se observar que não há diferença estatística em relação à citotoxicidade global exercida pela associação nas duas linhagens celulares, o que evidencia ausência de efeito citotóxico seletivo. Tal inespecificidade pode ser justificada pela indução de efeito antagônico da combinação nas células MCF-7 e de efeito sinérgico da mesma em células McCoy (FIGURA 11-G).

FIGURA 12 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS HELA E MCCOY.



NOTA: Curvas de crescimento nas linhagens celulares (A) HeLa ou (B) McCoy tratadas com doxorubicina, extrato de própolis de mandacaiá (CI_{50}) ou combinação dos dois. * $p < 0,05$, que denota diferença estatística entre a combinação em relação ao extrato de própolis e à doxorubicina isolados. Índice combinatório (IC) do extrato de própolis de mandacaiá com doxorubicina nas células (C) HeLa e (D) McCoy. $IC < 1$, $= 1$ e > 1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. A

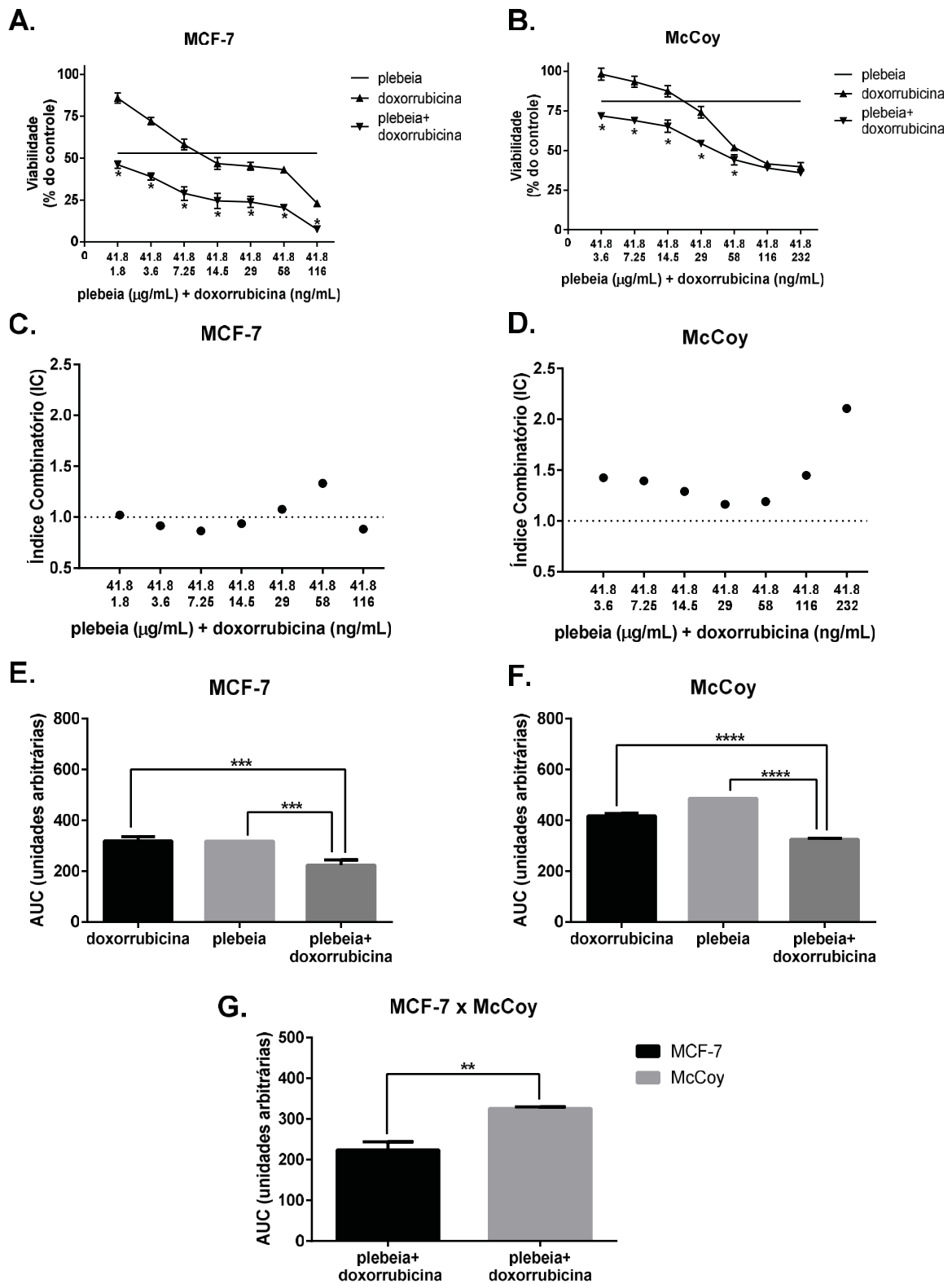
linha pontilhada separa os valores menores e maiores que 1. Área sob a curva (AUC) nas linhagens celulares (E) HeLa ou (F) McCoy tratadas com doxorubicina, extrato de própolis de mandaçaia (CI₅₀) ou combinação dos dois. Comparação da AUC da linhagem celular HeLa *versus* McCoy (G) da associação do extrato de própolis mandaçaia com doxorubicina. ** p < 0,01; **** p < 0,0001
FONTE: A autora (2022).

Na linhagem celular HeLa, quando analisada a curva da associação do extrato de própolis de mandaçaia com a doxorubicina em relação ao tratamento apenas com o extrato ou o quimioterápico, observou-se redução significativa da viabilidade celular em todos os pontos da curva concentração-resposta avaliada. Além disso, verificou-se efetiva potencialização de efeito citotóxico por parte da associação, uma vez que se observou uma viabilidade celular abaixo de 50% em todos os pontos da curva, indicando um possível sinergismo entre a doxorubicina e o extrato de própolis (FIGURA 12-A). Tal sinergismo foi confirmado tanto na análise global (AUC) como na determinação do IC, uma vez que foi observada redução significativa na AUC quando se compara o efeito da associação com os dois tratamentos aplicados isoladamente, bem como obteve-se valores de IC inferiores a um em todas as concentrações de doxorubicina avaliadas [FIGURAS 12 (C-E)].

Nas células McCoy, a curva concentração-resposta mostrou redução significativa na viabilidade celular quando doxorubicina foi aplicada a partir da concentração de 29 ng/mL (FIGURA 12-B). Ainda, verificou-se que tal redução na viabilidade refletiu no aumento global da citotoxicidade promovida pela associação nos fibroblastos, uma vez que foi observada redução significativa na AUC quando se comparam os efeitos induzidos pela associação aos promovidos pelo própolis e quimioterápico aplicados isoladamente (FIGURA 12-F), confirmando a potencialização de efeito. Além disso, a determinação do CI mostrou que a potencialização no efeito citotóxico promovido pela doxorubicina e extrato de própolis é decorrente da indução de efeito predominantemente aditivo, tendo sido observado sinergismo apenas quando doxorubicina foi aplicada nas concentrações de 58 e de 116 ng/mL (FIGURA 12-D).

Por fim, o gráfico de AUC das curvas da associação nas duas linhagens celulares (FIGURA 12-G), mostra a ocorrência de diferença estatística do efeito promovido nas células tumorais e nos fibroblastos, o que evidencia a indução de efeito seletivo. Sugere-se que tal seletividade seja decorrente do efeito sinérgico induzido na linhagem HeLa e do efeito predominantemente aditivo promovido nas células McCoy.

FIGURA 13 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA, DOXORRUBICINA OU AMBOS COMBINADOS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE COMBINATÓRIO E ÁREA SOB A CURVA DE CÉLULAS MCF-7 E MCCOY.



NOTA: Curvas de crescimento nas linhagens celulares (A) MCF-7 ou (B) McCoy tratadas com doxorubicina, extrato de própolis de plebeia (CI_{50}) ou combinação dos dois. * $p < 0,05$, que denota diferença estatística entre a combinação em relação ao extrato de própolis e à doxorubicina isolados. Índice combinatório (IC) do extrato de própolis de plebeia com doxorubicina nas células (C) MCF-7 e

(D) McCoy. $IC < 1$, $= 1$ e > 1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. A linha pontilhada separa os valores menores e maiores que 1. Área sob a curva (AUC) nas linhagens celulares (E) HeLa ou (F) McCoy tratadas com doxorrubicina, extrato de própolis de plebeia (CI_{50}) ou combinação dos dois. Comparação da AUC da linhagem celular MCF-7 *versus* McCoy (G) da associação do extrato de própolis plebeia com doxorrubicina. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$
 FONTE: A autora (2022).

Na linhagem celular MCF-7, quando analisada a curva da associação do extrato de própolis de plebeia com a doxorrubicina em relação ao tratamento apenas com o extrato ou o quimioterápico, observou-se elevação significativa da citotoxicidade celular em todas as concentrações de doxorrubicina avaliadas, sendo tal potencialização de efeito, uma vez que observou-se percentuais de viabilidade celular abaixo de 50% para todas as combinações testadas (FIGURA 13-A). Estes resultados, associados à significativa redução da AUC promovida pela combinação em relação aos dois tratamentos aplicados isoladamente, indicam a ocorrência de um possível sinergismo entre o própolis e o quimioterápico nas células tumorais (FIGURA 13-E). Nesse sentido, o gráfico de IC mostrou que a associação exerce predominantemente efeito sinérgico, apresentando efeito aditivo quando doxorrubicina foi aplicada na concentração de 1,8 ng/mL e efeito antagônico quando a antraciclina foi aplicada nas concentrações de 29 e de 58 ng/mL (FIGURA 13-C).

Nas células McCoy, com exceção das combinações em que doxorrubicina foi aplicada nas concentrações de 116 e 232 ng/mL, também foi observado que a mesma foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular, em comparação ao efeito promovido por doxorrubicina e pelo extrato aplicados isoladamente (FIGURA 13-B). Tal redução na viabilidade promovido pela associação, acarretou em uma potencialização do efeito citotóxico global, refletido na significativa redução da AUC quando se compara a associação aos dois tratamentos aplicados de forma isolada (FIGURA 13-F). Apesar da associação ter elevado significativamente a citotoxicidade induzida por doxorrubicina e pelo própolis, o gráfico do IC mostrou que a combinação do extrato de plebeia a antraciclina exerceu efeito antagônico, o que pode justificar porque a associação, na maioria das concentrações testadas, apresentou viabilidade celular $\geq 50\%$ (FIGURA 13-D).

Quando analisado o gráfico de AUC das curvas da associação nas duas linhagens celulares, verificou-se que houve diferença estatística entre as mesmas, o que evidencia seletividade (FIGURA 13-G). Tal seletividade pode ser justificada pelo

efeito sinérgico promovido pela combinação sobre células MCF-7, bem como efeito antagônico induzido pela mesma sobre os fibroblastos.

Logo, os resultados obtidos demonstraram que os extratos de própolis de mandaçaia e de plebeia foram os mais promissores, visto que potencializaram a ação da doxorubicina em células tumorais, por meio da indução de um efeito sinérgico, quando associados a este fármaco. Além disso, a ação da combinação de tais extratos de própolis com a doxorubicina apresentou efeito citotóxico seletivo, independentemente de terem atuado de forma aditiva, como foi o caso da combinação de doxorubicina com o própolis de mandaçaia, ou antagônica, como foi o caso da combinação de doxorubicina com o própolis de plebeia. Dessa forma, tais dados sugerem que estes extratos de própolis podem reduzir a resistência das células tumorais à doxorubicina, além de minimizar a ocorrência de efeitos adversos e tóxicos relacionados ao uso desse quimioterápico, tendo em vista a possibilidade de aplicar-se menores doses de fármaco para indução de efeito citotóxico significativo.

Embora o sinergismo entre própolis e alguns quimioterápicos usados na clínica (cisplatina e epirrubicina) seja demonstrado na literatura (BENKOVIC *et al.*, 2008; ORŠOLIĆ *et al.*, 2013), o efeito específico com doxorubicina é pouco explorado, principalmente em relação a própolis de abelhas-sem-ferrão. Até o presente momento, apenas um estudo na literatura avaliou o sinergismo entre esta antraciclina e o extrato hidroetanólico de geoprópolis proveniente da abelha *Melipona fasciculata*, em uma linhagem de carcinoma de laringe (HEp-2) (BARTOLOMEU *et al.*, 2016). Outro estudo reportado que merece destaque, trata-se de um trabalho desenvolvido em células MCF-7, e que aborda o sinergismo entre doxorubicina e uma fração rica em estilbenos prenilados de própolis de abelhas melíferas da Austrália. Foi demonstrado que essa fração potencializou a atividade citotóxica da doxorubicina, além de ter alterado o tipo de morte celular induzida pelo fármaco (necrose) para apoptose, o que pode ser vantajoso para diminuir efeitos adversos e colaterais relacionados ao uso do quimioterápico (ALSHARBINY *et al.*, 2021).

Por fim, ressalta-se a relevância deste estudo em avaliar o sinergismo entre os extratos de própolis e a doxorubicina em células MCF-7, uma vez que este antineoplásico é utilizado clinicamente em esquemas terapêuticos para o tratamento do câncer de mama (AJAYKUMAR, 2020).

Uma vez que a composição química de mandaçaia e plebeia foi devidamente caracterizada, pode-se sugerir a presença de compostos envolvidos no

desencadeamento do sinergismo envolvido. Nesse sentido, a ação sinérgica do extrato de manducaia com a doxorubicina pode ser parcialmente atribuída à presença de ácidos anacárdicos nesse própolis. Foi relatado na literatura que o composto 40 é um inibidor da histona acetil transferase, enzima responsável por acetilar histonas e tornar a cromatina mais acessível aos fatores transcricionais, aumentando a expressão gênica em geral. Dessa forma, a potencialização da apoptose induzida por doxorubicina em células KBM-5, Jurkat, H1299, DU 145 e SCC4 pela combinação do composto 40 à doxorubicina pode ser atribuída à redução da expressão de proteínas associadas ao fator nuclear NF- κ B, e indução de interferências negativas nos processos de sobrevivência celular, proliferação e metástase (SUNG *et al.*, 2008).

Dentre os compostos detectados no extrato de plebeia, foi verificado que o ácido trans-comúncico (composto 28) (TABELA 2) inibe a DNA polimerase β (SALEHAN; MORSE, 2013), uma enzima chave da via de reparo das bases de DNA danificadas pela doxorubicina (LIU *et al.*, 2010). Dessa forma, o sinergismo citotóxico entre este própolis e a doxorubicina pode ser parcialmente atribuído a este composto.

No entanto, é importante ressaltar que outros compostos presentes nos extratos, incluindo substâncias não identificadas ou não detectadas por limitações do método UPLC-QToF-MS/MS, podem estar envolvidos nessa ação sinérgica.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Os produtos naturais estão sendo reavaliados como fontes para obtenção de agentes antibacterianos. As razões para isso incluem o desenvolvimento de bactérias multirresistentes, o surgimento de novos patógenos e uma redução no desenvolvimento e introdução de novos fármacos antibacterianos no mercado farmacêutico (MAHADY, 2005). Nesse contexto, a pesquisa sobre o potencial antimicrobiano do própolis é promissora, visto seu uso popular contra infecções, bem como sua comprovada atividade antibacteriana (SFORCIN, 2016; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

A TABELA 4 mostra que nenhum dos extratos de própolis testados apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-negativas avaliadas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*), uma vez que foram detectados valores de CIM > 1000 μ g/mL para todos os extratos de própolis avaliados nestas cepas. Entretanto, em relação aos ensaios realizados com bactérias gram-positivas, e com exceção do

extrato de tubuna, o qual foi inativo em todas as cepas avaliadas, foi demonstrado que todas as amostras de própolis testadas promoveram efeito antibacteriano significativo (TABELA 4).

TABELA 4 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS.

Estirpe bacteriana		Verde	Tubuna	Mandaçaia	Plebeia	Gentamicina ^a	Oxacilina ^a	Vancomicina ^a
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	CIM (µg/mL)	500	> 1000	333 ± 118	417 ± 118	0,12	0,03	1,7 ± 0,5
<i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	CIM (µg/mL)	500	> 1000	250	250	3,3 ± 0,9	32	2
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	CIM (µg/mL)	500	> 1000	333 ± 118	250	6,7 ± 1,9	NA	1
<i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)	CIM (µg/mL)	> 1000	> 1000	500	> 1000	> 1000	NA	107 ± 30
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	CIM (µg/mL)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	0,25	NA	NA
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	CIM (µg/mL)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	ND	NA	NA
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 13883)	CIM (µg/mL)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	0,25	NA	NA
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	CIM (µg/mL)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	ND	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	CIM (µg/mL)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	0,50	NA	NA

NOTA: Os resultados foram expressos como concentração inibitória mínima (CIM) e desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. ^aControles positivos; NA - não aplicável; ND - não determinado.

FONTE: A autora (2022).

Nesse sentido, os resultados obtidos corroboram com a literatura, uma vez que tem sido observada maior atividade antibacteriana de extratos de própolis produzidos

por abelhas melíferas e sem-ferrão contra bactérias gram-positivas, do que contra bactérias gram-negativas (PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019; FERNANDES JR. *et al.*, 2001; VELIKOVA *et al.*, 2000). Isso pode ser explicado pela estrutura da membrana externa específica das bactérias gram-negativas, a qual possui menor permeabilidade e pela produção de enzimas hidrolíticas que destroem as substâncias ativas (SFORCIN, 2016; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Em bactérias gram-positivas, o extrato de própolis verde apresentou baixo desempenho quanto ao seu potencial antimicrobiano, uma vez que foi verificado que esse própolis foi inativo contra cepas VRE e HLAR, bem como apresentou baixa atividade contra MSSA, MRSA e *E. faecalis* (ATCC 29212). Os própolis de mandaçaia e de plebeia exibiram atividade antibacteriana semelhante e moderada contra as cepas MSSA, MRSA e *E. faecalis* (ATCC 29212). Ainda, foi verificado que o extrato de mandaçaia apresentou baixa atividade contra a cepa VRE e HLAR, enquanto o extrato de plebeia não promoveu efeito antibacteriano nessa estirpe bacteriana (TABELA 4).

Ressalta-se que a comparação dos dados relatados nesse trabalho com os apresentados na literatura, mesmo considerando as mesmas espécies de abelhas, deve ser realizada de forma cuidadosa, uma vez que a composição química dos própolis é variável e relaciona-se ainda com a flora presente na região em que a amostra foi coletada, bem como com o processo de extração dos mesmos (SFORCIN, 2016).

Nesse sentido, os resultados obtidos nesse trabalho, em relação ao própolis verde, corroboram com os dados relatados na literatura. Bittencourt *et al.* (2015) demonstraram que o extrato etanólico de própolis verde apresentou CIM de 500 µg/mL contra *S. aureus* (ATCC 6538), mesma estirpe utilizada neste estudo. Em outro estudo (DANTAS SILVA *et al.*, 2017), foi demonstrado que o extrato de própolis verde apresentou atividade moderada a baixa contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. faecalis* (ATCC 29212), em parte corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Maiores discrepâncias foram observadas ao comparar os resultados obtidos e relacionados ao potencial antimicrobiano de abelhas-sem-ferrão. Nesse sentido, o potencial antimicrobiano do extrato de mandaçaia foi superior ao obtido no estudo realizado por Torres *et al.* (2018), que demonstraram que o extrato etanólico (80%) de mandaçaia da mesma subespécie apresentou CIM > 1000 µg/mL para *S. aureus* (ATCC 25923), MRSA (isolado de paciente) e *E. faecalis* (ATCC 29212). Entretanto,

quando comparado os dados obtidos nesse estudo aos apresentados por Rubinho *et al.* (2019), os quais avaliaram o potencial antimicrobiano de um extrato etanólico da subespécie de mandaçaia *M. quadrifasciata anthidioides* contra *S. aureus* (ATCC 6538), observou-se uma eficácia bastante inferior nesta cepa, uma vez que os autores obtiveram valores de CIM que variaram na faixa de 62,5 a 125 µg/mL. Até o presente momento, não foram encontrados artigos que relatassem o potencial antimicrobiano de plebeia contra as cepas avaliadas neste estudo, inviabilizando dessa forma, a realização de comparação da eficácia.

Finalmente, sugere-se que o efeito antimicrobiano dos extratos de plebeia e de mandaçaia contra MSSA, MRSA e *E. faecalis* (ATCC 29212) pode ser atribuído principalmente à presença de compostos diterpênicos, ácido gálico (composto 1) e totarol (27), uma vez que relatos da literatura mostram que uma maior atividade antibacteriana de própolis de abelhas-sem-ferrão está relacionada a uma alta proporção de ácidos diterpênicos, como observado para o extrato de plebeia, ou uma elevada quantidade de ácidos diterpênicos e ácido gálico, como verificado para o extrato de mandaçaia (VELIKOVA *et al.*, 2000). Ainda, em relação ao potencial antimicrobiano de plebeia, este pode estar relacionado à presença do composto 27 (totarol), o qual exibiu potente atividade bactericida contra cepas de MRSA (MUROI; KUBO, 1994).

5.5 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INTERAÇÃO EXERCIDO PELAS COMBINAÇÕES DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para a verificação do tipo de efeito induzido pela combinação de extratos de própolis a agentes antimicrobianos, foram usados os extratos de mandaçaia e plebeia, que apresentaram os melhores resultados de CIM, bem como cepas bacterianas que possuem mecanismos de resistência ou que necessitam de altas doses de antibióticos para sua eliminação do organismo humano tais como: MRSA, *E. faecalis* (ATCC 29212) e *E. faecalis* VRE e HLAR. Dessa forma, os antimicrobianos selecionados para a execução destes ensaios foram aqueles aos quais bactérias tem desenvolvido mecanismos de resistência e/ou que são utilizados no tratamento de infecções causadas pelas bactérias selecionadas, tais como gentamicina, oxacilina e vancomicina.

A gentamicina é um antibiótico que é transportado ativamente para dentro da bactéria, em um mecanismo dependente de oxigênio, sendo, portanto, ineficaz em bactérias anaeróbias. Uma vez no citoplasma, a gentamicina se liga ao RNAr 16s na subunidade ribossômica 30s, interferindo na tradução do RNAm e, levando à formação de proteínas truncadas ou não funcionais. O mecanismo da atividade bactericida da gentamicina ainda não foi totalmente elucidado. Alguns autores propõem que tais proteínas truncadas são direcionadas à parede celular, tornando-a permeável. Já outros autores sugerem que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, como consequência da depleção de proteínas envolvidas com reações de oxidação-redução, pode levar à morte bacteriana (CHAVES; TADI, 2022).

A oxacilina é um antibiótico da classe dos β -lactâmicos, que atua ligando-se às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), enfraquecendo ou interferindo na formação da parede celular. Após a ligação às PBPs, a parede celular sofre ruptura e lise. A oxacilina tem um espectro de atividade limitado que inclui principalmente bactérias gram-positivas. Possui resistência à β -lactamase produzida por *Staphylococcus* spp., sendo um dos antibióticos da classe dos β -lactâmicos penicilinase resistentes (PAPICH, 2016).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo que exerce seu efeito bactericida inibindo a polimerização de peptidoglicanos na parede celular bacteriana, que é formada por uma camada rígida de peptidoglicano com uma estrutura altamente reticulada composta por polímeros longos de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina. A vancomicina liga-se à D-alanil-D-alanina, que inibe a peptidoglicano sintase, impedindo assim a síntese e polimerização do ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina dentro da camada de peptidoglicano. Essa inibição enfraquece as paredes celulares bacterianas permitindo o extravazamento de componentes intracelulares, e resultando em morte celular bacteriana. A vancomicina somente é ativa contra bactérias gram-positivas (PATEL; PREUSS; BERNICE, 2022).

Staphylococcus aureus meticilina resistente (MRSA) foi a primeira bactéria importante na crise da resistência antimicrobiana. Dados demonstram que a MRSA é responsável por 60-89% das infecções nosocomiais. Atualmente, tal cepa também está difundida na comunidade e apresenta capacidade de adaptação a diferentes mecanismos antimicrobianos mediados por resistência adquirida (CATTOIR; LECLERCQ, 2010). A MRSA é resistente a numerosos antibióticos β -lactâmicos (incluindo a oxacilina, um antibiótico de primeira linha usado contra *S. aureus*)

principalmente devido a aquisição do gene *mecA*, que codifica a proteína alterada de ligação à penicilina PBP2a (FAIR; TOR, 2014).

As cepas de *Enterococcus* VRE e HLAR, por serem resistentes ao sinergismo entre os aminoglicosídeos e compostos que atuam na parede celular bacteriana (como glicopeptídeos e β -lactâmicos), criaram desafios para a antibioticoterapia de infecções complicadas ou sistêmicas causadas por espécies deste gênero (YILMAZ; ÖZCENGİZ, 2017).

Ainda é pertinente ressaltar que, além da resistência, o uso de diversos antimicrobianos, como os investigados neste estudo, pode levar ao desencadeamento de efeitos adversos ou tóxicos aos pacientes (BAILIE; NEAL, 1988; RYBAK *et al.*, 2009; AVENT *et al.*, 2011).

Para os aminoglicosídeos, como a gentamicina, a dose terapêutica é considerada estreita e muito próxima da dose tóxica. Dessa forma, o uso desses antibióticos pode gerar uma série de efeitos adversos e tóxicos, sendo os principais associados ao seu uso a ototoxicidade e a nefrotoxicidade (AVENT *et al.*, 2011). Ainda, tem sido relatado que em células ciliadas auriculares, os aminoglicosídeos podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (HUTH; RICCI; CHENG, 2011). Por fim, aminoglicosídeos, quando administrados em altas concentrações podem se acumular nos lisossomos de células tubulares renais onde podem interferir em importantes processos, tais como respiração mitocondrial (MINGEOT-LECLERCQ; TULKENS, 1999).

A vancomicina é geralmente usada no tratamento de infecções por MRSA. Tem sido observado que o regime de dosagem, bem como o intervalo de administração influenciam na incidência de efeitos colaterais, os quais incluem nefrotoxicidade, fototoxicidade e danos ao nervo auditivo, que podem resultar em perda da audição (BAILIE; NEAL, 1988; RYBAK *et al.*, 2009).

Nesse trabalho, o tipo de interação entre as combinações de própolis de mandaçaia e de plebeia aos antimicrobianos (gentamicina, vancomicina e oxacilina) foram avaliadas, primeiramente, pela execução do ensaio de *checkerboard*. Pode-se observar que ambos os extratos de própolis exibiram efeito sinérgico com gentamicina contra *E. faecalis* (ATCC 29212). Ainda, foi demonstrado que o extrato de plebeia apresentou sinergismo com todos os antimicrobianos avaliados contra MRSA, enquanto o extrato de mandaçaia não afetou a ação desses antibióticos. Por fim, pode-se verificar que o extrato de mandaçaia não apresentou efeito sinérgico com a

vancomicina contra a estirpe VRE e HLAR (TABELA 5). Salienta-se que o extrato de plebeia não foi testado com a vancomicina contra a cepa *E. faecalis* (ATCC 51299) porque não foi possível determinar a CIM do extrato nesta estirpe (TABELA 4).

TABELA 5 - RESULTADOS DO ENSAIO DE CHECKERBOARD COM CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (CIF) E ÍNDICES CIF DA COMBINAÇÃO DE DOIS COMPOSTOS ENTRE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E ANTIBIÓTICOS CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.

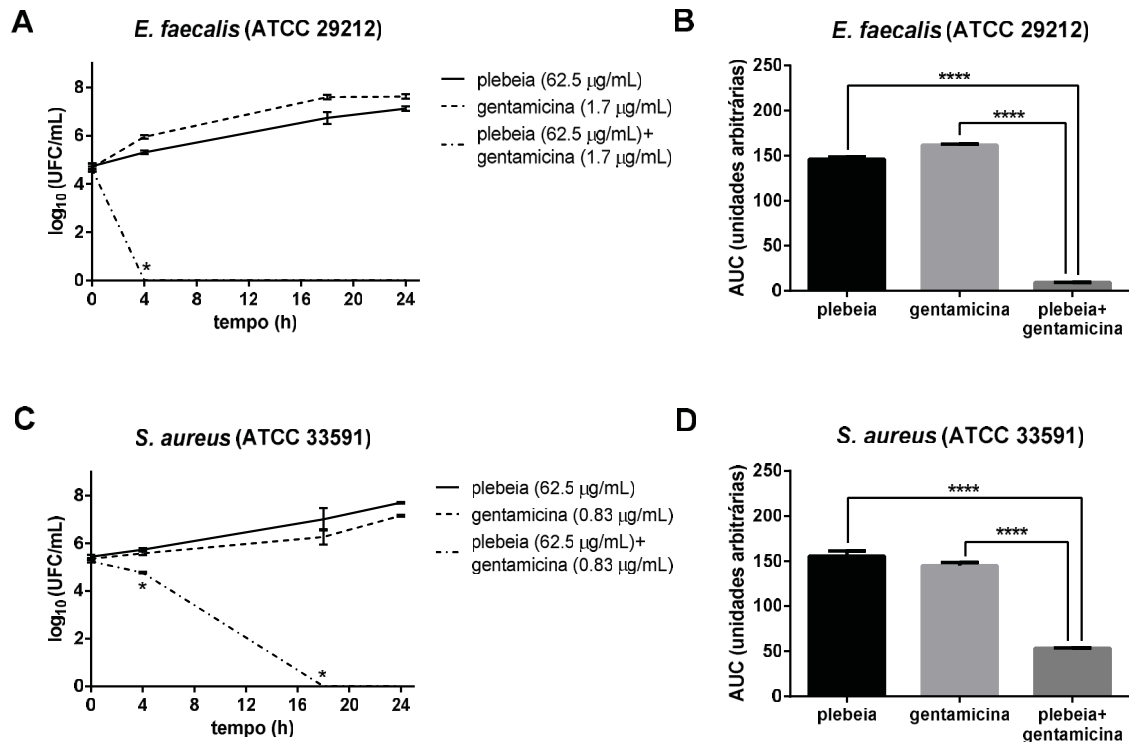
Bactérias		CIM (µg/mL)		CIF	ICIF	Interpretação
		Isolado	Combinação			
<i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	Mandaçaia	250	62,5	0,25	0,55	NI
	Gentamicina	3,3	1	0,3		
	Plebeia	250	31,25	0,13	0,17	Sinergismo
	Gentamicina	3,3	0,125	0,04		
	Mandaçaia	250	125	0,50	0,75	NI
	Oxacilina	32	8	0,25		
	Plebeia	250	62,5	0,25	0,5	Sinergismo
	Oxacilina	32	8	0,25		
	Mandaçaia	250	125	0,50	1,0	NI
	Vancomicina	2	1	0,50		
	Plebeia	250	62,5	0,25	0,5	Sinergismo
	Vancomicina	2	0,5	0,25		
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	Mandaçaia	333	125	0,38	0,45	Sinergismo
	Gentamicina	6,7	0,5	0,07		
	Plebeia	250	31,25	0,13	0,2	Sinergismo
<i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)	Gentamicina	6,7	0,5	0,07		
	Mandaçaia	500	125	0,25	0,85	NI
	Vancomicina	107	64	0,6		

NOTA: Extratos de própolis de mandaçaia ou plebeia foram combinados com gentamicina, oxacilina ou vancomicina e testados contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591) e com gentamicina contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 29212). O extrato de própolis de mandaçaia também foi combinado com vancomicina contra *E. faecalis* (ATCC 51299). CIM – concentração inibitória mínima, CIF – concentração inibitória fracional, ICIF – índice de concentração inibitória fracional, NI – não interativo.

FONTE: A autora (2022).

Para confirmar os efeitos observados no teste de *checkerboard*, foi realizado o ensaio de *time-kill*. Este ensaio foi realizado com os mesmos extratos de própolis, cepas bacterianas e antibióticos usados para determinação do *checkerboard*.

FIGURA 14 - EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA, GENTAMICINA OU AMBOS COMBINADOS CONTRA *E. faecalis* (ATCC 29212) E *S. aureus* (ATCC 33591).

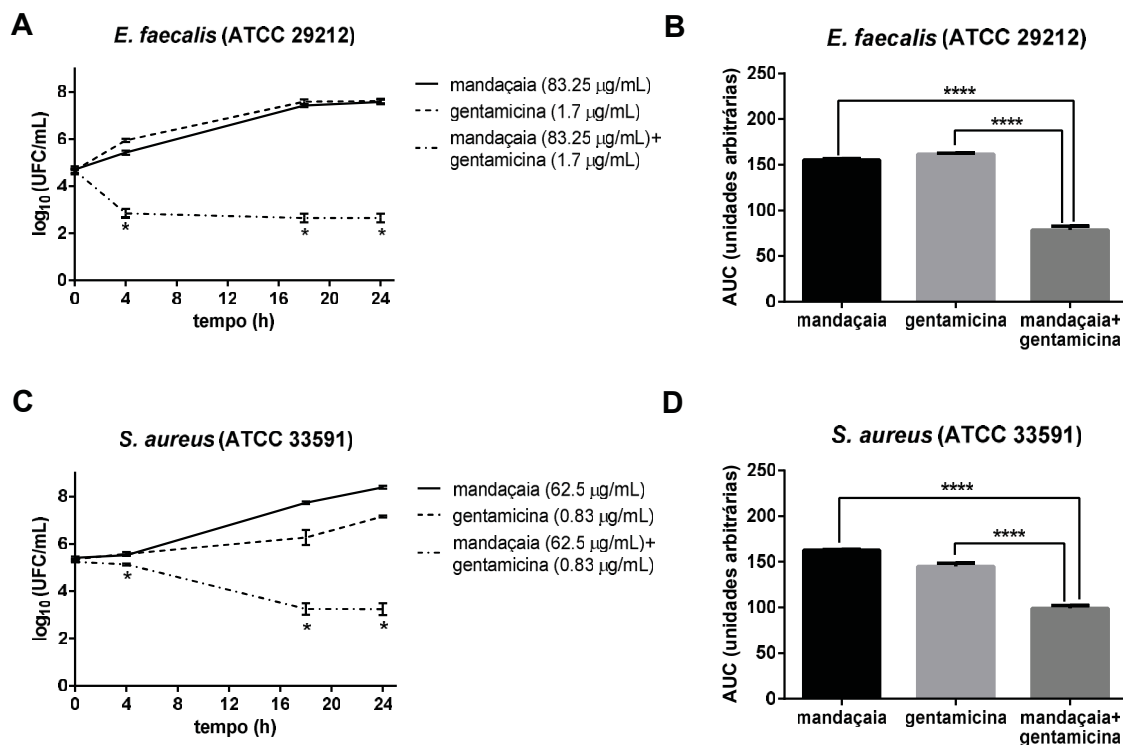


NOTA: Curvas de *time-kill* de efeitos simultâneos do extrato de própolis de plebeia e gentamicina contra (A) *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 29212) e (C) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). * $p < 0,05$, denota diferença estatística entre a combinação e extrato de própolis e antibiótico aplicados isoladamente. UFC - unidade formadora de colônias. Área sob a Curva (AUC) de efeitos simultâneos do extrato de própolis de plebeia e gentamicina contra (B) *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 29212) e (D) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). **** $p < 0,0001$. Os dados são médias e desvios padrão (DP) de três experimentos independentes. FONTE: A autora (2022).

Na estirpe *E. faecalis* (ATCC 29212), a associação do extrato de própolis de plebeia com gentamicina se mostrou sinérgica, ou seja, houve diminuição de 100 vezes em relação ao agente mais ativo aplicado isoladamente, que neste caso foi o extrato, e também em relação ao inóculo inicial. A combinação apresentou efeito bactericida, pois eliminou a contagem bacteriana em placa, a partir de 4 h, indicando morte do microrganismo (FIGURA 14-A). No gráfico de AUC, que representa o efeito global induzido pelos tratamentos, é possível verificar que houve diferença estatística entre o efeito promovido pela associação em relação ao efeito induzido pelo antimicrobiano e pelo extrato, com uma diminuição em torno de 150 e de 130 unidades arbitrárias de AUC em relação a gentamicina e ao própolis, respectivamente (FIGURA 14-B).

Na estirpe *S. aureus* (ATCC 33591 – MRSA), foi demonstrado que a mesma combinação parece ter apresentado sinergismo com efeito bactericida, o qual foi detectado apenas às 18 horas de tratamento (FIGURA 14-C). Esses resultados demonstram maior resistência da estirpe MRSA a associação do extrato de própolis plebeia com a gentamicina em comparação à estirpe *E. faecalis* (ATCC 29212). No gráfico da área sob a curva, verificou-se que a combinação elevou significativamente o efeito antimicrobiano do própolis e da gentamicina, promovendo uma diminuição em torno de 90 e de 100 unidades arbitrárias de AUC em relação à gentamicina e ao extrato de própolis, respectivamente (FIGURA 14-D).

FIGURA 15 - EFEITOS DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA, GENTAMICINA OU AMBOS COMBINADOS CONTRA *E. faecalis* (ATCC 29212) E *S. aureus* (ATCC 33591).



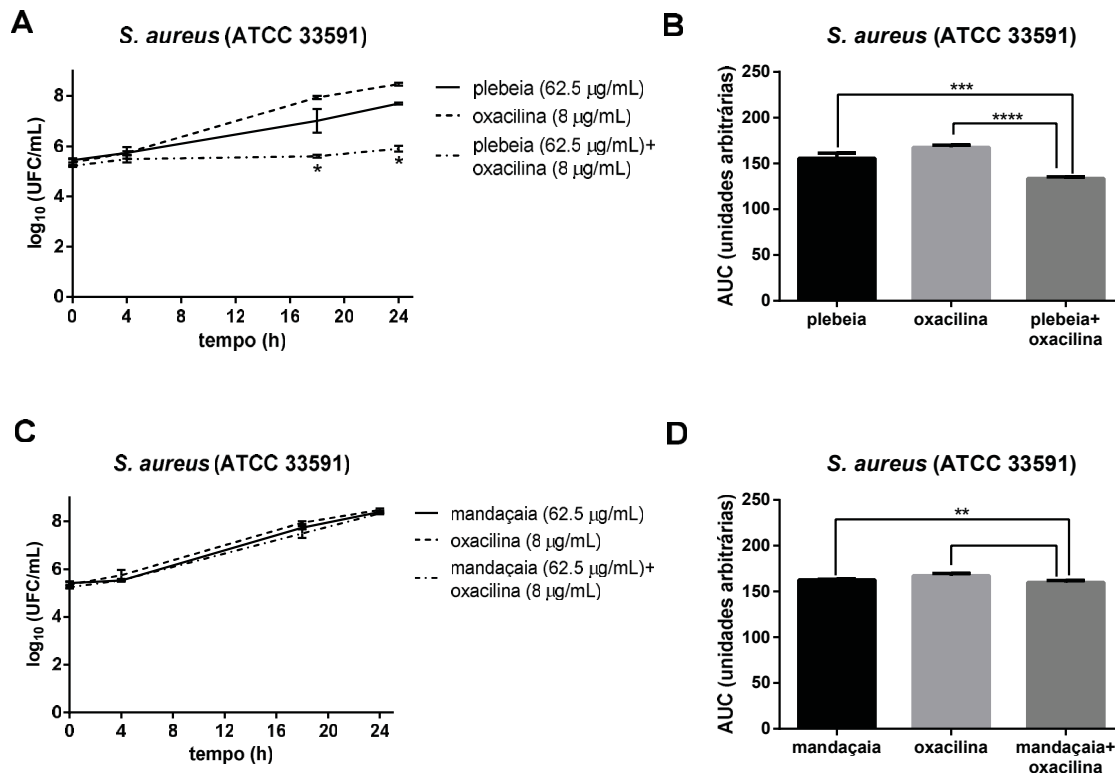
NOTA: Curvas de *time-kill* de efeitos simultâneos do extrato de própolis de mandaçai e gentamicina contra (A) *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 29212) e (C) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). * $p < 0,05$, denota diferença estatística entre a combinação e extrato de própolis e antibiótico aplicados isoladamente. UFC - unidade formadora de colônias. Área sob a Curva (AUC) de efeitos simultâneos do extrato de própolis de mandaçai e gentamicina contra (B) *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 29212) e (D) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). **** $p < 0,0001$. Os dados são médias e desvios padrão (DP) de três experimentos independentes. FONTE: A autora (2022).

Na estirpe *E. faecalis* (ATCC 29212), a associação do extrato de própolis de mandaçaia com gentamicina também se mostrou sinérgica, entretanto, desta vez, a combinação apresentou efeito bacteriostático, tendo sido observada queda na contagem microbiana até 4 h, seguida de uma estabilização no número de colônias até as 20 h subsequentes (FIGURA 15-A). No gráfico de AUC, foi observada uma diminuição em torno de 80 e de 75 unidades arbitrárias em relação à gentamicina e mandaçaia, respectivamente (FIGURA 15-B).

Na estirpe *S. aureus* (ATCC 33591 – MRSA), a combinação do extrato de própolis de mandaçaia com gentamicina também apresentou sinergismo com efeito bacteriostático, o qual foi detectado apenas às 18 horas (FIGURA 15-C), mostrando mais uma vez maior resistência da estirpe MRSA à associação em relação à estirpe *E. faecalis* (ATCC 29212). No gráfico de AUC, verificou-se uma diminuição em torno de 45 e de 60 unidades arbitrárias em relação à gentamicina e a mandaçaia, respectivamente (FIGURA 15-D).

Por fim, é importante ressaltar que o resultado do ensaio de *time-kill* na estirpe *E. faecalis* (ATCC 29212) corroborou o ensaio de *checkerboard*, no entanto, na estirpe MRSA o resultado foi contraditório, provavelmente em virtude do ensaio de *time-kill* ser mais sensível que o ensaio de *checkerboard*.

FIGURA 16 - EFEITOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA OU MANDAÇAIA, OXACILINA, OU DOS EXTRATOS COMBINADOS COM O OXACILINA CONTRA *S. aureus* (ATCC 33591).



NOTA: Curvas de *time-kill* de efeitos simultâneos do extrato de própolis de plebeia e oxacilina (A) ou mandaçaia e oxacilina (C) contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). * $p < 0,05$, denota diferença estatística entre a combinação e extrato de própolis e antibiótico aplicados isoladamente. UFC - unidade formadora de colônias. Área sob a Curva (AUC) de efeitos simultâneos do extrato de própolis de plebeia e oxacilina (B) ou mandaçaia e oxacilina (D) contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Os dados são médias e desvios padrão (DP) de três experimentos independentes.
 FONTE: A autora (2022).

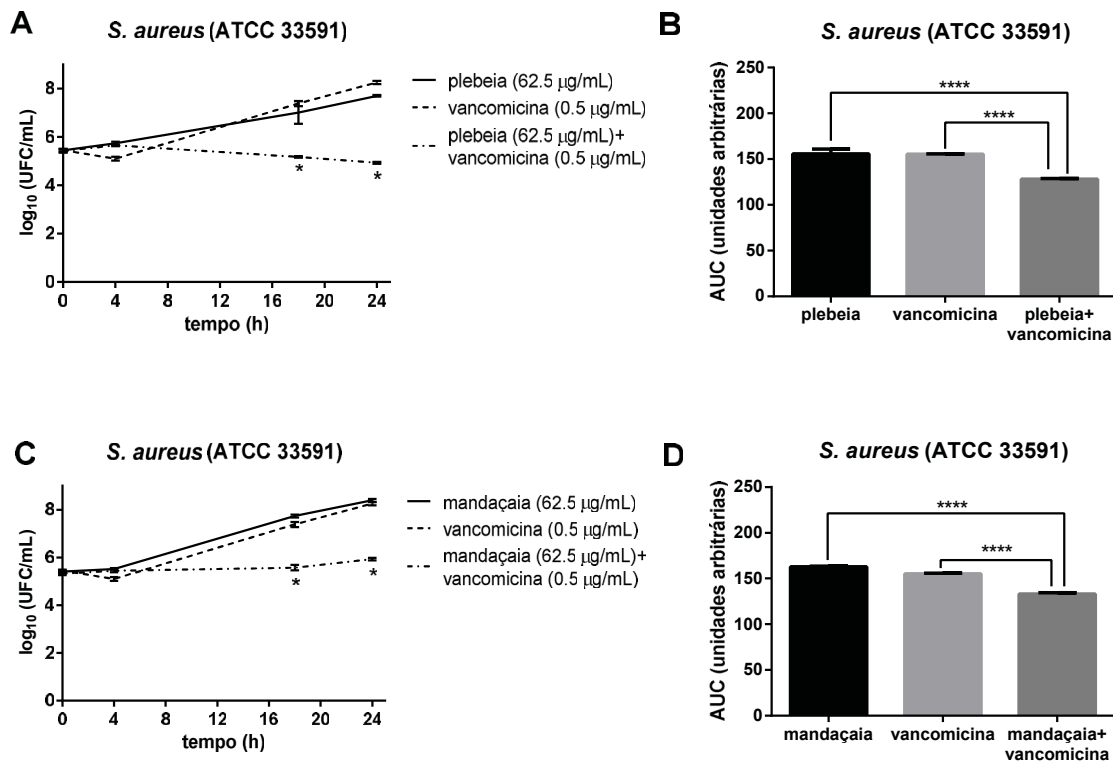
Na estirpe *S. aureus* (ATCC 33591 – MRSA), a associação do extrato de própolis de plebeia com oxacilina não apresentou sinergismo, não havendo diminuição de 100 vezes em relação ao agente mais ativo aplicado isoladamente (que neste caso foi o extrato), nem em relação ao inóculo inicial (FIGURA 16-A). Entretanto, observou-se que a associação promoveu significativa redução no efeito antimicrobiano global, refletido por uma redução de 20 unidades arbitrárias de AUC em relação ao extrato e de 30 em relação à oxacilina, respectivamente (FIGURA 16-B).

Na mesma estirpe, a associação do extrato de própolis de mandaçaia com oxacilina não apresentou sinergismo, tendo a curva de *time-kill* um comportamento similar aos dos agentes aplicados isoladamente (FIGURA 16-C). Ainda, observou-se que a combinação elevou significativamente o efeito antimicrobiano apenas em

relação ao extrato de mandaçaia, promovendo uma diminuição inferior a 10 unidades arbitrárias de AUC em relação a esse própolis (FIGURA 16-D).

O resultado do ensaio de *time-kill* da combinação da oxacilina com o extrato de mandaçaia corroborou com o ensaio de *checkerboard*, no entanto, o resultado da combinação da oxacilina com o extrato de plebeia foi contraditório. Como o ensaio de *time-kill* é mais sensível que o de *checkerboard*, fica evidente que nenhuma das associações foi capaz de reverter a resistência da estirpe MRSA à oxacilina.

FIGURA 17 - EFEITOS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE PLEBEIA OU MANDAÇAIA, VANCOMICINA, OU DOS EXTRATOS COMBINADOS COM VANCOMICINA CONTRA *S. aureus* (ATCC 33591).



NOTA: Curvas de *time-kill* de efeitos simultâneos do extrato de própolis de plebeia e vancomicina (A) ou mandaçaia e vancomicina (C) contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591). * $p < 0,05$, denota diferença estatística entre a combinação e extrato de própolis e antibiótico administrado isoladamente. UFC - unidade formadora de colônias. Área sob a Curva (AUC) de efeitos simultâneos do extrato de própolis de plebeia e vancomicina (B) ou mandaçaia e vancomicina (D) contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* - ATCC 33591).**** $p < 0,0001$. Os dados são médias e desvios padrão (DP) de três experimentos independentes.
 FONTE: A autora (2022).

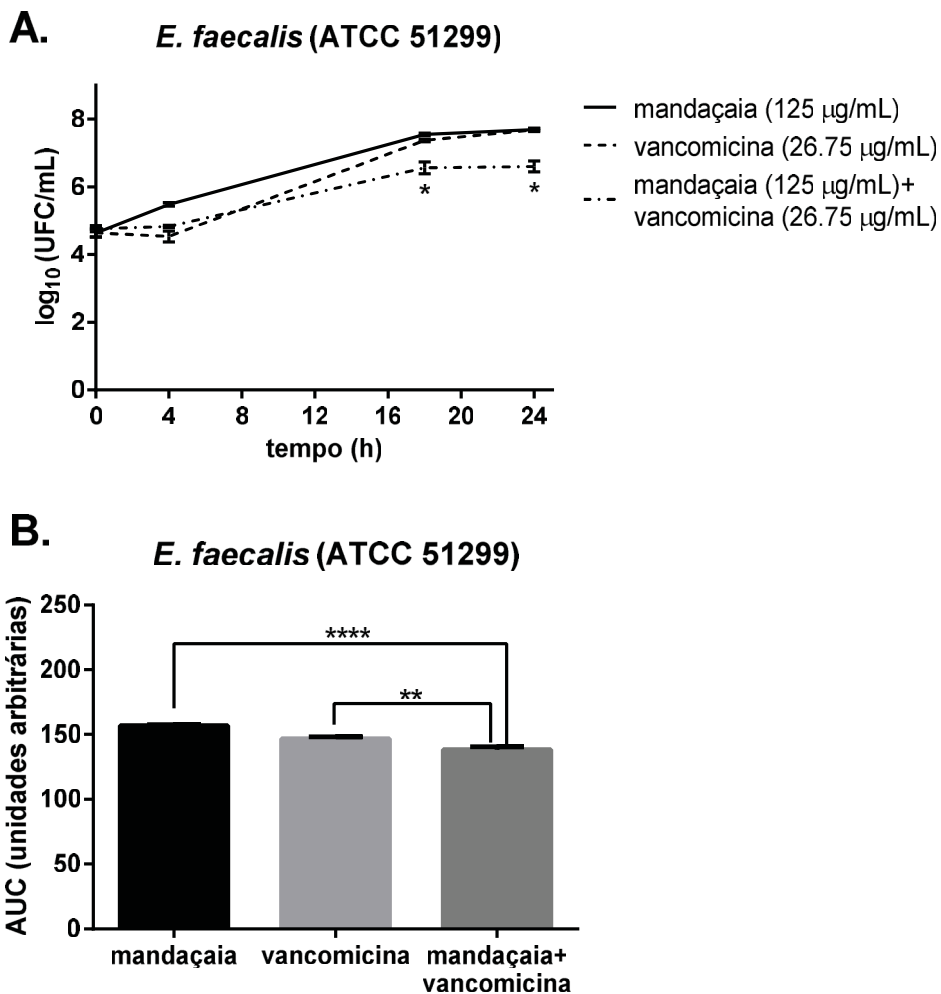
Na estirpe *S. aureus* (ATCC 33591 – MRSA), a associação do extrato de própolis de plebeia com vancomicina não apresentou sinergismo, não havendo diminuição de 100 vezes em relação ao inóculo inicial, no entanto, houve diminuição de 100 vezes

em relação ao agente mais ativo aplicado isoladamente, que neste caso foi o extrato de própolis (FIGURA 17-A). Entretanto, verificou-se que a combinação foi capaz de aumentar significativamente o efeito antimicrobiano tanto em relação ao própolis, quanto em relação ao extrato, uma vez que induziu uma diminuição em torno de 20 unidades arbitrárias de AUC em relação à vancomicina, bem como de 30 unidades arbitrárias de AUC em relação a plebeia (FIGURA 17-B).

Na mesma estirpe, apesar da associação do extrato de própolis de mandaçaia com vancomicina também não ter apresentado sinergismo (FIGURA 17-C), observou-se que a mesma elevou significativamente a ação antibacteriana do antimicrobiano e do extrato, com uma diminuição 20 unidades arbitrárias de AUC em relação à vancomicina e de 30 unidades arbitrárias de AUC em relação a mandaçaia (FIGURA 17-D).

O resultado do ensaio de *time-kill* da combinação da vancomicina com o extrato de mandaçaia corroborou o ensaio de *checkerboard*, no entanto, o resultado da combinação da vancomicina com o extrato de plebeia foi contraditório. Novamente, considerando-se o fato de o ensaio de *time-kill* ser mais sensível que o do *checkerboard*, verifica-se que nenhuma das associações foi capaz de sensibilizar a estirpe MRSA à vancomicina.

FIGURA 18 - EFEITOS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DE MANDAÇAIA, VANCOMICINA, OU AMBOS COMBINADOS CONTRA *E. faecalis* (ATCC 51299).



NOTA: Curvas de *time-kill* de efeitos simultâneos do extrato de própolis de mandaçãia e vancomicina (A) contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 51299). * $p < 0,05$, denota diferença estatística entre a combinação e extrato de própolis e antibiótico aplicado isoladamente. UFC - unidade formadora de colônias. Área sob a Curva (AUC) de efeitos simultâneos do extrato de própolis de mandaçãia e vancomicina (B) contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* - ATCC 51299). ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Os dados são médias e desvios padrão (DP) de três experimentos independentes. FONTE: A autora (2022).

Na estirpe *E. faecalis* (ATCC 51299 – VRE e HLAR), a associação do extrato de própolis de mandaçãia com vancomicina não apresentou sinergismo, não havendo diminuição de 100 vezes em relação ao inóculo inicial nem em relação ao agente mais ativo aplicado isoladamente, o qual neste caso não pôde ser determinado, visto que mandaçãia e vancomicina exerceram efeitos semelhantes (FIGURA 18-A). Esse resultado confirmou o ensaio de *checkerboard*, corroborando que a associação não foi capaz de reverter a resistência da estirpe *E. faecalis* (ATCC 51299) à vancomicina.

Entretanto, pode-se observar que a combinação foi capaz de aumentar o efeito antimicrobiano do própolis e da vancomicina, com uma diminuição de 8 unidades arbitrárias de AUC em relação ao antimicrobiano e de 18 unidades arbitrárias de AUC em relação a mandaçaia (FIGURA 18-B).

Apesar do extrato de plebeia ter apresentado sinergismo mais potente com a gentamicina em comparação ao efeito promovido pelo extrato de mandaçaia, uma vez que a combinação de gentamicina com plebeia teve efeito bactericida, enquanto a combinação de gentamicina com mandaçaia apresentou efeito bacteriostático, este não é o único fator que deve ser considerado na determinação de qual dos extratos é o mais promissor em combinação com o agente antimicrobiano. Nesse sentido, deve-se também levar em consideração o critério seletividade, o qual demonstra o quanto um própolis, em relação ao seu potencial antimicrobiano, atua de forma específica sobre determinadas cepas bacterianas, sem promover efeitos deletérios significativos em células e/ou órgãos do hospedeiro durante uma infecção.

Tendo como base o resultado obtido no teste de citotoxicidade na linhagem celular McCoy (TABELA 3), pode-se observar que a concentração sinérgica do extrato de mandaçaia utilizada nos testes de *time-kill* foi inferior ao seu valor de CI_{50} determinado para estas células. Esses dados demonstraram que a citotoxicidade do extrato foi mais específica para bactérias do que para a linhagem celular não tumoral, o que provavelmente estaria relacionado à menor ocorrência de efeitos adversos. Já o extrato de plebeia exibiu sinergismo com a gentamicina, em uma concentração maior do que seu CI_{50} contra células McCoy. Esses resultados sugerem que esse própolis apresenta citotoxicidade inespecífica contra a bactéria, atuando também de forma significativa nos fibroblastos, e indicando que seu uso como agente antimicrobiano, juntamente à gentamicina, pode desencadear na incidência de efeitos adversos e/ou tóxicos.

Por fim, é importante destacar que estudos de sinergismo entre extratos de própolis de abelhas-sem-ferrão e antibacterianos são raros e não exploram a seletividade, sendo este trabalho inédito nesse sentido.

Assim, em relação à segurança e eficácia, os efeitos sinérgicos da mandaçaia com o agente testado são mais promissores que os do extrato de própolis de plebeia. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o própolis de mandaçaia é mais promissor que o extrato de plebeia em relação ao seu uso combinado com

gentamicina, uma vez que pode reduzir a resistência e a incidência de efeitos adversos ou tóxicos relacionados ao uso desse antimicrobiano.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais conclusões referentes a este capítulo são:

- Foram tentativamente identificados 63 compostos nos extratos de própolis analisados;
- Os extratos de própolis apresentaram toxicidade seletiva frente às linhagens tumorais analisadas;
- Os extratos de mandaçaia e de plebeia potencializaram a ação da doxorrubicina em células de adenocarcinoma cervical e mamário, respectivamente;
- Exceto o própolis de tubuna, os demais extratos de própolis apresentaram atividade contra estirpes de bactérias gram-positivas e nenhum extrato apresentou atividade contra estirpes gram-negativas;
- Os extratos de mandaçaia e de plebeia apresentaram sinergismo com gentamicina em estirpes bacterianas gram-positivas, entretanto, somente o extrato de mandaçaia exerceu efeito seletivo;
- Os extratos de própolis de mandaçaia e de plebeia podem ser fontes de agentes antitumorais e antimicrobianos capazes de reduzir a resistência ou a indução de efeitos adversos relacionados ao uso de doxorrubicina e gentamicina.

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA E POTENCIAL USO NA INDÚSTRIA DE PRÓPOLIS OBTIDOS DE ABELHAS-SEM-FERRÃO E PRÓPOLIS DO TIPO VERDE

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar quimicamente e realizar uma análise quimiométrica de própolis do tipo verde (abelhas africanizadas) e obtidos de abelhas-sem-ferrão (tribo Meliponini) para avaliar seu potencial uso industrial.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente três extratos de própolis obtidos de abelhas-sem-ferrão (tribo Meliponini) e um própolis verde (abelhas africanizadas);
- Desenvolver e validar um método quimiométrico utilizando ATR-IR para autenticação dos extratos de própolis;
- Quantificar o conteúdo de fenólicos e de flavonoides totais a fim de usá-los como parâmetros de controle de qualidade;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos utilizando o método de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
- Avaliar o potencial uso industrial de própolis obtidos de abelhas-sem-ferrão de acordo com a legislação brasileira vigente para industrialização e comercialização [IN nº3 (2001) – MAPA].

8 REVISÃO DE LITERATURA

8.1 CONTROLE DE QUALIDADE DO PRÓPOLIS E TÉCNICAS A SEREM APLICADAS PARA ESTA FINALIDADE

A composição química do própolis é muito complexa e variável, devido à espécie de abelha que o produziu e também da fonte vegetal disponível. Logo, conhecer a origem geográfica e, sobretudo, a fonte vegetal do habitat das abelhas que o produziram é importante para o controle de qualidade e a padronização das amostras de própolis, objetivando uma efetiva aplicação comercial e terapêutica (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Nesse sentido, já existem vários estudos na literatura sobre os benefícios à saúde e a composição química de diferentes tipos de própolis, além dos fatores que afetam esta composição e os problemas associados à padronização (SALATINO *et al.*, 2011; BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; SHAHINOZZAMAN; OBANDA; TAWATA, 2021). No entanto, informações abrangentes sobre a diversidade química, compostos marcadores geográficos e biológicos, e as técnicas analíticas usadas para a padronização e controle de qualidade do própolis, não foi compilada de forma coletiva e abrangente (KASOTE; BANKOVA; VILJOEN, 2022).

O própolis não é consumido em sua forma bruta devido à presença de material inerte, sendo purificado com solventes para remover esse material e enriquecer o conteúdo polifenólico. O solvente mais utilizado é o etanol diluído (70%) (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019). Para caracterizar esses extratos, do ponto de vista químico, estão disponíveis várias técnicas instrumentais, que serão discutidas a seguir.

A espectroscopia de ultravioleta é um método de aplicação simples e amplamente difundido, que não destrói as amostras e é utilizado para caracterização química de produtos apícolas e em diversos produtos agroalimentares. No entanto, sua baixa seletividade dificulta o uso na análise de amostras complexas, devido à grande quantidade de dados a serem tratados. Em alguns casos, a aplicação dessa técnica permite obter espectros semelhantes, razão pela qual a espectroscopia de ultravioleta está frequentemente associada a métodos quimiométricos, os quais

diferenciam as amostras de acordo com sua origem geográfica ou época de produção (MALDONADO *et al.*, 2020).

Devido à capacidade de análise de *fingerprinting*, as modernas técnicas espectroscópicas vibracionais, tais como o infravermelho médio (MIR), o infravermelho próximo (NIR) e o Raman, além de atenderem aos principais requisitos analíticos, como velocidade de análise e facilidade de uso. Quando combinadas com técnicas quimiométricas, são altamente eficientes em distinguir tipos de espécies, bem como origens geográficas de produtos naturais (WANG; YU, 2015). O MIR, quando acoplada a um dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), permite a aquisição de espectros de amostras tanto líquidas quanto sólidas. É uma técnica não destrutiva, que não necessita de solventes ou preparo da amostra, tornando-se uma alternativa atraente aos métodos analíticos tradicionais (RODRIGUEZ-SAONA; ALLENDORF, 2011; DA SILVA *et al.*, 2018; GRDADOLNIK, 2002). No caso de extratos de própolis, esta técnica já foi combinada com quimiometria para a determinação de compostos fenólicos totais e do potencial antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica bastante versátil, sendo particularmente adequada a análise de amostras complexas, como extratos de plantas ou seus metabólitos (BANKOVA *et al.*, 2019). Desta forma, a HPLC ainda é a técnica de separação preferida para a análise de produtos naturais (STEINMANN; GANZERA, 2011). Além disso, apresenta como vantagem a utilização de diferentes detectores, os quais são selecionados de acordo com os analitos a serem investigados. Dentre os detectores mais usados para analisar os mais variados tipos de própolis, podem-se citar os detectores de matriz de diodo (DAD) e a espectrometria de massas (MS) (BANKOVA *et al.*, 2019).

Outra adaptação para a otimização da técnica de HPLC e seu emprego para a análise de produtos naturais inclui a realização de uma separação rápida e ultrarrápida, que pode ser realizada com colunas empacotadas com partículas sub-2 µm operando em sistemas de ultra pressão, conhecidos como UPLC (NICOLI *et al.*, 2005; BANKOVA *et al.*, 2019).

A natureza relativamente polar dos constituintes da própolis (com vários grupos hidroxila em sua estrutura), combinado com técnicas de ionização suave compatíveis com cromatografia líquida, tornam a cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a detector de matriz diodo UV-Vis (HPLC-DAD) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) os métodos favoritos para análise do

conteúdo balsâmico dessa amostra (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Na identificação de novos compostos, tanto espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) no modo negativo (FALCÃO *et al.*, 2010) ou no modo positivo (PICCINELLI *et al.*, 2011) são satisfatórias.

As condições cromatográficas dos métodos de HPLC incluem, quase exclusivamente, o uso de detector DAD com dados espectrais para todos os picos adquiridos na faixa de 200-600 nm, embora 280 nm seja o comprimento de onda mais genérico para compostos fenólicos, devido à alta absorvidade molar das diferentes classes fenólicas nesse comprimento de onda. No que diz respeito aos analisadores de massa, o *iontrap* é o mais recomendado para o perfil (*fingerprinting*) de amostras de própolis, uma vez que é especialmente projetado para várias etapas de fragmentação (MSⁿ) (DE RIJKE *et al.*, 2006).

Na técnica de HPLC, a elucidação estrutural de diferentes classes de compostos de própolis é obtida comparando seu comportamento cromatográfico, espectros de UV e informações de MS, com os dos compostos de referência. Quando padrões não são disponíveis, a identidade dos compostos pode ser alcançada através da comparação dos espectros de íons produto e tempos de retenção com compostos puros isolados de própolis ou, alternativamente, combinando dados de UV com padrões de fragmentação MS previamente relatados na literatura (FALCÃO *et al.*, 2013).

Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) é uma técnica analítica amplamente utilizada para a análise química de misturas complexas como o própolis. CG-MS combina os recursos da cromatografia em fase gasosa para separação de compostos e espectrometria de massas para identificar diferentes substâncias. Este método é usado para perfis químicos de própolis para as necessidades de análise comparativa, controle de qualidade e padronização. Antes da análise CG-MS, a derivatização dos extratos de própolis é necessária porque o própolis contém metabólitos que não são voláteis o suficiente para cromatografia em fase gasosa (GREENAWAY; SCAYSBROOK; WHATLEY, 1987). A identificação de compostos pode ser realizada usando pesquisas *on-line* em bibliotecas comerciais, comparação com dados de espectros da literatura e características de retenção de amostras autênticas. Se nenhum espectro de referência estiver disponível, a identificação pode ser realizada com base na fragmentação espectral de massa

característica. Nesses casos os compostos são descritos como “*estruturas prováveis*” (BANKOVA *et al.*, 2019).

Desde a sua descoberta, a ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido amplamente explorada como ferramenta de pesquisa em laboratórios analíticos em todo o mundo, com a finalidade de estudar a estrutura das moléculas (KWAN; HUANG, 2008). Além disso, a RMN pode ser usada para analisar misturas como extratos botânicos, alimentos e fluidos biológicos (FORSETH; SCHROEDER, 2011). Uma das principais vantagens desta técnica sobre outros métodos, é sua capacidade de fornecer estruturas e informações quantitativas sobre uma ampla gama de espécies químicas em um único experimento. Logo, apesar da análise de uma mistura por RMN ser complexa, é potencialmente informativa (LIN; SHAPIRO, 1997).

Existem duas estratégias principais para analisar misturas via RMN: separar os componentes da mistura antes da análise ou analisar a mistura como um todo (BANKOVA *et al.*, 2019). A primeira estratégia é utilizada quando o objetivo do trabalho é a caracterização de um composto isolado. A segunda estratégia tem como objetivo a obtenção de uma avaliação global da mistura em questão, sem qualquer outro tipo de pré-tratamento da amostra, exceto a eventual solubilização no solvente deuterado adequado. Os espectros obtidos são considerados como impressões digitais químicas dos produtos sob investigação. Neste caso, a análise dos espectros, que geralmente parecem muito complexos, requer ferramentas para o pré-tratamento do sinal e para a análise dos resultados, normalmente baseados em técnicas estatísticas multivariadas (PAPOTTI *et al.*, 2010). Uma plataforma analítica de metabolômica baseada em RMN acoplada a ferramentas de bioinformática, permitiu a caracterização e classificação de amostras de própolis brasileiras quanto ao *fingerprinting*, épocas de colheita e regiões de produção (MARASCHIN *et al.*, 2016).

8.2 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria é a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para resolver problemas de natureza química, envolvendo dados complexos (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Como visto anteriormente, muitas técnicas analíticas que podem ser empregadas na análise do controle de qualidade químico do própolis geram dados complexos, os quais necessitam do auxílio de ferramentas quimiométricas durante seu processamento, a

fim de serem interpretados. Métodos quimiométricos utilizando dados de espectroscopia são comumente empregados no campo analítico, ambiental e agroalimentar e foram confirmados como uma ferramenta eficaz, mais rápida e robusta em relação às comparações visuais tradicionais. Os métodos quimiométricos aumentam a resolução ou eficiência da separação das amostras, e sua integração com técnicas analíticas (espectroscópicas ou cromatográficas) (KUMAR; SHARMA, 2018).

Existem vários métodos quimiométricos, sendo que cada um deles deve ser usado de acordo com a natureza do estudo: identificação/ caracterização, discriminação/ classificação, controle de qualidade/ adulteração (REBIAI *et al.*, 2022).

Para métodos quimiométricos aplicados a dados espectroscópicos, a primeira etapa a ser seguida é o pré-processamento, visto que muitas vezes os espectros contêm componentes indesejados (os chamados ruídos), que podem afetar o resultado das análises quimiométricas (COZZOLINO *et al.*, 2011).

Os principais métodos de pré-processamentos incluem: imputação, transformação, filtragem, normalização e padronização e centralização. Esses métodos têm como objetivo correção de dispersão, correção de linha de base, melhoria de sinal e filtragem estatística de ruído de sinal (BERGAMASCHI *et al.*, 2020, DE FÁTIMA COBRE *et al.*, 2022). As técnicas de padronização e centralização são técnicas de pré-processamento para correção de espalhamento. A centralização na média (*mean centering*) é um procedimento de centralização comumente utilizado, que é um passo necessário antes de algumas abordagens quimiométricas, como regressão de análise de componentes principais (PCA) e mínimos quadrados parciais (PLS). Este protocolo garante que os resultados possam ser interpretados em termos de média-variância (COZZOLINO *et al.*, 2011).

Da mesma forma, técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionadas podem ser usadas para a avaliação preliminar das informações do conteúdo da matriz de dados. A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma dessas técnicas mais comuns e um método para quantificação da importância das variáveis. Ela simplifica a complexidade de dados, mantendo tendências e padrões com a menor perda possível da informação original. Ela faz isso transformando os dados em menores dimensões, que atuam como resumos de características. O PCA reduz os dados projetando-os geometricamente em dimensões inferiores chamadas componentes principais (PCs), com o objetivo de encontrar o melhor resumo dos dados usando um

número limitado de PCs. O primeiro PC é escolhido para minimizar a distância total entre os dados e sua projeção no PC. Ao minimizar esta distância, também se maximiza a variância dos pontos projetados (σ^2). O segundo (e subsequentes) PCs são selecionados de forma semelhante, com o requisito adicional de que não sejam correlacionados com os PCs anteriores. Por exemplo, a projeção no PC1 não está correlacionada com a projeção no PC2, e pode-se pensar nos PCs como geometricamente ortogonais. O processo de seleção de PC tem o efeito de maximizar a correlação entre os dados e sua projeção e equivale a realizar regressão linear múltipla nos dados projetados contra cada variável dos dados originais. Por exemplo, a projeção em PC2 tem correlação máxima quando usada em regressão múltipla com PC1. Esses coeficientes são armazenados em uma “matriz de carregamento PCA”, que pode ser interpretada como uma matriz de rotação que gira os dados de forma que a projeção com maior variância siga o primeiro eixo. À primeira vista, PC1 se parece muito com a linha de regressão linear de *y versus x* ou *x versus y*. No entanto, o PCA difere da regressão linear porque o PCA minimiza a distância perpendicular entre um ponto de dados e o componente principal, enquanto a regressão linear minimiza a distância entre a variável de resposta e seu valor previsto (LEVER; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2017).

Na sequência, são aplicadas técnicas de reconhecimento de padrões supervisionados, as quais utilizam informações de um grupo de amostras (classe ou categoria) para identificar novas amostras desconhecidas em um dos grupos identificados. São métodos de classificação multivariada que visam encontrar modelos matemáticos capazes de reconhecer que cada amostra pertença à sua classe apropriada, com base em um conjunto de medidas. Depois que um modelo de classificação é calibrado, a associação de amostras desconhecidas a uma das classes definidas pode ser prevista. Portanto, essas técnicas de classificação lidam com respostas qualitativas, ou seja, definem relações matemáticas entre um conjunto de variáveis descritivas (por exemplo, medições químicas) e uma variável qualitativa, ou seja, o pertencimento a uma categoria definida (SAMPAIO; BRITES, 2021).

A Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) é um método de classificação linear que combina as propriedades da regressão de mínimos quadrados parciais com o poder de discriminação de uma técnica de classificação. O PLS-DA é baseado no algoritmo de regressão PLS (PLS1 ao lidar com uma variável Y dependente e PLS2 na presença de várias variáveis Y dependentes), que procura

por variáveis latentes com uma covariância máxima com as variáveis Y. A principal vantagem do PLS-DA é que as fontes relevantes de variabilidade dos dados são modeladas pelas chamadas Variáveis Latentes (LVs), que são combinações lineares das variáveis originais, e, conseqüentemente, permite a visualização gráfica e compreensão dos diferentes padrões de dados e relações por *scores* e *loadings* de LV. Os *loadings* são os coeficientes das variáveis nas combinações lineares que determinam os LVs e, portanto, podem ser interpretados como a influência de cada variável em cada LV, enquanto os *scores* representam as coordenadas das amostras no hiperespaço de projeção da LV (SAMPAIO; BRITES, 2021).

8.3 REGULAMENTAÇÃO DO USO E COMERCIALIZAÇÃO DO PRÓPOLIS

O própolis tem sido utilizado para fins terapêuticos em humanos e animais, em virtude de suas propriedades farmacológicas. Vários trabalhos científicos têm demonstrado que tal produto natural apresenta atividade antimicrobiana, analgésica, cicatrizante, anti-inflamatória e antioxidante (MARCUCCI, 1995; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; LUSTOSA *et al.*, 2008). Em razão dessas características, o própolis tem sido empregado na elaboração de produtos cosméticos, farmacêuticos e de higiene pessoal, bem como utilizado em suplementos alimentares. Atualmente, é comercializado sob diversas formas como extratos, cápsulas e enxaguatório bucal (LUSTOSA *et al.*, 2008; BARRETO *et al.*, 2020).

Com o objetivo de garantir o controle da qualidade do própolis de *A. mellifera* produzido no Brasil, bem como possibilitar sua comercialização para os mercados interno e externo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou, em 2001, uma legislação específica com padrões de identidade e qualidade do própolis produzido no país. Esse regulamento consta na Instrução Normativa (IN) nº 03, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), em que são estabelecidos os requisitos físico-químicos para avaliação da qualidade do própolis bruto e do extrato de propolis. Como, atualmente, não há uma legislação específica para o controle de qualidade de própolis de abelhas-sem-ferrão, a IN nº 3 também se aplica a estes produtos (ANEXO I).

Um dos parâmetros de controle de qualidade do própolis presente na IN nº 3 é o teor de compostos fenólicos totais. Os compostos fenólicos, ubíquos nas plantas, das quais as abelhas coletam as resinas para formar o própolis, são parte essencial

da dieta humana e da alimentação animal e são de considerável interesse devido à suas propriedades biológicas como antioxidante, antialérgica, anti-aterogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora (BAJCAKZ *et al.*, 2018).

Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, uma vez que estes constituem a classe de compostos fenólicos mais abundantes em todo o reino vegetal. Tais compostos apresentam várias atividades farmacológicas, incluindo efeito antioxidante, anti-inflamatório, antialérgico, antitrombótico, anticâncer, antiespasmódico e hepatoprotetor (KAGAWAD *et al.*, 2021). A determinação do teor de flavonoides totais também está contemplada na IN nº 3.

Outro parâmetro contemplado na legislação é o potencial antioxidante. Determinados processos fisiológicos, decorrentes de reações bioquímicas e da cadeia respiratória, produzem moléculas conhecidas como “radicais livres” ou espécies reativas de oxigênio (EROs). Como a oxidação faz parte do metabolismo celular, os radicais livres são produzidos naturalmente, e estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como a produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias como enzimas e hormônios. Porém, quando essas moléculas são produzidas excessivamente pelo organismo, podem provocar efeitos deletérios em biomoléculas como DNA e proteínas, além da peroxidação lipídica. Logo, EROs podem estar envolvidas no envelhecimento precoce e na patogênese de muitas doenças, como câncer, aterosclerose, diabetes mellitus e doenças degenerativas (NAGAI *et al.*, 2003).

Dessa forma, os agentes antioxidantes produzidos naturalmente pelo organismo ou obtidos via dieta possuem importante papel na proteção contra danos e doenças induzidos por radicais livres. O crescente interesse de pesquisadores em busca de compostos antioxidantes, incluindo os de origem natural, está relacionado ao efeito benéfico dessas substâncias para o organismo. Nesse sentido, alguns trabalhos têm relatado as propriedades antioxidantes de extratos vegetais ou de produtos apícolas, relacionando essa atividade à presença de compostos fenólicos, incluindo flavonoides (AHMED *et al.*, 2018; KUREK-GÓRECKA *et al.*, 2022). Por fim, é importante ressaltar que o mecanismo de ação antioxidante dos compostos fenólicos pode envolver a transferência de átomos de hidrogênio, a transferência de um único elétron, a transferência sequencial de elétrons por perda de prótons e a quelatação de metais de transição (ZEB, 2020).

Para o uso terapêutico do própolis, independentemente da espécie de abelha produtora, existe uma legislação específica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a RDC Nº 24, de 14 de junho de 2011, que, além de estabelecer critérios quanto aos parâmetros físico-químicos desses produtos, exige relatório de segurança e eficácia pré-clínica e clínica ou dados de literatura técnico-científica que contemplem essas informações ou tradicionalidade de uso. Ainda, essa Resolução estabelece que medicamentos à base de própolis de uso tópico, na cavidade bucal, com as indicações de uso como anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante, estão isentos da comprovação de eficácia e segurança (BRASIL, 2011).

Por fim, é importante destacar que, além do controle de qualidade do ponto de vista químico, também é necessário garantir a segurança do uso do própolis, por meio da realização de estudos toxicológicos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) (LAVINAS *et al.*, 2019) e clínicos. Embora o própolis tenha seu uso como suplemento alimentar aceito como seguro (CONTIERI *et al.*, 2022), muitos produtos naturais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos adversos provocados por seus próprios constituintes ou pela presença de contaminantes. Por isso, sua aplicação exige rigoroso monitoramento da segurança (EKOR, 2014).

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu (2 N), ácido gálico (pureza de 97,5%), ácido ascórbico (99%), e quercetina (96%) foram adquiridos da empresa Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de alumínio hexahidratado e carbonato de sódio foram obtidos da Labsynth (Diadema, SP, Brasil). Todos os outros agentes químicos utilizados foram de grau analítico PA. A água ultrapura foi obtida através do sistema de purificação Merck Millipore Milli-Q (Bedford, MA, EUA).

9.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

As informações relacionadas à coleta e o preparo dos extratos de própolis mole (EPM) avaliados, bem como a identificação das espécies de abelhas que os produziram, estão previamente descritas no CAPÍTULO 1 (subseção 4.2). O projeto foi registrado no Sistema Nacional de Patrimônio Genético (SISGEN) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) do Brasil sob o registro nº A6CCE9D.

O rendimento dos EPM (%) foi calculado da diferença obtida da massa do PB. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de mensurações em triplicata. A porcentagem de fenólicos e flavonoides totais do PB foi calculada a partir da conversão do conteúdo dos fenólicos totais e flavonoides totais obtidos (CAPÍTULO 2, subseção 10.3) com relação a 100 g dos EPMs e posteriormente correlacionado com o rendimento de cada extrato obtido.

A quantificação de fitoquímicos (fenólicos e flavonoides) foi realizada nos EPMs, bem como em extratos padronizados de própolis (extrato de própolis hidroetanólico, EPH), os quais foram preparados utilizando-se etanol 70% e um equivalente de 11% (m/v) do respectivo EPM, conforme preconizado pela legislação brasileira (ANEXO 1).

Todos os extratos obtidos foram refrigerados a 2–8 °C para a execução dos experimentos relatados.

9.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

Amostras dos quatro EPMs foram analisadas por MIR acoplada a ATR usando cristal de diamante, em um espectrômetro de infravermelho Alpha II com transformação de Fourier (FTIR) (Bruker, Billerica, USA). Dados do espectro foram adquiridos por transmitância na faixa espectral de 4000–400 cm^{-1} , com 24 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} .

9.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Os softwares Matlab 2020a (MathWorks Inc., Natick, MA, EUA) e PLS Toolbox 4 (Eigenvector Research Inc., Washington - DC, EUA) foram usados para realizar as análises quimiométricas.

9.4.1 Pré-processamento e análise exploratória dos dados

Os dados obtidos em relação as análises de ATR-IR dos extratos foram submetidos aos métodos de pré-processamento, a fim de selecionar o método mais adequado para a construção do modelo PCA, utilizado para realizar a análise exploratória dos dados: *normalize* e *standard normal variate* (SNV); *orthogonal signal correction* (OSC), Filtragem: *generalized least squares weighting* (GLSW), Normalização: *multiplicative scatter correction* (MSC-mean); Dimensionamento e centragem: *mean centering*, *multiway center*, *median center*, *sqrt mean scale*, *multiway scale*, *group scale*, *Log decay scaling* e *autoscale*; *derivative* (Savitzky – Golay), *baseline (specified points)*, *smoothing* (Savitzky – Golay), *baseline (weighted least square)*, *external parameter orthogonalization* (EPO). Transformação: Log_{10} e *absolute value* (ZOROV *et al.*, 2010; CASTRO; PEREIRA-FILHO, 2014; HADDAD; CANIONI; BOUSQUET, 2014; YAROSHCHYK; EBERHARDT, 2014; GALBÁCS; 2015; ZHANG *et al.*, 2015; POŘÍZKA *et al.*, 2016).

A escolha do método mais adequado de pré-processamento foi realizada com base na sua capacidade de discriminar os quatros tipos de extratos de própolis e de apresentar maior variância explicada com menor número de componentes principais (CPs) possíveis. A escolha de CPs foi feita pelo critério de *Eigenvalue* que consiste em plotar um gráfico de *Eigenvalue versus* número de componentes principais, onde

o número de componentes principais é escolhido de acordo com maior variância acumulada (ABDI; WILLIAMS, 2010; THARWAT, 2016).

Para a construção do modelo PCA foram utilizadas 160 alíquotas de todos os extratos de própolis avaliados (mandaçaia, plebeia, tubuna e verde). As amostras identificadas como possíveis *outlier* nesse método foram removidas do conjunto de dados.

9.4.2 Modelo PLS-DA e determinação da *Variable Importance in Projection* (VIP)

As amostras anômalas foram investigadas usando o método do gráfico de *leverage* versus resíduos de Student com nível de significância de 5%. Neste método, amostras que apresentaram simultaneamente altos valores de *leverage* e de resíduos de Student são consideradas potenciais *outlier* (DE FÁTIMA COBRE *et al.*, 2022). O critério da *American Society for Testing and Materials* (ASTM E1655, 2012) foi também usado para identificação das amostras *outlier*. A norma preconiza que para dados espectroscópicos centrados pela média na região de infravermelho, o *leverage* máximo tolerado é igual a $1-(1/LV)$; onde LV é o número de variáveis latentes. Caso uma amostra apresente valores de *leverage* acima do preconizado, é considerada *outlier* (ASTM, 2012).

Para a construção do modelo PLS-DA, 70% das amostras foram utilizadas para realizar o treinamento (calibração), e os 30% restantes, foram usadas para os testes de validação. O algoritmo de Kennard–Stone foi utilizado para a seleção de grupos de treinamentos e testes (KENNARD; STONE, 1969). A TABELA 6 mostra a divisão dos dados de calibração e de validação.

TABELA 6 - AMOSTRAS USADAS PARA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE PLS-DA.

Classe (extrato de própolis)	Total das amostras	Amostras de calibração	Amostras de Validação
Mandaçaia	160	112	48
Tubuna	160	112	48
Verde	160	112	48
Plebeia	160	112	48

FONTE: A autora (2022).

A estimativa dos erros quadráticos médios de validação cruzada (*root mean square error of cross-validation* - RMSECV) e dos erros quadráticos médios de calibração (*root mean square error of calibration* - RMSEC) foi feita utilizando o método de validação *leave-one-out* (DE FÁTIMA COBRE, 2022). Assim, o número de variáveis latentes do modelo PLS-DA foram escolhidos considerando os menores valores de RMSEC e RMSECV. O desempenho do modelo PLS-DA foi avaliado utilizando as métricas: sensibilidade, especificidade e acurácia (BALLABIO; CONSONNI, 2013; WISE *et al.*, 2006; RUIZ-PEREZ; NARASIMHAN, 2018), as quais foram calculadas de acordo com a EQUAÇÕES 5 (A-C):

$$\text{EQUAÇÃO 5.A - Sensibilidade} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FN})$$

$$\text{EQUAÇÃO 5.B - Especificidade} = \text{VN}/(\text{VN} + \text{FP})$$

$$\text{EQUAÇÃO 5.C - Acurácia} = (\text{VP} + \text{VN})/(\text{VP} + \text{VN} + \text{FN} + \text{FP})$$

Em que: VP é o número de verdadeiros positivos, FN de falsos negativos, VN de verdadeiros negativos e FP de falsos positivos.

Os valores de *VIP score* foram calculados a partir da EQUAÇÃO 6 (FAVILLA *et al.*, 2013; COCCHI; BIANCOLILLO; MARINI, 2018).

$$\text{EQUAÇÃO 6 - } \text{VIP}^2_j = \sum f \text{ wifSSY}_f \text{ J}/(\text{SSY}_{\text{totalexpl. F}})$$

Em que: SSY = porcentagem de variância Y explicada por cada variável latente específica; J = número de variáveis X ; w_j = valor de peso PLS; F = Número de variáveis latentes do modelo PLS-DA

Variáveis originais com pesos maiores que 1 no gráfico VIP, foram consideradas estatisticamente significativas para a diferenciação e classificação das amostras em estudo (mandioca, verde, tubuna e plebeia).

9.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS

9.5.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado em triplicata pelo método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (WOISKY; SALATINO, 1998). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (10%, v/v), 20 μ L de extrato de própolis mole (EPM) ou extrato de própolis hidroetanólico (EPH) (ambos de 500 μ g/mL) e 80 μ L de solução de carbonato de sódio (7,5 % p/v). A placa foi colocada em repouso no escuro por 60 min, e a absorbância foi mensurada em um leitor de microplacas (Multiskan FC - ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) em 690 nm. A concentração de fenólicos totais foi comparada à curva padrão do ácido gálico em etanol (5,0– 500 μ g/mL) e expressa em mg equivalentes de ácido gálico por grama do extrato de própolis (mg EAG/g). Para a obtenção da curva, procedeu-se da mesma forma que a descrita para os extratos de própolis. Este ensaio foi realizado em triplicata.

9.5.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método descrito por Devequi-Nunes *et al.* (2018) com pequenas modificações (método de Dowd). Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 μ L de EPM ou EPH (ambos 500 μ g/mL) e 100 μ L de cloreto de alumínio em metanol (2,0% m/v). A placa foi deixada em repouso no escuro por 60 min, e a absorbância foi mensurada usando um leitor de microplacas (Multiskan FC-ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) em 414 nm contra o branco, o qual era constituído por extrato de própolis e metanol (100 μ L

cada). A concentração de flavonoides totais foi comparada com a curva padrão de quercetina em etanol (7,81 - 125 µg/mL) e expressa como mg equivalentes de quercetina por grama de extrato de própolis (mg EQ/g). Para a obtenção da curva, procedeu-se da mesma forma descrita para os extratos de própolis. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

9.6 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A avaliação da capacidade antioxidante dos EPMS foi realizada mensurando-se o *scavenger* do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001). Os extratos foram diluídos em cinco concentrações: para verde e tubuna (6,25 – 100 µg/mL), mandaçaia (2,5 – 50 µg/mL) e plebeia (400 – 2000 µg/mL), em triplicata. Em seguida, 2,5 mL de cada diluição foram transferidos para um tubo contendo 1,0 mL da solução etanólica de DPPH (0,3 mM). Após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a redução do radical DPPH foi medida pela leitura da absorbância em um espectrofotômetro UV 1800 (Shimadzu; Kyoto, Japão) a 517 nm. Soluções constituídas por etanol e pelos EPMS nas diluições citadas anteriormente, foram utilizados como branco. Uma solução de DPPH com etanol foi usada como controle.

A EQUAÇÃO 7 foi usada para calcular a capacidade dos EPMS em sequestrar o radical livre, e expressa como uma porcentagem da inibição da oxidação do DPPH. Como padrão, foi utilizado ácido ascórbico (0,5 – 7,5 µg/mL). O valor da CI_{50} (concentração necessária do extrato ou padrão para sequestrar 50% do radical DPPH) foi calculado através da equação da linha de tendência no *software* Excel, construída com base nas concentrações testadas e seus respectivos percentuais de *scavenger* do radical DPPH. Os dados foram reportados a partir de três experimentos independentes performados em triplicata.

$$\text{EQUAÇÃO 7 - } CI\% = 100 - \{[(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100] / \text{Abs controle}\}$$

Em que: Abs = absorbância

9.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos ensaios do potencial antioxidante, fenólicos e flavonoides totais foram analisados utilizando ANOVA *one-way* seguido do teste post-hoc de Dunnett ou método Holm-Sidak, usando o software SPSS versão 20.0 ou Sigmastat® para Windows versão 3.5 (San Jose, CA, EUA). As comparações foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte dos resultados apresentados neste capítulo foram publicados no manuscrito intitulado “Propolis authentication of stingless bees by mid-infrared spectroscopy and chemometric analysis”, publicado no periódico *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT) - Food Science and Technology* (DOI. 10.1016/j.lwt.2022.113370).

10.1 ANÁLISE QUÍMICA E ESPECTROSCÓPICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS

O própolis pode ser utilizado industrialmente em diversos produtos, como suplementos alimentares, cosméticos, tinturas e diversas outras formulações farmacêuticas (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Contudo, os produtos destinados ao consumo humano devem seguir rigorosos critérios de qualidade. Os produtos de origem natural são influenciados pelo ambiente, incluindo as estações do ano, o que resulta em matérias-primas com diferenças qualitativas e quantitativas na composição química. Mesmo não sendo possível ter lotes idênticos de material, critérios mínimos de padronização devem ser estabelecidos para que seja possível a realização de estudos de segurança, eficácia e, dessa forma, manter as mesmas características ao ser colocado à venda (NIKAM *et al.*, 2012; BERRETTA *et al.*, 2020). Assim, estudos visando o desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade da própolis para seu uso industrial e comercial são muito importantes (BANKOVA *et al.*, 2019; OSÉS *et al.*, 2020).

Em geral, os métodos de controle de qualidade de produtos naturais envolvem inspeção sensorial e analítica por meio de técnicas instrumentais (LIANG *et al.*, 2004). A espectroscopia de reflexão total atenuada (ATR) é um método rápido e não destrutivo que não requer solventes, pré-tratamento da amostra ou um operador especializado, como ocorre nos métodos cromatográficos tradicionais. Desta forma, este trabalho propôs, inicialmente, verificar se a técnica de ATR-IR se apresenta como uma alternativa potencial a ser aplicada industrialmente para a realização do controle de qualidade de própolis. Para este fim, compararam-se os resultados obtidos por meio da realização desta técnica, aos dados de UPLC-ESI-MS/MS apresentados anteriormente (ver CAPÍTULO 1, Subseção 5.1).

A TABELA 7 mostra os principais picos identificados nos espectros de EPMs obtidos por ATR-IR, com seus possíveis grupos funcionais associados. Já na FIGURA 19 foram apresentados os seus respectivos espectros.

TABELA 7 - PRINCIPAIS PICOS NA REGIÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) EM cm^{-1} DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE OBTIDOS VIA ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR) CONTENDO OS POSSÍVEIS GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS (CONTINUA).

Pico	Verde	Tubuna	Mandaçaia	Plebeia	Modo de vibração do grupo funcional	Referências
1	3335	3417	3395	3400	v(O-H)	MARTÍN-RAMOS <i>et al.</i> , 2018
2	2977	-	-	2974	v(CH ₂)	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2016
3	2931	2931	2934	2934	Metileno v(C-H)	COATES, 2006
4	-	2903	-	-	v _s (CH ₂)	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2016
5	1695	1712	1696	1696	v(C=O)	MOȚ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011
6	1679	1680	-	1679	v(C=C)	COATES, 2006
7	-	-	1634	-	v(C=O), v(C=C), δ _{as} (N-H)	MOȚ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011
8	1602	1605	-	-	v(C=C) (aromático), v(C=O) (amida)	MARTÍN-RAMOS <i>et al.</i> , 2018
9	1516	1516	1516	-	v(C=C) (aromático)	MOȚ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011
10	1442	1455	1454	1455	δ(C-H), v(aromático), v(CH ₂), (CH ₃)	MOȚ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011
11	1380	1381	1382	1386	-	-
12	1265	1275	-	1258	-	-
13	-	-	1217	-	-	-
14	-	-	1207	-	v(C-OH) (aromático)	FALCÃO; ARAUJO, 2018
15	1184	1182	-	1179	-	-

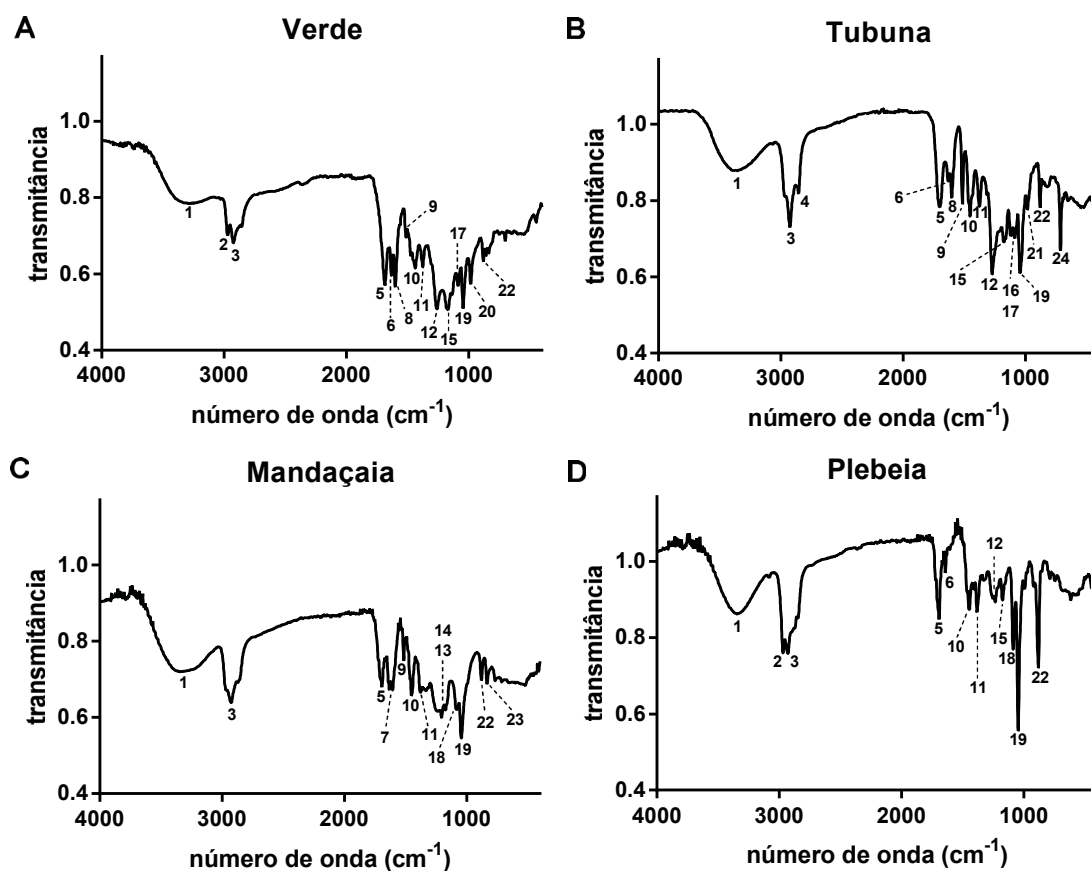
TABELA 7 - PRINCIPAIS PICOS NA REGIÃO DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) EM cm^{-1} DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE OBTIDOS VIA ESPECTROSCOPIA DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR) CONTENDO OS POSSÍVEIS GRUPOS FUNCIONAIS ASSOCIADOS (CONCLUSÃO).

16	-	1168	-	-	$\nu(\text{C-O}), \delta(\text{C-OH})$	MOTȚ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2016
17	1126	1124	-	-	-	-
18	-	-	1090	1091	-	-
19	1048	1047	1047	1048	$\nu_s(\text{C-O})$	COATES, 2006
20	1032	-	-	-	$\nu(\text{C-O})$	CARRIÓN-PRIETO <i>et al.</i> , 2018
21	-	1013	-	-	-	-
22	885	883	885	886	$\delta(\text{C=CH}_2), \delta(\text{CH=CH})$ fora do plano	PAGACZ <i>et al.</i> , 2019
23	-	-	879	-	$\delta(\text{C-H})$	SKENDERIDIS <i>et al.</i> , 2019
24	-	714	-	-	$\rho-(\text{CH})$	ROSI <i>et al.</i> , 2017

LEGENDA: ν - alongamento, δ - flexão, ρ - balanço, s - simétrico, as – assimétrico

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 19 - ESPECTROS DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS MOLE (EPM) NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR) EM cm^{-1} OBTIDOS POR REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (ATR).



NOTA: Os números representam os picos apresentados na TABELA 6 para os EPMS verde (A), tubuna (B), mandaçaia (C) e plebeia (D).

FONTE: A autora (2022).

Na região espectral da carbonila ($1735\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$) (GUILIANO *et al.*, 2007), os extratos de própolis mole verde, mandaçaia e plebeia apresentaram um pico característico de ácidos carboxílicos ($\sim 1695\text{ cm}^{-1}$). Na plebeia e na mandaçaia, esse pico pode ser atribuído à presença de ácidos diterpênicos (CARRIÓN-PRIETO *et al.*, 2018). No extrato de tubuna, entretanto, foi demonstrado um pico característico na região cetônica ($1716\text{--}1712\text{ cm}^{-1}$), que não pôde ser atribuído a um determinado grupo químico específico.

Os EPMS verde e tubuna apresentaram picos na região de $1615\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ característicos de deformações do anel aromático (COATES, 2006). Outro número de onda característico também de deformações do anel aromático e que está associado a compostos fenólicos é o pico 1516 cm^{-1} (MOŢ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU,

2011), que estava presente nos EPMs verde, tubuna e mandaçaia, conforme verificado por UPLC-ESI-MS/MS (TABELA 2).

O EPM de mandaçaia apresentou ainda dois picos, sendo um na região de 1220-1200 cm^{-1} (GUILIANO *et al.*, 2007) associado a resinas fenólicas e outro em torno de $\sim 879 \text{ cm}^{-1}$, que pode ser atribuído às ligações glicosídicas do tipo α presentes nos carboidratos dos polifenóis glicosilados (SKENDERIDIS *et al.*, 2019).

No EPM de tubuna, o pico em torno de 1168 cm^{-1} provavelmente ocorre devido à presença de ácidos graxos (OLIVEIRA *et al.*, 2020), enquanto o pico em 714 cm^{-1} também foi atribuído a substâncias lipídicas (ROSI *et al.*, 2017). O pico em $\sim 886 \text{ cm}^{-1}$ é muito importante para o diagnóstico de resinas diterpênicas (GUILIANO *et al.*, 2007) pois sua presença no EPM de plebeia indica grupos metileno exocíclicos demonstrando o predomínio de diterpenos labdânicos, corroborando com os dados da espectrometria de massas.

Em suma, os resultados apresentados na TABELA 7 e na FIGURA 19, demonstram que os principais compostos e grupos químicos de metabólitos secundários previamente caracterizados por UPLC-QToF-ESI-MS/MS foram confirmados por ATR-IR, uma vez que se detectaram no EPM verde ácidos fenólicos, flavonoides e ácidos cinâmicos prenilados. Já no EPM tubuna foi verificada a presença de ácidos fenólicos, flavonoides, ácidos cinâmicos prenilados, lipídeos fenólicos e ácidos graxos. O EPM de mandaçaia apresentou ácidos fenólicos, flavonoides, polifenóis glicosilados, lipídeos fenólicos, ácidos diterpênicos e triterpenos. No EPM de plebeia, observou-se apenas a presença de ácidos diterpênicos e ácidos graxos.

Conforme demonstrado pelo ATR-IR e verificado pelo UPLC-QToF-ESI-MS/MS, os EPM verde, tubuna e mandaçaia apresentam grande número de compostos fenólicos e plebeia apresenta diterpenos. Em particular, os extratos verde, tubuna e mandaçaia possuem compostos que lhes conferem uma determinada ação antioxidante, apresentando potencial para serem utilizados como suplementos alimentares e finalidades terapêuticas relacionadas a doenças e quadros que envolvem o desencadeamento de estresse oxidativo (GUTIÉRREZ-DEL-RÍO *et al.*, 2021).

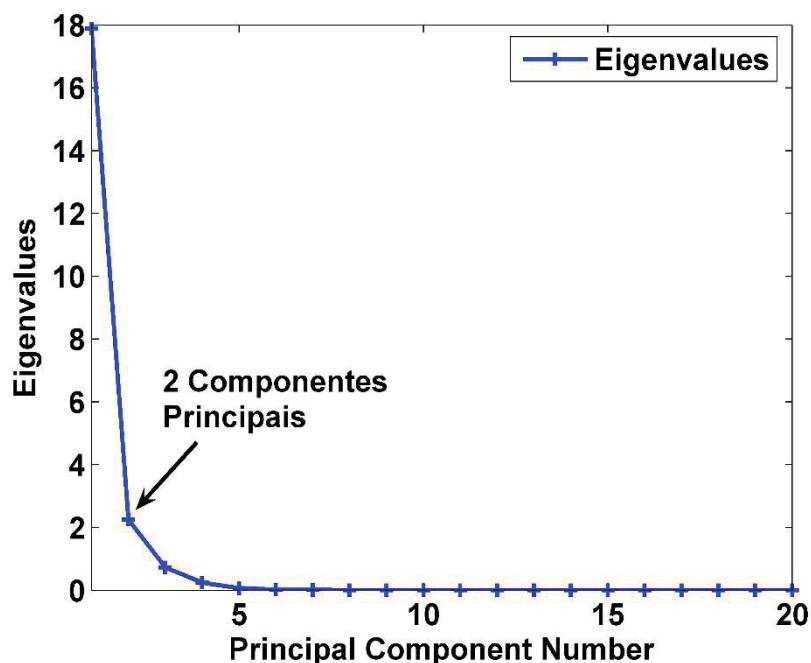
10.2 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

O ATR-IR apresenta inúmeras vantagens, que lhe tornam uma técnica adequada para a realização do controle de qualidade de produtos naturais como o própolis. Porém, para tornar essa técnica responsiva e aplicável a esta finalidade, métodos quimiométricos de agrupamento e classificação devem ser acoplados a dados experimentais da espectroscopia (SAKHTEMAN *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2020). Ainda, as técnicas espectroscópicas aplicadas a problemas de autenticidade são geralmente não seletivas pelo fato delas não detectarem a presença ou ausência de um único composto marcador. Ao invés disso, os espectros contêm informações sobre a composição química completa e o estado físico da amostra em análise (BIANCOLILLO *et al.*, 2020).

Dessa forma, aplicaram-se análises quimiométricas aos espectros de ATR-IR das amostras de EPM das quatro abelhas em estudo, a fim de classificá-las e autenticá-las.

10.2.1 Modelo PCA

O método de análise exploratória PCA foi a primeira análise quimiométrica realizada, cujo objetivo foi identificar amostras discrepantes (atípicas), discriminar os quatro extratos de própolis mole (EPM) e identificar as variáveis (comprimento de onda) responsáveis por essa discriminação. A FIGURA 20 mostra o gráfico de *Eigenvalue* (autovalores) *versus* número de componentes principais. Pode-se observar que apenas dois componentes principais foram suficientes para a construção do modelo PCA, com a PC1 e PC2 capturando 84,26% e 10,62% de variância explicada, totalizando 94,88% de tal parâmetro.

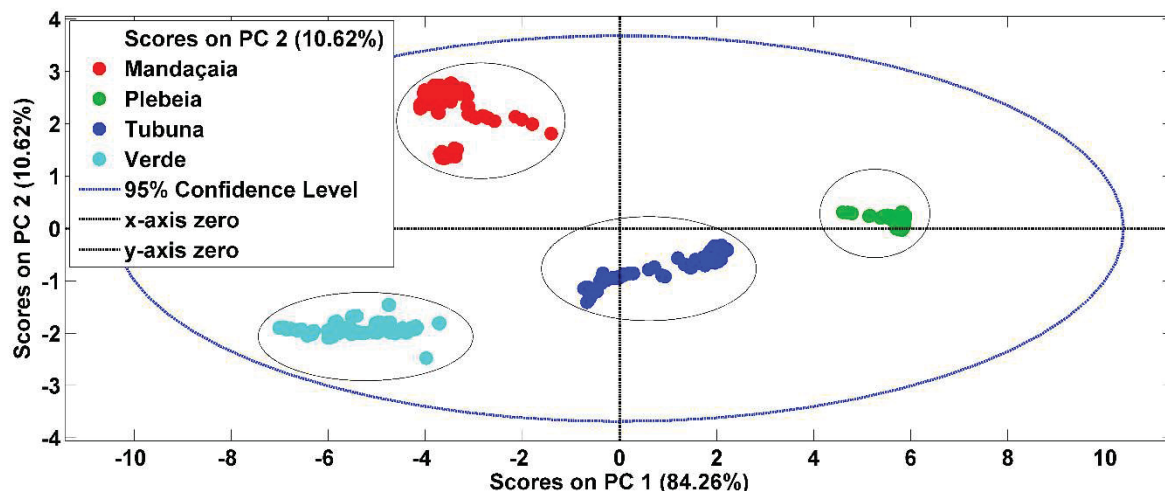
FIGURA 20 - GRÁFICO DE *EIGENVALUE VERSUS* NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS

FONTE: A autora (2022).

Após a seleção do número de componentes principais, o próximo passo foi a construção do gráfico de *scores* (amostras) do modelo PCA usando a PC1 *versus* PC2. Aplicando o pré-processamento do tipo centragem na média (*mean centering*) foi o possível discriminar as amostras das quatro classes de própolis (FIGURA 21).

O pré-processamento dos dados é uma análise crítica no desenvolvimento de qualquer modelo quimiométrico, e tem por objetivo remover qualquer interferente existente nos espectros brutos (por exemplo, remoção do ruído experimental, correção dos problemas de linha base, que por algum motivo não foi possível eliminar durante a aquisição dos espectros, permitindo a obtenção de espectros limpos e facilmente interpretáveis, o que impacta significativamente na melhoria do desempenho preditivo dos modelos quimiométricos (KOTSIANTIS; KANELLOPOULOS; PINTELAS, 2006; BURDACK *et al.*, 2020). Nesta etapa, todas as amostras estiveram dentro da elipse de confiança (IC 95%), mostrando não existir nenhuma amostra *outlier* no modelo PCA.

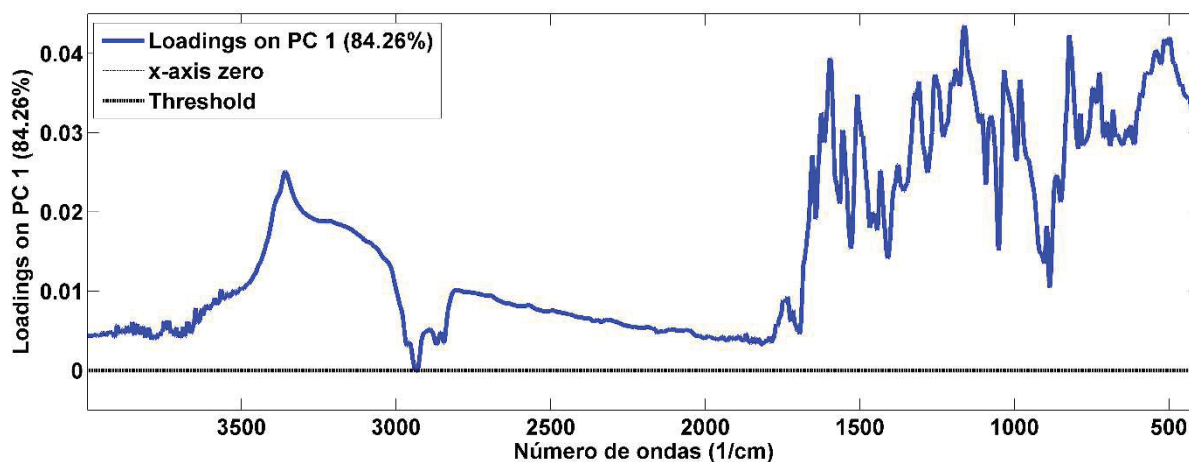
FIGURA 21 - GRÁFICO DE SCORES (AMOSTRAS) DO MODELO PCA PARA DISCRIMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS.



FONTE: A autora (2022).

Posteriormente, foi construído um gráfico de *loadings versus* variável (número de ondas) (FIGURA 22), utilizando o PC1, onde foi possível identificar as variáveis mais importantes que foram responsáveis pela separação dos quatro EPM. Como a primeira componente principal foi a que teve maior variância explicada (84.26%), o gráfico de *loadings* foi construindo usando apenas a PC1 (FIGURA 22). Dentre as bandas espectrais responsáveis pela discriminação dos extratos, a banda larga na região de 3500 a 3200 cm^{-1} pode estar associada à presença de água, álcoois, fenóis e outros compostos aromáticos contendo grupos OH. Já a região de 1600 a 1500 cm^{-1} absorve energia das ligações C=C dos anéis aromáticos, responsáveis por fortes vibrações de 900 a 600 cm^{-1} . Essas bandas de absorbância estão principalmente relacionadas às ligações abundantemente presentes em compostos antioxidantes, como as insaturações e a presença de anéis aromáticos.

FIGURA 22 - GRÁFICO DE *LOADINGS* DE PC1 *VERSUS* NÚMERO DE ONDA NO MODELO PCA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.



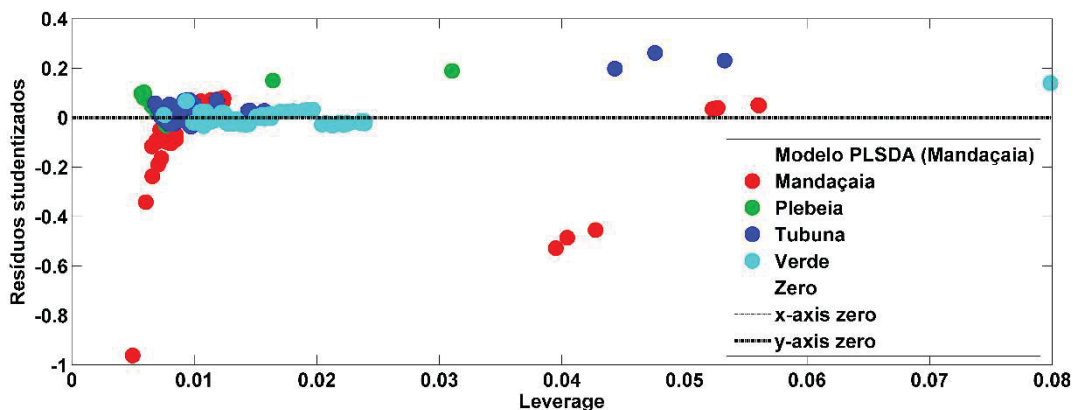
FONTE: A autora (2022).

10.2.2 Modelo PLS-DA

Antes de calibrar qualquer modelo quimiométrico de classificação (predição) é sempre aconselhável realizar uma avaliação da estrutura dos dados multivariados por meio da análise exploratória dos mesmos com o objetivo de: (i) reconhecer padrões de distribuição das amostras no espaço multidimensional, (ii) detectar a presença de possíveis amostras *outlier* e (iii) identificar variáveis importantes (BALLABIO; CONSONNI, 2013).

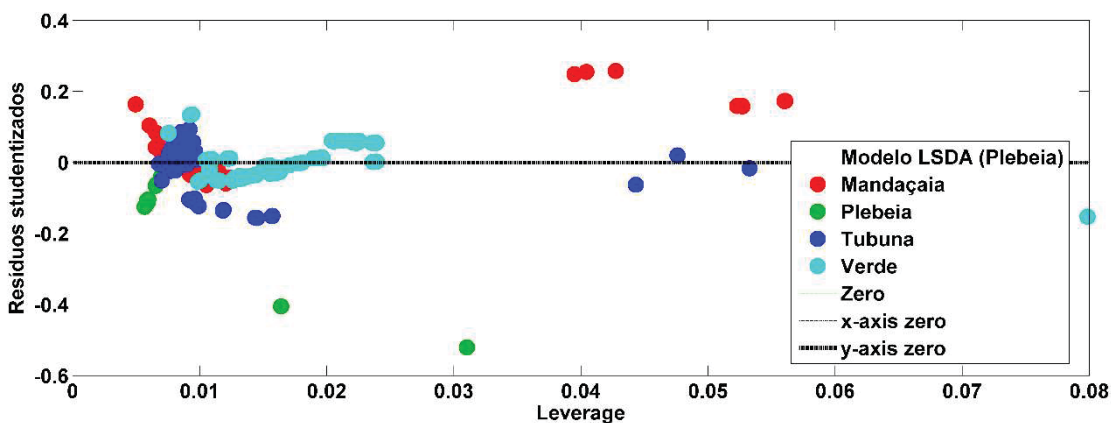
Após a construção (calibração) dos modelos PLS-DA das quatro classes das amostras, gráficos de *leverage versus* resíduos studentizados foram construídos objetivando detectar potenciais amostras *outlier* (FIGURAS 23-26). Neste tipo de gráfico, uma amostra é considerada *outlier* caso apresente simultaneamente altos valores de *leverage* e de resíduos studentizados. Assim, embora algumas amostras das FIGURAS (23-26) tenham apresentado altos valores de *leverage*, elas não podem ser consideradas *outlier* porque estão dentro dos $\pm 2,5$ desvios-padrão studentizados tolerados.

FIGURA 23 - GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE *OUTLIER* DAS AMOSTRAS DE MANDAÇAIA.



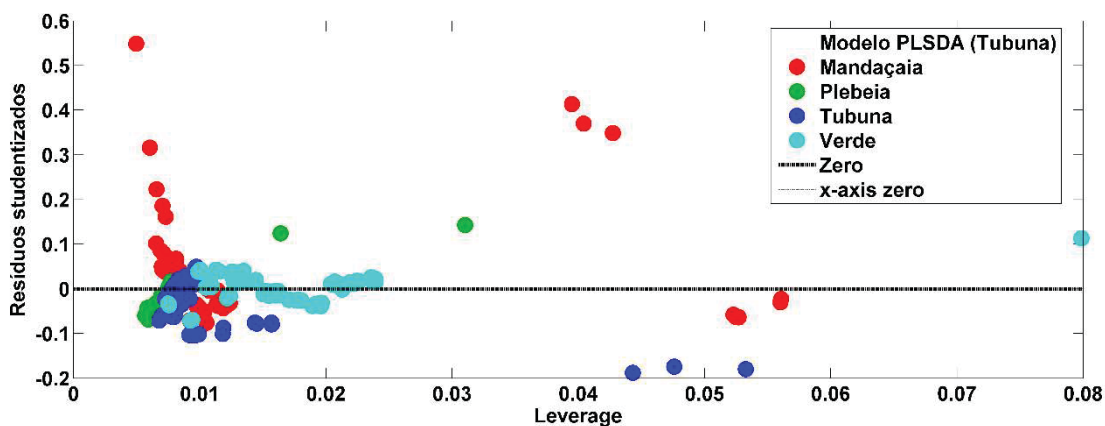
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 24 - GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE *OUTLIER* DAS AMOSTRAS DE PLEBEIA.



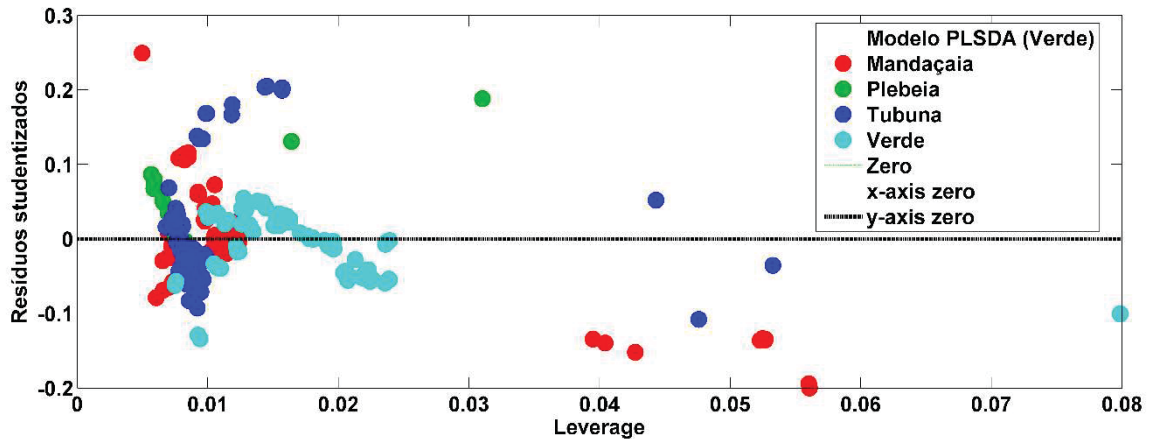
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 25 - GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE *OUTLIER* DAS AMOSTRAS DE TUBUNA.



FONTE: A autora (2022).

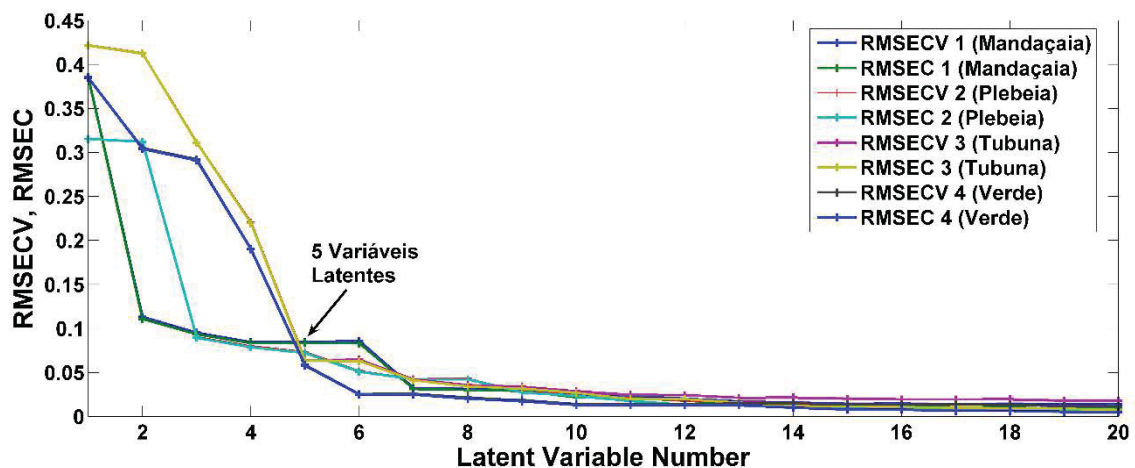
FIGURA 26 - GRÁFICO DE *LEVERAGE VERSUS* RESÍDUOS STUDENTIZADOS PARA DETECÇÃO DE *OUTLIER* DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS VERDE.



FONTE: A autora (2022).

Após a investigação da presença de amostras *outlier*, o próximo passo foi a escolha do número de variáveis latentes (LVs) para a construção dos modelos de PLS-DA de cada espécie de própolis, usando o gráfico de RMSECV, RMSEC *versus* número de variáveis latentes. A partir da FIGURA 27, foram selecionadas cinco variáveis latentes para a construção de todos modelos de PLS-DA para predição das quatro classes de própolis. A seleção das cinco variáveis latentes foi baseada nos valores de RMSECV e RMSEC, tendo sido escolhidas aquelas que apresentaram os menores valores.

FIGURA 27 - ESCOLHA DO NÚMEROS DE VARIÁVEIS LATENTES NO MODELO PLS-DA DE ACORDO COM O MENOR RMSEC E RMSECV.



FONTE: A autora (2022).

As cinco LVs representaram um total de variância acumulada de 99,75% para o bloco X (número de ondas) e de 97,42% para o bloco Y (classe das amostras), respectivamente (TABELA 8).

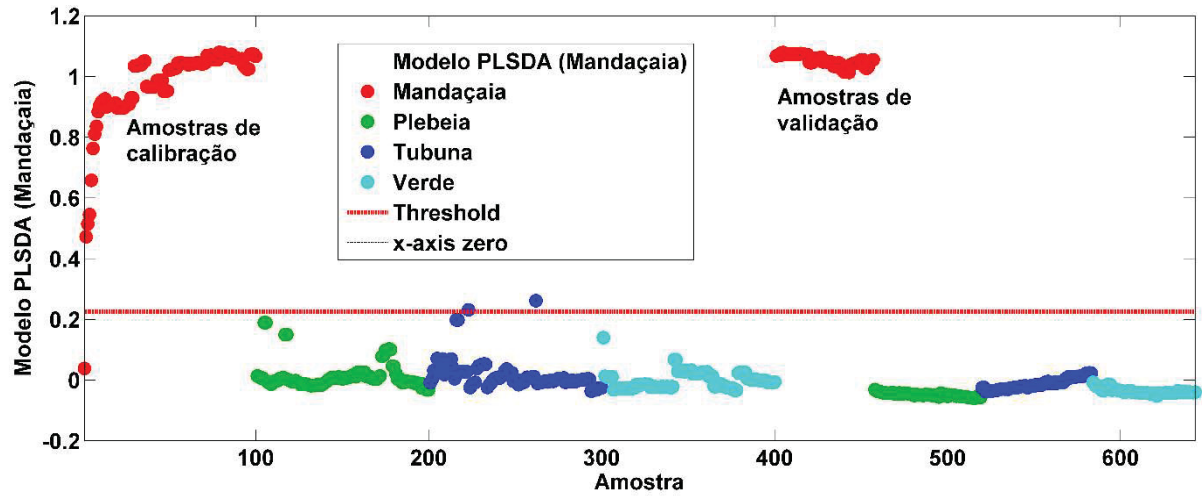
TABELA 8 - PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA RELATIVA E ACUMULADA DAS CINCO VARIÁVEIS LATENTES SELECIONADAS PARA A CALIBRAÇÃO DO MODELO PLS-DA.

Nº de Variável Latente	Bloco X		Bloco Y	
	Variância relativa	Variância acumulada	Variância relativa	Variância acumulada
1	72,85	72,85	23,51	23,51
2	11,95	84,80	26,90	50,41
3	6,57	91,37	23,19	73,90
4	7,63	99,0	13,42	87,02
5	0,57	99,75	10,14	97,42

FONTE: A autora (2022).

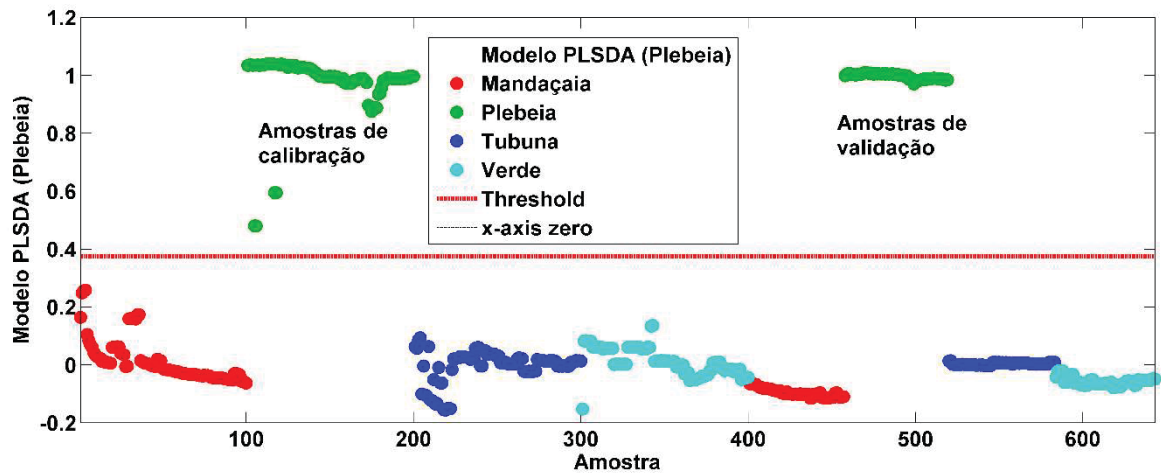
Os modelos PLS-DA para a classificação dos própolis verde, tubuna, mandaçaia e plebeia são mostrados nas FIGURAS (28-31). A linha tracejada vermelha mostrada nas figuras representa o *threshold* do modelo, que é calculado baseado em abordagem bayesiana. As amostras acima da linha vermelha horizontal tracejada são as amostras de interesse e que estão sob classificação. Assim, no modelo PLS-DA de classificação de amostras de própolis de mandaçaia (FIGURA 28), duas amostras de tubuna foram classificadas erradamente (falsos positivos) como amostras desta espécie (mandaçaia) por ultrapassarem a linha do limiar. Nos modelos de PLS-DA das amostras das classes de plebeia, tubuna e verde, todas as amostras foram corretamente classificadas, representando uma sensibilidade, especificidade e acurácia de 100% (ver TABELA 9).

FIGURA 28 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE MANDAÇAIA.



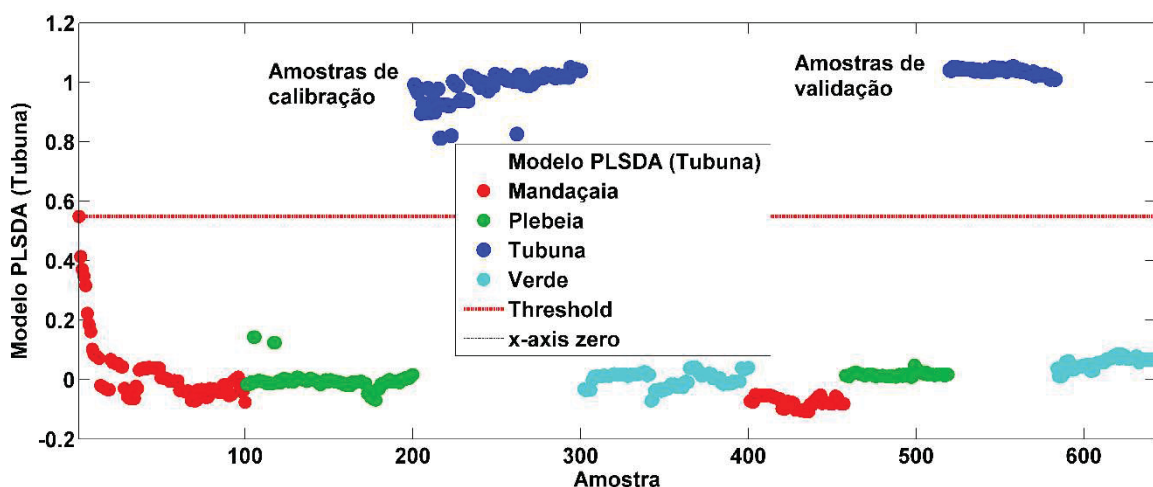
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 29 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE PLEBEIA.



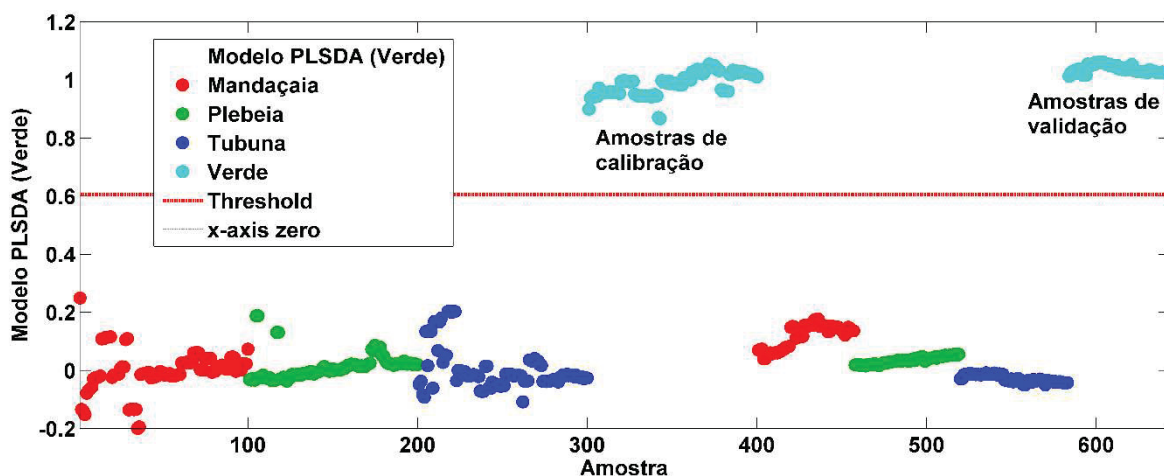
FONTE: A autora (2022).

FIGURA 30 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE TUBUNA.



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 31 - MODELO PLS-DA PARA CLASSIFICAÇÃO (PREDIÇÃO) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS VERDE.



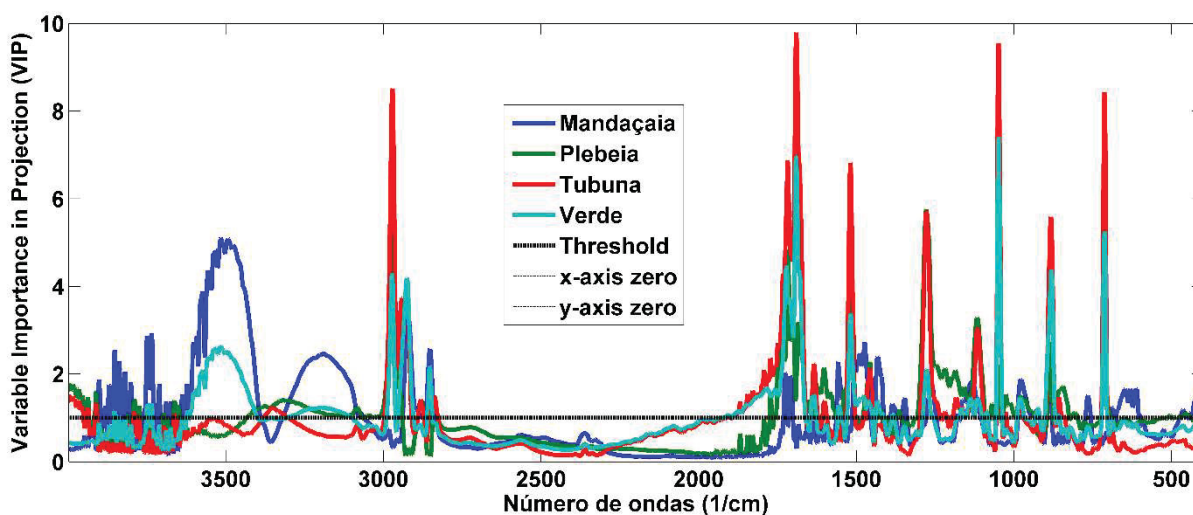
FONTE: A autora (2022).

Após a calibração, validação e a avaliação da acurácia preditiva do modelo, o passo a seguir foi investigar a região espectral MIR mais importante responsável pela classificação dos própolis de plebeia, mandaçaia, tubuna e verde, por meio do gráfico VIP (*Variable Importance in Projection*). No modelo PLS-DA, um VIP score é calculado baseando-se na soma ponderada das correlações quadráticas entre a variável original dos dados (exemplo, número de ondas do espectro de infravermelho) e as variáveis latentes do modelo PLS-DA. O número de termos desta soma quadrática é

dependente do número de variáveis latentes do modelo PLS-DA que foram estatisticamente significantes na classificação (predição) das diferentes classes das amostras (própolis de plebeia, mandaçaia, tubuna e verde). Os pesos correspondem as variâncias explicadas pelas variáveis latentes do modelo PLS-DA.

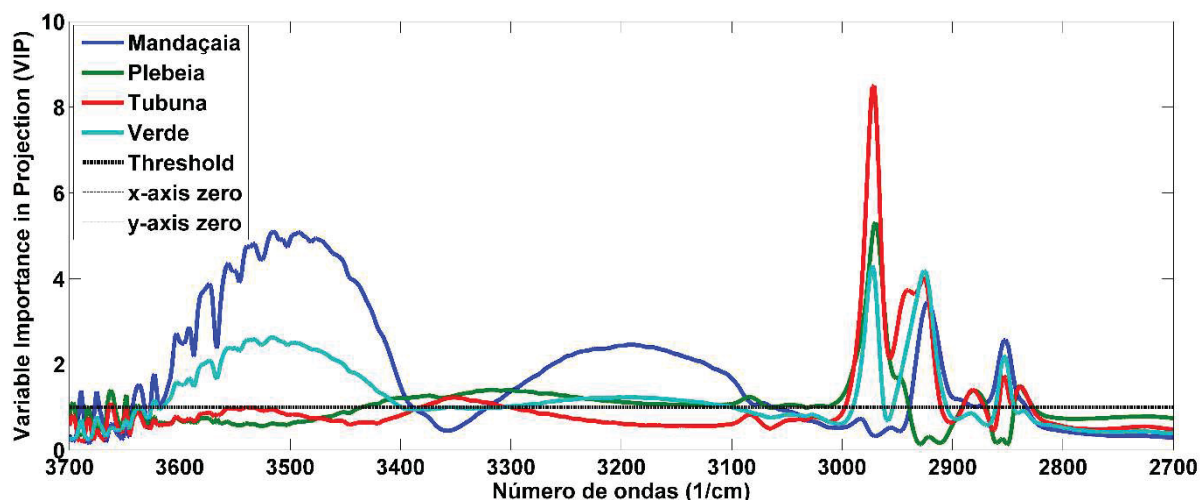
A FIGURA 32 mostra o gráfico VIP das principais variáveis (número de ondas) responsáveis pela classificação dos quatro tipos de própolis. No gráfico, pode-se observar que a região espectral mais importante na classificação das amostras está compreendida entre 3700-2700 cm^{-1} e 2000-500 cm^{-1} . Uma ampliação dessas duas importantes regiões pode ser visualizada nas FIGURAS 33 (3700-2700 cm^{-1}) e 34 (2000-500 cm^{-1}), respectivamente.

FIGURA 32 - GRÁFICO DE VARIÁVEIS (NÚMERO DE ONDAS DO ESPECTRO MIR-ATR) IMPORTANTES RESPONSÁVEIS PELA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS NO MODELO PLS-DA.



FONTE: A autora (2022).

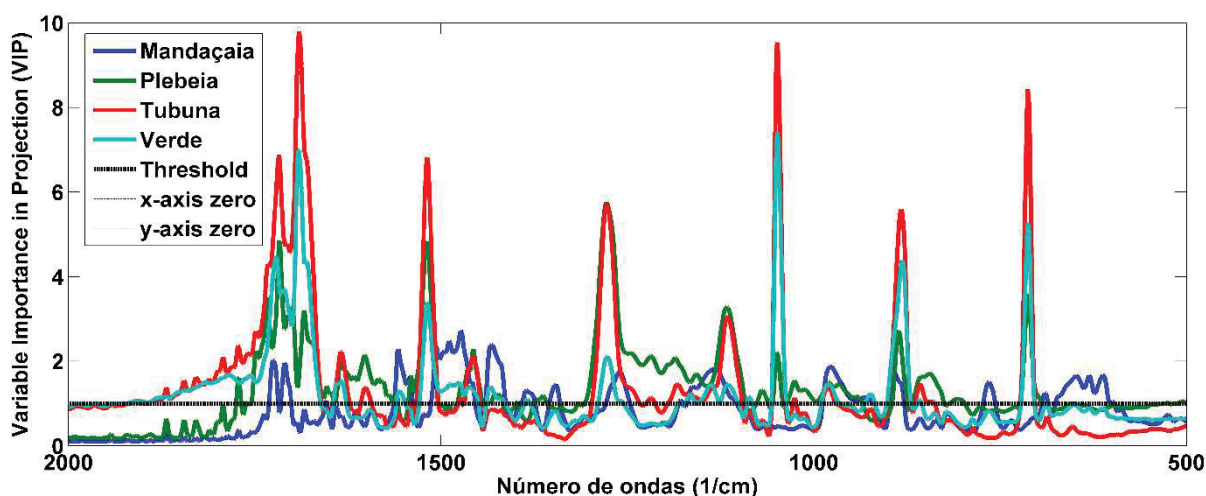
FIGURA 33 - GRÁFICO DE VARIÁVEIS (NÚMERO DE ONDAS DO ESPECTRO MIR-ATR) IMPORTANTES RESPONSÁVEIS PELA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS NO MODELO PLS-DA.



NOTA: neste gráfico é mostrada apenas a primeira região espectral (3700-2700 cm^{-1}) que foi importante na classificação das quatro classes de própolis.
 FONTE: A autora (2022).

Ainda, é possível verificar que a região de número de ondas de 3600 – 3400 cm^{-1} é importante para a classificação das amostras de extrato de própolis verde e de mandaçaia e que na região de 3000 a 2800 cm^{-1} , o VIP se torna importante para os quatro extratos de própolis (FIGURA 33).

FIGURA 34 - GRÁFICO DE VARIÁVEIS (NÚMERO DE ONDAS DO ESPECTRO MIR-ATR) IMPORTANTES RESPONSÁVEIS PELA CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DAS QUATRO CLASSES DE PRÓPOLIS NO MODELO PLS-DA.

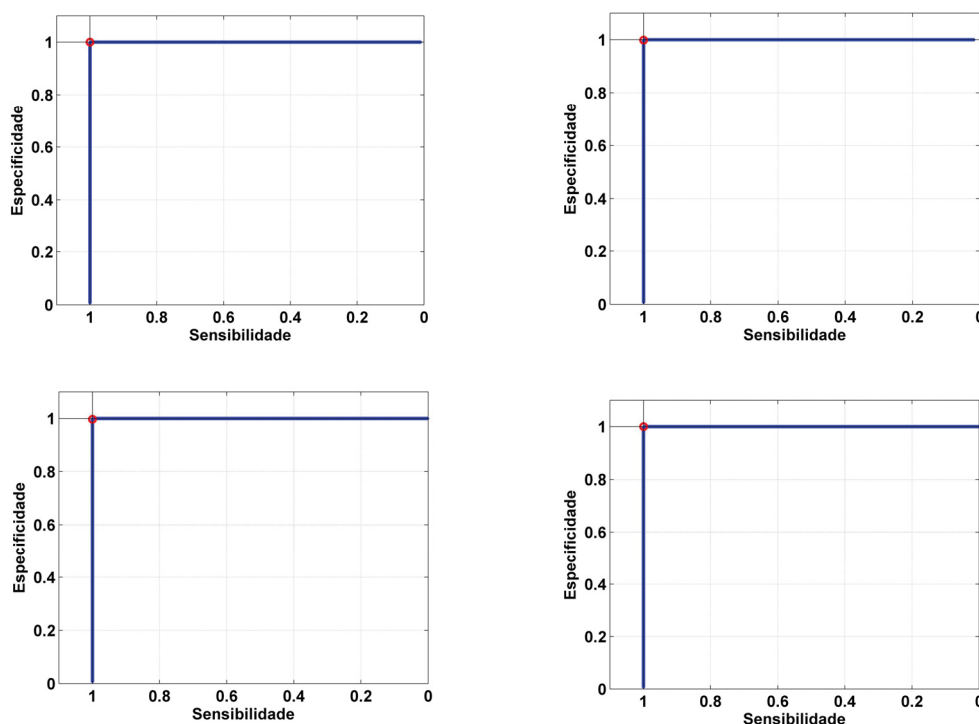


NOTA: O gráfico demonstra apenas a segunda região espectral (2000-500 cm^{-1}) que foi importante na classificação das quatro classes de própolis.
 FONTE: A autora (2022).

Na região de 2000 a 500 cm^{-1} , o VIP do extrato de mandaçaia torna-se menos significativo que dos outros extratos. Essa região do espectro é caracterizada por vibrações de esqueleto (CC), juntamente com alongamento (C=O), insaturação alifática e aromáticos (COATES, 2006), sendo importante para a classificação das amostras de extrato de própolis verde, tubuna e plebeia (FIGURA 34).

Cabe-se ressaltar que o modelo PLS-DA construído foi validado avaliando-se os seguintes critérios: sensibilidade, especificidade, acurácia e área sob a curva ROC, calculada de acordo com a EQUAÇÃO 5 (A-C) (subseção 9.4.2). As curvas ROC de todos os modelos são mostradas na FIGURA 35.

FIGURA 35 - CURVAS ROC DOS MODELOS PLS-DA PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS.



NOTA: A: extrato de mandaçaia, B: extrato de plebeia, C: extrato de tubuna, D: extrato verde. Os eixos de ordenadas e abcissas representam a especificidade e a sensibilidade dos modelos, respectivamente. Para as quatro curvas ROC, o círculo vermelho está localizado no quadrante superior direito, o que significa que todos os modelos exibiram valores de acurácia, especificidade e sensibilidade próximos a 100%.

FONTE: A autora (2022).

Pode-se observar que todas as métricas de validação (TABELA 9) tiveram valor próximo a 1 (100%) e raiz do erro quadrático médio da predição (RMSEP) inferior a 5%, comprovando o bom desempenho dos modelos na classificação das quatro

classes de própolis. Dessa forma, os resultados obtidos atestam a boa eficiência do modelo PLS-DA construído para a classificação de todos os extratos, podendo este ser aplicado para fins industriais.

TABELA 9 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MODELO PLS-DA PARA A CLASSIFICAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS.

Métrica	Conjunto	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
RMSEC	Calibração	0,084	0,062	0,186	0,168
RMSECV	Calibração	0,086	0,064	0,189	0,171
RMSEP	Previsão	0,044	0,052	0,032	0,034
Sensibilidade	Calibração	0,990	1,000	1,000	0,990
Sensibilidade	Previsão	1,000	1,000	1,000	1,009
Especificidade	Calibração	1,000	1,000	0,997	1,009
Especificidade	Previsão	1,000	1,000	1,000	1,009
Acurácia	-	0,999	1,000	1,000	0,999

NOTAS: Classe 1: extrato de mandacaria, Classe 2: extrato de plebeia, Classe 3: extrato de tubuna, Classe 4: extrato verde, RMSEC: raiz quadrada média do erro de calibração, RMSECV: raiz quadrada média do erro da validação cruzada, RMSEP: raiz média do erro quadrado de previsão

FONTE: A autora (2022).

Por fim, cabe-se ressaltar aqui que o emprego de quimiometria combinada com dados de FTIR para classificação de amostras é uma ferramenta que já vem sendo utilizada. Tal abordagem já foi usada para discriminar a impressão digital química das abelhas-sem-ferrão da Malásia. Nesse estudo, PCA e *hierarchical cluster analysis* (HCA) foram usados como ferramentas de reconhecimento de padrões de espectro FT-IR (BASYIRAH *et al.*, 2019).

10.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Quando se compara o potencial uso industrial e comercial de própolis de abelhas-sem-ferrão aos extratos de *Apis mellifera*, a vantagem de se produzir e comercializar esse tipo de produto estaria relacionada principalmente a um manejo seguro das colmeias e a obtenção de um produto de maior valor comercial (ABD JALIL; KASMURI; HADI, 2017). No entanto, as informações sobre as propriedades físico-químicas e atividades biológicas dos própolis obtidos de abelhas-sem-ferrão são

limitadas (CORDEIRO; MENEZES, 2014), dificultando sua produção em larga escala e comercialização.

Dessa forma, o presente estudo, além de elucidar atividades biológicas promissoras das amostras avaliadas (antioxidante, antibacteriana e citotóxica), mostrando o potencial terapêutico e industrial desses produtos, também se propôs a verificar se tais extratos de própolis atenderiam as exigências mínimas descritas na IN nº 3 e se poderiam ser comercializados. Como mencionado anteriormente, tal legislação autoriza a comercialização não só de própolis, mas também de outros produtos apícolas, tendo como base os teores de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos produtos, dentre outros critérios. Assim, tais mensurações foram realizadas nos quatro extratos de própolis investigados nesse trabalho, sendo os resultados apresentados na TABELA 10.

Para inferir o teor de fenólicos e flavonoides totais no própolis bruto, foi necessário antes calcular o rendimento dos EPMs. O rendimento (η) em porcentagem do EPM verde foi de $61,83 \pm 0,24$, do EPM de tubuna de $63,03 \pm 0,16$, do EPM de mandaçaia de $36,41 \pm 0,75$ e do EPM de plebeia de $87,01 \pm 1,04$. Apesar de serem provenientes de diferentes espécies de abelhas, os EPMs verde e tubuna apresentaram rendimentos similares. O EPM de mandaçaia apresentou o menor rendimento, devido ao fato dessa espécie de abelha produzir um tipo particular de PB, denominado geoprópolis, que é caracterizado pela adição de terra ou barro ao material resinoso (DUTRA *et al.*, 2008), aumentando assim o volume do própolis e diminuindo o conteúdo dos outros componentes. Plebeia, embora produza menos PB do que as outras espécies, apresentou alto rendimento do EPM, em virtude desse gênero de abelhas produzir um própolis extremamente maleável e com menor teor de impurezas.

Os valores de fenólicos totais variaram de $29,27 \pm 0,78$ a $197,74 \pm 3,80$ mgEAG/g para o EPM e de $29,27 \pm 0,77$ a $146,41 \pm 4,84$ mgEAG/g para o EPH. Em ambos os extratos, mandaçaia apresentou o maior teor de fenólicos totais, com valores de $197,74$ e $146,41$ mgEAG/g, respectivamente. Porém, em relação ao PB, os maiores valores do teor de fenólicos totais foram observados para os extratos verde (9,52%) e tubuna (9,44%).

Para o conteúdo de flavonoides totais, os valores obtidos variaram de $3,60 \pm 0,08$ a $149,79 \pm 0,46$ mgEQ/g para o EPM e $3,60 \pm 0,23$ a $141,26 \pm 3,89$ mgEQ/g para o

EPH. Os própolis verde e tubuna apresentaram os maiores teores de flavonoides em ambos os extratos, incluindo o PB (9,26% e 3,50%, respectivamente).

O própolis de plebeia apresentou os menores valores tanto para o conteúdo de fenólicos, quanto para o conteúdo de flavonoides totais em EPM, EPH e PB (TABELA 10).

TABELA 10 – TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS E PRÓPOLIS BRUTO (PB) DAS QUATRO ESPÉCIES DE ABELHAS.

Tipo de própolis	Conteúdo total de fenólicos			Conteúdo total de flavonoides		
	Extrato mole (EPM)	Extrato hidroetanólico ^a (EPH)	Própolis bruto ^b (PB)	Extrato mole (EPM)	Extrato hidroetanólico ^a (EPH)	Própolis bruto (PB)
	mgEAG/g	mgEAG/g	%(m/m)	mgEQ/g	%(m/m)	%(m/m)
Verde	153,94±3,01	142,61±1,88	1,57	149,79±0,46	141,26±3,89	1,55
Tubuna	142,68±2,29	122,31±5,98	1,35	58,31±1,37**	55,47±0,46**	0,61
Mandaçaia	197,74±3,80*	146,41±4,84	1,61	39,42±0,47**	33,99±0,18**	0,37
Plebeia	29,27±0,78**	29,27±0,77**	0,32	3,60±0,08**	3,60±0,23**	0,04

NOTA: EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina. ^aIgual a um extrato preparado com etanol 70% e 11% (m/v) de extrato de própolis mole. ^bA porcentagem de fenólicos e flavonoides totais no PB foi calculada a partir da conversão dos fenólicos e flavonoides totais obtidos em 100 g dos extratos de própolis mole (EPM) e posteriormente correlacionados com o rendimento (%) de cada extrato obtido. Os resultados para os extratos moles e extratos hidroetanólicos são expressos como a média ± desvio padrão (n = 3). * p < 0,05 ou ** p < 0,01 em comparação com o padrão de própolis verde (teste de Holm-Sidak).

FONTE: A autora (2022).

Embora os métodos de Folin-Ciocalteu e Dowd apresentem algumas limitações técnicas, como reações inespecíficas, interferência da cor do extrato e efeito batocrômico da absorção causado pela complexação com alumínio não uniforme para todos os flavonoides (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014; AMORATI; VALGIMIGLI, 2015), os resultados dos teores fenólicos e de flavonoides totais corroboram com a caracterização realizada pelo MIR.

Levando-se em consideração os critérios estabelecidos pela IN nº 3, os resultados obtidos demonstraram que os PBs e EPHs dos extratos de própolis verde, tubuna e mandaçaia, poderiam ser aprovados pela legislação brasileira para uso comercial em âmbito nacional e internacional. Já para o própolis de plebeia, nenhum dos extratos avaliados se enquadraram nos critérios estabelecidos.

O potencial antioxidante dos EPMs, avaliado através do ensaio DPPH, foi representado em CI_{50} , sendo igual a $75,31 \pm 2,09 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$), $88,94 \pm 3,41 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$), $25,00 \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) e $2.096,65 \pm 11,74 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) para os própolis verde, tubuna, mandaçaia e plebeia, respectivamente. Os resultados demonstram que o EPM de mandaçaia apresentou maior capacidade antioxidante que os demais extratos, embora seja inferior ao determinado para o padrão ácido ascórbico ($4,70 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$). Este resultado foi confirmado no espectro de ATR-IR, uma vez que o EPM de mandaçaia apresentou um pico em torno de 1634 cm^{-1} (TABELA 6 e FIGURA 12-C) que está associado a um elevado potencial antioxidante, o qual foi demonstrado pelo ensaio de DPPH (MOTȚ; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011).

O potencial antioxidante dos extratos de própolis avaliados nesse trabalho pode ser justificado pela quantidade de substâncias fenólicas presentes nos mesmos, uma vez que estas possuem um esqueleto de carbono adequado para a estabilização de radicais livres (SIMÕES *et al.*, 2017). Dessa forma, como os extratos de própolis verde, mandaçaia e tubuna apresentaram um teor de fenóis e flavonoides superior ao apresentado pelo extrato de plebeia, foram capazes de neutralizar de maneira mais eficaz o radical DPPH, apresentando maior potencial antioxidante que este. Por fim, cabe ressaltar que outros fatores relacionados a posição das hidroxilas e o grau de hidroxilação também afetam o potencial antioxidante de substâncias fenólicas (LARRAURI *et al.*, 1996). Outro parâmetro que apesar de não ser considerado na legislação brasileira para a comercialização de propolis e seu uso, trata-se do quesito de segurança. Nesse sentido, ensaios pré-clínicos realizados em camundongos, bem

como *trials* clínicos relatam que os própolis e seus constituintes são geralmente bem tolerados e não promovem toxicidade, a menos que sejam administrados em grandes quantidades (BAZMANDEGAN *et al.*, 2017). Além disso, tem sido observado que o efeito adverso mais comum da administração do própolis é a hipersensibilidade, principalmente em relação à aplicação tópica, resultando em reações alérgicas, edema, dermatite e urticária (HSU *et al.*, 2004). Por fim, tendo como base estudos realizados com animais e aplicando uma margem de segurança para extrapolar uma dose segura de própolis para uso em humano saudáveis, foi estabelecida a dose de 1,4 mg/Kg/dia (ALKIS *et al.*, 2015).

Apesar desses dados serem extremamente promissores no sentido de demonstrar o uso seguro do própolis, ressalta-se que estes estudos, em sua maioria, são realizados com própolis de abelhas melíferas. Ainda, considerando-se a grande variação na composição química e os diferentes tipos de própolis existentes, alegações relacionadas aos efeitos promovidos pelos própolis na saúde de indivíduos, tornam-se difíceis (ANJUM *et al.*, 2019). Por fim, levando-se em consideração os resultados obtidos no CAPÍTULO 1 deste trabalho, os quais mostram uma citotoxicidade significativa promovida pelos extratos de própolis em células tumorais e em fibroblastos, salienta-se a necessidade da realização de outros ensaios para verificar se a toxicidade induzida por estes produtos é clinicamente relevante. Com isso, possibilitaria a comercialização, a industrialização e o uso dos extratos de tubuna e de mandacaria, evidenciados aqui como os mais promissores.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais conclusões obtidas neste capítulo são:

- A caracterização química dos extratos de própolis realizada pela MIR reiterou a natureza complexa das amostras e confirmou os principais grupos químicos nas substâncias identificadas pelo UPLC-QToF-ESI-MS/MS;

- Os modelos PCA e PLS-DA mostraram-se satisfatórios para a discriminação e classificação dos extratos de própolis avaliados;

- Os parâmetros avaliados de fenólicos e flavonoides totais, de acordo com a legislação brasileira, demonstraram que o PB e extratos hidroetanólicos do própolis verde, tubuna e mandaçaia são adequados para comercialização e consumo humano. No entanto, plebeia não obedece aos critérios estabelecidos;

- O EPM de mandaçaia apresentou a maior capacidade antioxidante pelo ensaio do radical DPPH;

- O própolis bruto e os extratos de própolis das abelhas-sem-ferrão tubuna e mandaçaia apresentam potencial para uso industrial; entretanto, outros critérios estabelecidos pela legislação também devem ser observados, além de parâmetros de toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABD JALIL, M. A; KASMURI, A. R; HADI, H. Stingless Bee Honey, the Natural Wound Healer: A Review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 30, n. 2, p. 66–75, 2017. DOI. 10.1159/000458416
- ABDI, H; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics**, v. 2, n. 4, p. 433-459, 2010. DOI. 10.1002/wics.101
- AFROUZAN, H; TAHGHIGHI, A; ZAKERI, S; ES-HAGHI, A. Chemical composition and antimicrobial activities of Iranian Propolis. **Iranian Biomedical Journal**, v. 22, p. 50-65, 2018. DOI. 10.22034/ibj.22.1.50
- AHMED, S; SULAIMAN, S. A; BAIG, A. A; IBRAHIM, M; LIAQAT, S; FATIMA, S; JABEEN, S; SHAMIM, N; OTHMAN, N. H. Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n.8367846, 2018. DOI. 10.1155/2018/8367846
- AJAYKUMAR, C. Overview on the side effects of doxorubicin. In: ARNOUK, H; HASSAN, B. A. R. (Ed.). *Advances in precision medicine oncology*, Intech Open, Londres, 2020. DOI. 10.5772/intechopen.94896
- ALENCAR, S. M; OLDONI, T. L; CASTRO, M. L; CABRAL, I. S; COSTA-NETO, C. M; CURY, J. A; ROSALEN, P. L; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 2007. DOI. 10.1016/j.jep.2007.06.005
- ALFAROUK, K. O; STOCK, C. M; TAYLOR, S; WALSH, M; MUDDATHIR, A. K; VERDUZCO, D; BASHIR, A. H; MOHAMMED, O. Y; ELHASSAN, G. O; HARGUINDEY, S; RESHKIN, S. J; IBRAHIM, M. E; RAUCH, C. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 71, 2015. DOI. 10.1186/s12935-015-0221-1
- ALKIS, H.E; KUZHAN, A; DIRIER, A; TARAKCIOGLU, M; DEMIR, E; SARICICEK, E; DEMIR, T; AHLATCI, A; DEMIRCI, A; CINAR, K; TAYSI, S. Neuroprotective effects of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the radiation-injured brain tissue (Neuroprotective effects of propolis and CAPE). **International Journal of Radiation Research**, v.13, n. 4, p. 297–303, 2015. DOI. 10.7508/ijrr.2015.04.002
- ALSHORBINY, M. A; BHUYAN, D. J; RADWAN, I; CHANG, D; LI, C. G. Metabolomic Identification of Anticancer Metabolites of Australian Propolis and Proteomic Elucidation of Its Synergistic Mechanisms with Doxorubicin in the MCF7 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 7840, 2021. DOI. 10.3390/ijms22157840
- AMALIA, E; DIANTINI, A; SUBARNAS, A. Water-soluble propolis and bee pollen of *Trigona* spp. from South Sulawesi Indonesia induce apoptosis in the human breast

cancer MCF-7 cell line. **Oncology Letters**, v. 20, n. 5, p. 274, 2020. DOI. 10.3892/ol.2020.12137

AMJAD M. T; CHIDHARLA A; KASI A. Cancer Chemotherapy. *In*: **StatPearls**. Flórida: StatPearls Publishing, 2022.

AMORATI, R; VALGIMIGLI, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. **Free Radical Research**, v. 49, n. 5, p. 633–649, 2015. DOI. 10.3109/10715762.2014.996146

ANJUM, S. I; ULLAH, A; KHAN, K. A; ATTAULLAH, M; KHAN, H; ALI, H; BASHIR, M. A; TAHIR, M; ANSARI, M. J; GHRAMH, H. A; ADGABA, N; DASH, C. K. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, 2019. DOI. 10.1016/j.sjbs.2018.08.013

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet (London, England)**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022. DOI. 10.1016/S0140-6736(21)02724-0

ARU, B; GÜZELMERIC, E; AKGÜL, A; DEMIREL, G. Y; KIRMIZIBEKMEZ, H. Antiproliferative Activity of Chemically Characterized Propolis from Turkey and Its Mechanisms of Action. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 7, p. e1900189, 2019. DOI. 10.1002/cbdv.201900189

ASTM E1655-17. **Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ASTM International, E13.11, 2012.

AVENT, M. L; ROGERS, B. A; CHENG, A. C; PATERSON, D. L. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal Medicine Journal**, v. 41, n. 6, p. 441–449, 2011. DOI. 10.1111/j.1445-5994.2011.02452.x

BADISA, R. B; DARLING-REED, S. F; JOSEPH, P; COOPERWOOD, J. S, LATINWO, L. M; GOODMAN, C. B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, p. 2993–2996, 2009.

BAILIE, G. R; NEAL, D. Vancomycin ototoxicity and nephrotoxicity. A review. **Medical Toxicology and Adverse Drug Experience**, v. 3, n. 5, p. 376–386, 1988. DOI. 10.1007/BF03259891

BAJKACZ, S; BARANOWSKA, I; BUSZEWSKI, B; KOWALSKI, B; LIGOR, M. Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS Method. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 3563–3575, 2018. DOI. 10.1007/s12161-018-1332-9

BALLABIO, D; CONSONNI, V. Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3790–3798, 2013.

BALLOUX, F; VAN DORP, L. Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 91, 2017. DOI. 10.1186/s12915-017-0433-z

BANKOVA, V; BERTELLI, D; BORBA, R; CONTI, B. J; DA SILVA CUNHA, I. B; DANERT, C; EBERLIN, M. N; FALCÃO, S. I; ISLA, M. I; MORENO, M. I. N; PAPOTTI, G; POPOVA, M; SANTIAGO, K. B., SALAS, A., SAWAYA, A. C. H. F., SCHWAB, N. V., SFORCIN, J. M., SIMONE-FINSTROM, M; SPIVAK, M; TRUSHEVA, B; VILAS-BOAS, M; WILSON, M; ZAMPINI, C. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 2, p. 1-49, 2019. DOI. 10.1080/00218839.2016.1222661

BANKOVA, V; POPOVA, M; TRUSHEVA, B. Plant sources of propolis: An update from a chemist's point of view. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 11, p. 1023–1028, 2006. DOI. 10.1177/1934578X0600101118

BANKOVA, V; POPOVA, M; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 28, 2014. DOI. 10.1186/1752-153X-8-28

BARRETO, A. L. H; LOPES, M. T. R; PEREIRA, F. M; SOUZA, B. A. **Controle de Qualidade da Própolis**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2020. 48 p.

BARRETO, M. L; TEIXEIRA, M. G; CARMO, E. H. Infectious diseases epidemiology. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 60, p. 192-195, 2006. DOI. 10.1136/jech.2003.011593

BARROS-NETO, B; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401, 2006. DOI. 10.1590/S0100-40422006000600042

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. DOI. 10.1016/j.biopha.2016.03.049

BASSETTI, M; MERELLI, M; TEMPERONI, C; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 22, 2013. DOI. 10.1186/1476-0711-12-22

BASYIRAH, N; AZEMIN, A; RODI, M; MAT RASHID, Z; MOHD, K. Application of FTIR fingerprints coupled with chemometric for comparison of stingless bee propolis from different extraction methods. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**. V. 15, p. 350-355, 2019. DOI. 10.11113/mjfas.v15n2-1.1553

BAZMANDEGAN, G; BOROUSHAKI, M. T; SHAMSIZADEH, A; AYOObI, F; HAKIMIZADEH, E; ALLAHTAVAKOLI, M. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 503–510, 2017. DOI.

10.1016/j.biopha.2016.11.057

BENKOVIC, V; KNEZEVIC, A. H; DIKIC, D; LISICIC, D; ORSOLIC, N; BASIC, I; KOSALEC, I; KOPJAR, N. Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 851–858, 2008. DOI. 10.1016/j.phymed.2008.02.010

BERGAMASCHI, M; CIPOLAT-GOTET, C; CECCHINATO, A; SCHIAVON, S; BITTANTE, G. Chemometric authentication of farming systems of origin of food (milk and ripened cheese) using infrared spectra, fatty acid profiles, flavor fingerprints, and sensory descriptions. **Food Chemistry**, v. 305, p. 125-480, 2020. DOI. 10.1016/j.foodchem.2019.125480

BERRETTA, A. A; SILVEIRA, M. A. D; CAPCHA, J. M. C; DE JONG, D. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, n. 110622, 2020. DOI. 10.1016/j.biopha.2020.110622

BIANCOLILLO, A; MARINI, F; RUCKEBUSCH, C; VITALE, R. Chemometric Strategies for Spectroscopy-Based Food Authentication. **Applied Sciences**, v. 10, n. 18, p. 6544, 2020. DOI. 10.3390/app10186544

BITTENCOURT, M; RIBEIRO, P. R; FRANCO, R; HILHORST, H; DE CASTRO, R. D; FERNANDEZ, L. G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 449–457, 2015. DOI. 10.1016/j.foodres.2015.07.008

BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016. DOI. 10.5306/wjco.v7.i1.54

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 24, de 14 de junho de 2011**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0024_14_06_2011.pdf. Acesso em: 12 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001**. Disponível em: <http://iberpharm.com.br/www/arquivos/IN03-19-01-2001.pdf>. Acesso em: 4 mai. 2021.

BURDACK, J; HORST, F; GIESSELBACH, S; HASSAN, I; DAFFNER, S; SCHÖLLHORN, W. I. Systematic Comparison of the Influence of Different Data Preprocessing Methods on the Performance of Gait Classifications Using Machine Learning. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 260, 2020. DOI. 10.3389/fbioe.2020.00260

CALHELHA, R. C; FALCÃO, S; QUEIROZ, M. J; VILAS-BOAS, M; FERREIRA, I. C. Cytotoxicity of Portuguese propolis: the proximity of the *in vitro* doses for tumor and

normal cell lines. **BioMed Research International**, n. 897361, 2014. DOI. 10.1155/2014/897361

CAMPELLO, J. P; FONSECA, S. F. Diterpenes from *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 10, p. 2299-2300, 1975. DOI. 10.1016/S0031-9422(00)91124-5

CARRIÓN-PRIETO, P; MARTIN-GIL, J; FERNANDEZ-COPPEL, I. A; RUIZ-POSTOME, N. M; MARTIN-RAMOS, P. Physico-chemical studies of Siberian pine (*Pinus sibirica*) derived chewing gum. **Trends in Phytochemical Research**, v. 2, n. 2, p. 119–124, 2018.

CARVALHO A. A; FINGER D; MACHADO C. S; SCHMIDT E. M; COSTA P. M; ALVES A. P. N. N; *et al.* In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239–1245, 2011. DOI. 10.1016/j.foodchem.2010.12.035

CASTRO, J. P; PEREIRA-FILHO, E. R. Twelve different types of data normalization for the proposition of classification, univariate and multivariate regression models for the direct analyses of alloys by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, p. 2005–2014, 2016. DOI. 10.1039/C6JA00224B

CATTOIR, V; LECLERCQ, R. β -Lactams and staphylococci, *In*: COURVALIN, P., LECLERCQ, R., RICE, L. B. (Ed.). **Antibiogram**, Portland: Eska Publishing, 2010. p. 102–105.

CHAMBERLIN, S. R; BLUCHER, A; WU, G; SHINTO, L; CHOONOO, G; KULESZ-MARTIN, M; MCWEENEY, S. Natural Product Target Network Reveals Potential for Cancer Combination Therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 557, 2019. DOI. 10.3389/fphar.2019.00557

CHAVES, B. J; TADI, P. Gentamicin. *In*: **StatPearls**. Flórida: StatPearls Publishing, 2022.

CHEESMAN, M. J; ILANKO, A; BLONK, B; COCK, I. E. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, p. 57–72, 2017. DOI. 10.4103/phrev.phrev_21_17

CHENG, Y. T; YANG, C. C; SHYUR, L. F. Phytomedicine-Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 128–143, 2016. DOI. 10.1016/j.phrs.2016.10.022

CHOU, T. C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**, v. 70, p. 440–446, 2010. DOI. 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

CHOUDHARI, A. S; MANDAVE, P. C; DESHPANDE, M; RANJEKAR, P; PRAKASH, O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical

Practice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1614, 2020. DOI. 10.3389/fphar.2019.01614

CHOUDHARI, M. K; HAGHIAZ, R; RAJWADE, J. M; PAKNIKAR, K. M. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, n. 928280, 2013. DOI. 10.1155/2013/928280

CISILOTTO, J; SANDJO, L. P; FAQUETI, L. G; FERNANDES, H; JOPPI, D; BIAVATTI, M. W; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 502-511, 2018. DOI. 10.1016/j.jpba.2017.11.038

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**: Approved Standard, 9. ed, v. 32, n. 2, CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra, A practical Approach. *In*: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation**, v. 112, p. 1–22, 2006. DOI. 10.1002/9780470027318.a5606

COCCHI, M; BIANCOLILLO, A; MARINI, F. Chemometric Methods for Classification and Feature Selection. *In*: JAUMOT, J; BEDIA, C; TAULER, R. (Ed). **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 82, p. 265-299. Elsevier, 2018. DOI. 10.1016/bs.coac.2018.08.006

CONTIERI, L. S; DE SOUZA MESQUITA, L. M; SANCHES, V. L, VIGANÓ, J; MARTINEZ, J; DA CUNHA, D. T; ROSTAGNO, M. A. Standardization proposal to quality control of propolis extracts commercialized in Brazil: A fingerprinting methodology using a UHPLC-PDA-MS/MS approach. **Food Research International**, v. 161, p. 111846, 2022. DOI. 10.1016/j.foodres.2022.111846

CORDEIRO, H. K. C; MENEZES, C. **Análise da capacidade produtiva de própolis em diferentes espécies de abelhas sem ferrão**. XXIV Congresso Brasileiro de Zootecnia, Vitoria, ES, 2014.

COTE, B; CARLSON, L. J; RAO, D. A; ALANI, A. W. G. Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. 128–133, 2015. DOI. 10.1016/j.jconrel.2015.06.040

COZZOLINO, D; CYNKAR, W; SHAH, N; SMITH, P. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1888-1896, 2011.

CPT. **Abelhas sem ferrão**: Mirim-guaçu (*Plebeia remota*). 2022a. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/artigos/abelhas-sem-ferrao-mirim-guaçu-plebeia-remota>. Acesso em: 28 abr. 2022.

CPT. **Abelhas sem ferrão**: Tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*). 2022b. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/artigos/abelhas-sem-ferrao-tubuna-scaptotrigona-bipunctata>. Acesso em: 09 mai. 2022.

CUNHA, ILDENIZE B. S. *et al.* Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004. DOI. 10.1590/S0103-50532004000600026

CUNHA, M. S; DUTRAS, R. P; BATISTA, M. C. A. *et al.* Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba). **Cadernos de Pesquisa – UFMA**, v. 6, p. 31-38, 2009.

DA SILVA, C; PRASNIEWSKI, A; CALEGARI, M.A. *et al.* Determination of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Propolis Using ATR–FT-IR Spectroscopy and Chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2013–2021, 2018. DOI. 10.1007/s12161-018-1161-x

DANTAS SILVA, R. P; MACHADO, B. A; BARRETO, G. A; COSTA, S. S, ANDRADE, L. N; AMARAL, R. G; CARVALHO, A. A; PADILHA, F. F; BARBOSA, J. D; UMSZA-GUEZ, M. A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017. DOI. 10.1371/journal.pone.0172585

DE FÁTIMA COBRE, A; SUREK, M; STREMEL, D. P; FACHI, M. M; LOBO BORBA, H. H; TONIN, F. S; PONTAROLO, R. Diagnosis and prognosis of COVID-19 employing analysis of patients' plasma and serum via LC-MS and machine learning. **Computers in Biology and Medicine**, v. 146, p. 105659, 2022. DOI. 10.1016/j.combiomed.2022.105659

DE OLIVEIRA, P. F; DE SOUZA LIMA, I. M; MUNARI, C. C; BASTOS, J. K; DA SILVA FILHO, A. A; TAVARES, D. C. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artemillin C and baccharin. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 490–492, 2014. DOI. 10.1055/s-0034-1368298

DE RIJKE, E; OUT, P; NIESEN, W. M. A; ARIESE, F; GOOIJER, C; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31–63, 2006. DOI. 10.1016/j.chroma.2006.01.019

DE SOUZA, S. A; DA SILVA, T. M. G; DA 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. DOI. 10.1002/pca.2766

DEVEQUI-NUNES, D; MACHADO, B. A. S; BARRETO, G. A; SILVA, J. R; DA SILVA, D. F; DA ROCHA, J. L. C; BRANDÃO, H. N; BORGES, V. M; UMSZA-GUEZ, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0207676, 2018. DOI. 10.1371/journal.pone.0207676

DORON, S; GORBACH, S. Bacterial infections: overview. *In*: QUAH, S. (Ed.). **International Encyclopedia of Public Health**, 2008. p. 273–282. DOI. 10.1016/B978-012373960-5.00596-7

DOS SANTOS, C. M; CAMPOS, J. F; DOS SANTOS, H. F; BALESTIERI, J; SILVA, D. B; DE PICOLI SOUZA, K; CAROLLO, C. A; ESTEVINHO, L. M; DOS SANTOS, E. L. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. 8320804, 2017. DOI. 10.1155/2017/8320804

DOS SANTOS, H. F; CAMPOS, J. F; DOS SANTOS, C. M; BALESTIERI, J. B. P; SILVA, D. B; CAROLLO, C. A; SOUZA, K. DE P; ESTEVINHO, L. M; DOS SANTOS, E. L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 953–970, 2017. DOI. 10.3390/ijms18050953

DUTRA, R. P; NOGUEIRA, A. M. C; MARQUES, R. R. D. O; COSTA, M. C. P; RIBEIRO, M. N. S. Pharmacognostic evaluation of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith from Baixada Maranhense, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557–562, 2008. DOI. 10.1590/S0102-695X2008000400010

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014. DOI. 10.3389/fphar.2013.00177

ENGEL, M. S; RASMUSSEN, C. Corbiculate bees. *In*: STARR, C. (Ed.). **Encyclopedia of Social Insects**, Suíça: Springer Nature, 2020. p. 1-9. DOI. 10.1007/978-3-319-90306-4_30-1

ENGELKIRK, P. G; BURTON G. R. Epidemiology and public health. *In*: ENGELKIRK, P. G; BURTON G. R. (Ed.). **Burton's Microbiology for the Health Sciences**, 8. ed., cap. 11. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

ERŞAN, S; ÜSTÜNDAĞ, Ö. G; CARLE, R; SCHWEIGGERT, R. M. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 5334–5344, 2016. DOI. 10.1021/acs.jafc.6b01745

FAIR, R. J; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25–64, 2014. DOI. 10.4137/PMC.S14459

FALCÃO, L; ARAÚJO, M. E. Vegetable Tannins Used in the Manufacture of Historic Leathers. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1081, 2018. DOI. 10.3390/molecules23051081

FALCÃO, S. I; CALHELHA, R. C; TOUZANI, S; LYOUSSI, B; FERREIRA, I; VILASBOAS, M. In Vitro Interactions of Moroccan Propolis Phytochemical's on Human

Tumor Cell Lines and Anti-Inflammatory Properties. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 315, 2019. DOI. 10.3390/biom9080315

FALCÃO, S; VALE, N; GOMES, P; DOMINGUES, M. R. M; FREIRE, C; CARDOSO, S. M; VILAS-BOAS, M. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Uncommon propolis rich with flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 309–318, 2013. DOI. 10.1002/pca.2412

FALCÃO, S; VILAS-BOAS, M; ESTEVINHO, L. M; BARROS, C; DOMINGUES, M. R. M; CARDOSO, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 887–897, 2010. DOI. 10.1007/s00216-009-3232-8

FAVILLA, S; DURANTE, C; VIGNI, M. L; COCCHI, M. Assessing feature relevance in NPLS models by VIP. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 129, p. 76-86, 2013. DOI. 10.1016/j.chemolab.2013.05.013

FENG, Z; ZHANG, D; WANG, B; DING, J; LIU, X; ZHU, J. The classification of plants by laser-induced breakdown spectroscopy based on two chemometric methods. **Plasma Science and Technology**, v. 22, n. 7, p. 74012, 2020.

FERNANDES JR., A; LEOMIL, L; FERNANDES, A. A .H; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 173-182, 2001. DOI. 10.1590/S0104-79302001000200003

FORMA, E; BRYŚ, M. Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2594, 2021. DOI. 10.3390/nu13082594

FORSETH, R; SCHROEDER, F. C. NMR-spectroscopic analysis of mixtures: From structure to function. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 38–47, 2011. DOI. 10.1016/j.cbpa.2010.10.010

FOUAD, Y. A; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FREITAS, M. O; LIMA, M. S; SILVEIRA, E. R. Compostos polifenólicos do kino de *Eucalyptus citriodora*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1926-1929, 2007. DOI. 10.1590/S0100-40422007000800025

FRIÓN-HERRERA, Y; GABBIA, D; DÍAZ-GARCÍA, A; CUESTA-RUBIO, O; CARRARA, M. Chemosensitizing activity of Cuban propolis and nemorosone in doxorubicin resistant human colon carcinoma cells. **Fitoterapia**, v. 136, n. 104173, 2019. DOI. 10.1016/j.fitote.2019.104173

FROZZA, C. O; GARCIA, C. S; GAMBATO, G; DE SOUZA, M. D; SALVADOR, M; MOURA, S; PADILHA, F. F; SEIXAS, F. K; COLLARES, T; BORSUK, S; DELLAGOSTIN, O. A; HENRIQUES, J. A; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis.

Food and Chemical Toxicology, v. 52, p. 137–142, 2013. DOI. 10.1016/j.fct.2012.11.013

GALBÁCS, G. A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 25, p. 7537–7562, 2015. DOI. 10.1007/s00216-015-8855-3

GRDADOLNIK, J. ATR-FTIR spectroscopy: its advantages and limitations. **Acta Chimica Slovenica**, v. 49, p. 631–642, 2002.

GREENAWAY, W; SCAYSBROOK, T; WHATLEY, F. R. The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 232, p. 249–272, 1987. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/3624010.1098/rspb.1987.0073>

GUILIANO, M; ASIA, L; ONORATINI, G; MILLE, G. Applications of diamond crystal ATR FTIR spectroscopy to the characterization of ambers. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, n. 5, p. 1407–1411, 2007. DOI. 10.1016/j.saa.2006.10.033

GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I; LÓPEZ-IBÁÑEZ, S; MAGADÁN-CORPAS, P; FERNÁNDEZ-CALLEJA, L; PÉREZ-VALERO, Á; TUÑÓN-GRANDA, M; MIGUÉLEZ, E. M; VILLAR, C. J; LOMBÓ, F. Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1264, 2021. DOI. 10.3390/antiox10081264

HADDAD, J. E; CANIONI, L; BOUSQUET, B. Good practices in LIBS analysis: Review and advices. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 101, p. 171-182, 2014. DOI. 10.1016/j.sab.2014.08.039

HAUSER, A. R. Cell envelope. In: HAUSER, A. R. **Antibiotic Basic for Clinicians**. 2. ed. New Delhi: Wolters Kluwer (India), 2015. p. 3-5.

HAUSER, A. R; MECSAS, J; MOIR, D. T. Beyond Antibiotics: New Therapeutic Approaches for Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 1, p. 89–95, 2016. DOI. 10.1093/cid/ciw200

HOLOHAN, C; VAN SCHAEYBROECK, S; LONGLEY, D. B; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013. DOI. 10.1038/nrc3599

HOUSMAN, G; BYLER, S; HEERBOTH, S; LAPINSKA, K; LONGACRE, M; SNYDER, N; SARKAR, S. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 2014. DOI. 10.3390/cancers6031769

HRNCIR, M; JARAU, S; BARTH, F. G. Stingless bees (*Meliponini*): senses and behavior. **Journal of comparative physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 202, n. 9-10, p. 597–601, 2016. DOI. 10.1007/s00359-016-1117-9

HSU, C. Y; CHIANG, W. C; WENG, T. I; CHEN, W. J; YUAN, A. Laryngeal edema and anaphalactic shock after topical propolis use for acute pharyngitis. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 22, n. 5, p. 432–433, 2004. DOI. 10.1016/j.ajem.2004.06.007

HUTH, M. E; RICCI, A. J; CHENG, A. G. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. **International Journal of Otolaryngology**, p. 937861, 2011. DOI. 10.1155/2011/937861

KAGAWAD, P; GHARGE, S; JIVAJE, K. *et al.* Quality control and standardization of Quercetin in herbal medicines by spectroscopic and chromatographic techniques. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 176, 2021. DOI. 10.1186/s43094-021-00327-y

KAPOOR, G; SAIGAL, S; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300–305, 2017. DOI. 10.4103/joacp.JOACP_349_15

KASOTE, D; BANKOVA, V; VILJOEN, A. M. Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. **Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, p. 1–25, 2022. DOI. 10.1007/s11101-022-09816-1

KENNARD, R; STONE, L. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KIRMUSAOĞLU, S; GAREAYAGHI, N; KOCAZEYBEK, B. S. Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. In: KIRMUSAOĞLU, S. (Ed.), *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, Intech Open, Londres, 2019. DOI. 10.5772/intechopen.85211

KONTOMANOLIS, E. N; KOUTRAS, A; SYLLAIOS, A; SCHIZAS, D; MASTORAKI, A; GARMPIIS, N; DIAKOSAVVAS, M; ANGELOU, K; TSATSARIS, G; PAGKALOS, A; NTOUNIS, T; FASOULAKIS, Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. **Anticancer Research**, v. 40, n. 11, p. 6009–6015, 2020. DOI. 10.21873/anticancer.14622

KOTSIANTIS, S; KANELLOPOULOS, D; PINTELAS, P. Data Preprocessing for Supervised Learning. **International Journal of Computer Science**, v. 1, p. 111-117, 2006. DOI. 10.1080/02331931003692557

KUJUMGIEV, A; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y; BANKOVA, V; CHRISTOV, R; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

KUMAR, R; SHARMA, V. Chemometrics in forensic science. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 191-201, 2018. DOI. 10.1016/j.trac.2018.05.010

KUREK-GÓRECKA, A; KESKIN, Ş; BOBIS, O; FELITTI, R; GÓRECKI, M; OTREBA, M; STOJKO, J; OLCZYK, P; KOLAYLI, S; RZEPECKA-STOJKO, A. Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1203, 2022. DOI. 10.3390/plants11091203

KWAN, E. E; HUANG, S. G. Structural elucidation with NMR spectroscopy: Practical strategies for organic chemists. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2008, n. 16, p. 2671–2688, 2008. DOI. 10.1002/ejoc.200700966

LARRAURI, J. A; GONI, I; MARTÍN-CARRÓN, N; RUPÉREZ, P; SAURA-CALIXTO, F. Measurement of health promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v. 71, p. 515-519, 1996. DOI. 10.1002/(SICI)1097-0010(199608)71:4<515::AID-JSFA611>3.0.CO;2-Y

LAVINAS, F.C, MACEDO, E. H. B. C; SÁ, G. B. L. *et al.* Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389–399, 2019. DOI. 10.1016/j.bjp.2018.11.007

LAW, B. Y. K; MOK, S. W. F; WU, A. G; LAM, C. W. K; YU, M. X. Y; WONG, V. K. W. New potential pharmacological functions of Chinese herbal medicines via regulation of autophagy. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 359, 2016. DOI. 10.3390/molecules21030359

LEVER, J; KRZYWINSKI, M; ALTMAN, N. Principal component analysis. **Nature Methods**, v. 14, p. 641–642, 2017. DOI. 10.1038/nmeth.4346

LIANG, Y. Z; XIE, P; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 53–70, 2004. DOI. 10.1016/j.jchromb.2004.08.041

LIN, M; SHAPIRO, M. J. Mixture analysis by NMR spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4731–4733, 1997. DOI. 10.1021/ac970594x

LIU, J; ZHU, J; XUE, J; QIN, Z; SHEN, F; LIU, J; CHEN, X; LI, X; WU, Z; XIAO, W; ZHENG, C; WANG, Y. In silico-based screen synergistic drug combinations from herb medicines: A case using *Cistanche tubulosa*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI. 10.1038/s41598-017-16571-3

LIU, S; WU, M; ZHANG, Z. Involvement of DNA polymerase beta in repairing oxidative damages induced by antitumor drug adriamycin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 246, n. 3, p. 163–170, 2010. DOI. 10.1016/j.taap.2010.05.011

LÓPEZ, B. G. C; SCHMIDT, E. M; EBERLIN, M. N; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174–180, 2014. DOI. 10.1016/j.foodchem.2013.09.063

LUSTOSA, S. R; GALINDO, A. B; NUNES, L. C. C; RANDAU, K. P; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MACHADO, C. S; MOKOCHINSKI, J. B; DE LIRA, T. O; DE OLIVEIRA, F; CARDOSO, M. V; FERREIRA, R. G; SAWAYA, A. C; FERREIRA, A. G; PESSOA, C; CUESTA-RUBIO, O; MONTEIRO, M. C; DE CAMPOS, M. S; TORRES, Y. R. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 6057650, 2016. DOI. 10.1155/2016/6057650

MAHADY, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 19, p. 2405–2427, 2005. DOI. 10.2174/1381612054367481

MALDONADO, L; MARCINKEVICIUS, K; BORELLI, R; GENNARI, G; SALOMÓN, V; ISLA, M. I; VERA, N; BORELLI, V. Differentiation of argentine propolis from different species of bees and geographical origins by UV spectroscopy and chemometric analysis. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 19, n. 3, p. 185-191, 2020. DOI. 10.1016/j.jssas.2018.09.003

MARASCHIN, M; SOMENSI-ZEGGIO, A; OLIVEIRA, S. K; KUHNEN, S; TOMAZZOLI, M. M; RAGUZZONI, J. C; ZERI, A. C; CARREIRA, R; CORREIA, S; COSTA, C; ROCHA, M. Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 13–23, 2016. DOI. 10.1021/acs.jnatprod.5b00315

MARCUCCI, M. C. Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C; SAWAYA, A. C. H. F; CUSTODIO, A. R; PAULINO, N; EBERLIN, M. N. HPLC and ESI-MS typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis. In: ORŠOLIĆ, N; BAŠIĆ, I. (Ed.). **Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine**. Kerala: Transworld Research Network, 2008. p. 33–54.

MARTÍN-RAMOS, P; FERNÁNDEZ-COPPEL, I. A; RUÍZ-POTOSME, N. M; MARTÍN-GIL, J. Potential of ATR-FTIR Spectroscopy for the Classification of Natural Resins. **Biology, Engineering, Medicine and Science Reports**, v. 4, n. 1, p. 3–6, 2018.

MARZOOG, T. R. Synergistic Effect of *Rosmarinus Officinalis* extract with antibiotics against different bacterial isolates. **Engineering and Technology Journal**, v. 31, n. 5, p. 678-686, 2013.

MENSOR, L. L; MENEZES, F. S; LEITÃO, G. G; REIS, A. S; DOS SANTOS, T. C; COUBE, C. S; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1003–1012, 1999. DOI. 10.1128/AAC.43.5.1003

MODRO, A. F. H; DE SOUZA, S; ABURAYA, F. H; MAIA, E. Conhecimento dos moradores do médio Araguaia, Estado do Mato Grosso, sobre a utilidade de produtos de abelhas (Hymenoptera, Apidae). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 421-424, 2009. DOI: 10.4025/actascibiols.v31i4.4518

MONA. MassBank of North America, 2019. Disponível em: <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000851410>. Acesso em: 15 dec. 2019.

MONTEIRO, W. R. (APACAME). **A mandacaria**. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/57/nativas.htm>. Acesso em: 10 mai. 2022.

MORENO, M. I. N; ISLA, M. I; CUDMANI, N. G; VATTUONE, M. A; SAMPIETRO, A. R. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 97–102, 1999. DOI. 10.1016/s0378-8741(99)00051-3

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983. DOI. 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOTJ, A.C; SILAGHI-DUMITRESCU, R; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 516–522, 2011. DOI. 10.1016/j.jfca.2010.11.006

MUROI, H; KUBO, I. Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 4, p. 387–394, 1996. DOI. 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03233.x

NAGAI, T; INOUE, R; INOUE, H; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003. DOI. 10.1016/S0308-8146(02)00231-5

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016. DOI. 10.1021/acs.jnatprod.5b01055

NICOLI, R; MARTEL, S; RUDAZ, S; WOLFENDER, J. L; VEUTHEY, J. L; CARRUPT, P. A; GUILLARME, D. Advances in LC platforms for drug discovery. **Expert Opinion in Drug Discovery**, v. 5, p. 475–489, 2005. DOI. 10.1517/17460441003733874

NIKAM, P. H; KAREPARAMBAN, J; JADHAV, A; KADAM, V. Future trends in

standardization of herbal drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 38–44, 2012.

NINA, V; QUISPE, C; JIMENEZ-ASPEE, F; THEODULOZ, C; GIMENEZ, A; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 2142–2153, 2015. DOI. 10.1002/jsfa.7330

NOLL, F. B. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera; Apinae), with special reference to social behavior. **Cladistics**, v. 18, n. 2, p. 137–153, 2002.

NURGALI, K; JAGOE, R. T; ABALO, R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 245, 2018. DOI. 10.3389/fphar.2018.00245

NYMAN, G; OLDBERG WAGNER, S; PRYSTUPA-CHALKIDIS, K; RYBERG, K; HAGVALL, L. Contact Allergy in Western Sweden to Propolis of Four Different Origins. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 100, n. 16, p. adv00256, 2020. DOI. 10.2340/00015555-3615

OH, J. M; JANG, H. J; KIM, W. J; KANG, M. G; BAEK, S. C; LEE, J. P; PARK, D; OH, S. R; KIM, H. Calycosin and 8-O-methylretusin isolated from *Maackia amurensis* as potent and selective reversible inhibitors of human monoamine oxidase-B. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 441–448, 2020. DOI. 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.144

OLIVEIRA, G. R. A; GRASEL, F. S; DE PINHO, G. P; SILVÉRIO, F. O. Characterizing the chemical composition of lipophilic Extracts from *Acacia mearnsii* Wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 341–350, 2020. DOI. 10.21577/0103-5053.20190186

OLIVEIRA, R. N; MANCINI, M. C; DE OLIVEIRA, F. C. S; PASSOS, T. M; QUILTY, B; THIRÉ, R. M. S. M; MCGUINNESS, G. B. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Revista Materia**, v. 21, n. 3, p. 767–779, 2016. DOI. 10.1590/S1517-707620160003.0072

OMENE, C; KALAC, M; WU, J; MARCHI, E; FRENKEL, K; O'CONNOR, O. A. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 5, n. 10, p. 334–342, 2013.

ONBAS, R; KAZAN, A; NALBANTSOY, A; YESIL-CELIK TAS, O. Cytotoxic and Nitric Oxide Inhibition Activities of Propolis Extract along with Microencapsulation by Complex Coacervation. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 286–293, 2016. DOI. 10.1007/s11130-016-0558-1

ORŠOLIĆ, N; CAR, N; LISIČIĆ, D; BENKOVIĆ, V; KNEŽEVIĆ, A. H; DIKIĆ, D; PETRIK, J. Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on ehrlich ascites tumor in mice. **Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 102, n. 12, p. 4395–4405, 2013. DOI. 10.1002/jps.23755

OSÉS, S. M; MARCOS, P; AZOFRA, P; DE PABLO, A; FERNÁNDEZ-MUÍÑO, M. Á; SANCHO, M. T. Phenolic Profile, Antioxidant Capacities and Enzymatic Inhibitory Activities of Propolis from Different Geographical Areas: Needs for Analytical Harmonization. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 75, 2020. DOI. 10.3390/antiox9010075

PADMAVATHI, R; SENTHILNATHAN, P; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146, n. 3, p. 349-354, 2006. DOI. 10.1016/j.cbpc.2006.03.009

PAGACZ, J; STACH, P; NOWAK, L. N; NAGLIK, B; DRZEWICZ, P. Preliminary thermal characterization of natural resins from different botanical sources and geological environments. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, p. 4279-4288, 2019. DOI. 10.1007/s10973-019-08157-0

PAPICH, M. G. Oxacillin sodium. In: PAPICH, M. G. (Ed.). **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**, 4. ed. W. B. Saunders, 2016. p. 585-586. DOI. 10.1016/B978-0-323-24485-5.00425-3

PAPOTTI, G; BERTELLI, D; PLESSI, M; ROSSI, M. C. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1610–1618, 2010. DOI. 10.1111/j.1365-2621.2010.02310.x

PARK, Y. K; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.

PATEL, S; PREUSS, C. V; BERNICE, F. Vancomycin. In: **StatPearls**. Flórida: StatPearls Publishing, 2022.

PATRA, S; MISHRA, S. R; BEHERA, B. P; MAHAPATRA, K. K; PANIGRAHI, D. P; BHOL, C. S; PRAHARAJ, P. P; SETHI, G; PATRA, S. K; BHUTIA, S. K. Autophagy-modulating phytochemicals in cancer therapeutics: Current evidences and future perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v. 80, p. 205–217, 2022. DOI. 10.1016/j.semcancer.2020.05.008

PATRA, S; PRADHAN, B; NAYAK, R; BEHERA, C; ROUT, L; JENA, M; EFFERTH, T; BHUTIA, S. K. Chemotherapeutic efficacy of curcumin and resveratrol against cancer: Chemoprevention, chemoprotection, drug synergism and clinical pharmacokinetics. **Seminars in Cancer Biology**, v. 73, p. 310–320, 2021. DOI. 10.1016/j.semcancer.2020.10.010

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014

PEKAL, A; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 1776–1782, 2014. DOI. 10.1007/s12161-014-9814-x

PEREIRA, A. DOS S; SEIXAS, F. R. M. S; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, F. A. N; BARBOZA, J. R; VASCONCELOS, C. C; LOPES, A. J. O; RIBEIRO, M. N. S. Use of Stingless Bee Propolis and Geopropolis against Cancer-A Literature Review of Preclinical Studies. **Pharmaceuticals** (Basel, Switzerland), v. 14, n. 11, p. 1161, 2021. DOI. 10.3390/ph14111161

PESSINI, G. L; DIAS FILHO, B. P; NAKAMURA, C. V; CORTEZ, D. A. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1115–1120, 2003. DOI. 10.1590/s0074-02762003000800025

PICCINELLI, A. L; MENCHERINI, T; CELANO, R; MOUHOUBI, Z; TAMENDJARI, A; AQUINO, R. P; RASTRELLI, L. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5080-5088, 2013. DOI. 10.1021/jf400779w

PICCINELLI, A. L; LOTTI, C; CAMPONE, L; CUESTA-RUBIO, O; CAMPO-FERNANDEZ, M; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6484–6491, 2011. DOI. 10.1021/jf201280z

POBIEGA, K; KRAŚNIEWSKA, K; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 53-62, 2019. DOI. 10.1016/j.tifs.2018.11.007

POŘÍZKA, P; KLUS, J; PROCHAZKA, D; KÉPEŠ, E; HRDLIČKA, A; NOVOTNÝ, J; NOVOTNÝ, K; KAISER, J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy coupled with chemometrics for the analysis of steel: The issue of spectral outliers filtering. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 123, p.114-120, 2016. DOI. 10.1016/j.sab.2016.08.008

PRZYBYŁEK, I; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial Properties of Propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019. DOI. 10.3390/molecules24112047

PUJIRAHAYU, N; SUZUKI, T; KATAYAMA, T. Cycloartane-Type Triterpenes and Botanical Origin of Propolis of Stingless Indonesian Bee *Tetragonula sapiens*. **Plants**, v. 8, n. 3, p. 57, 2019. DOI. 10.3390/plants8030057

REBIAI, A; HEMMAMI, H; ZEGHOUD, S; BEN SEGHIR, B; KOUADRI, I; EDDINE, L. S; ELBOUGHDIRI, N; GHAREBA, S; GHERNAOUT, D; ABBAS, N. Current Application of Chemometrics Analysis in Authentication of Natural Products: A

Review. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 25, n. 6, p. 945–972, 2022. DOI. 10.2174/1386207324666210309102239

RIVERO-CRUZ, J. F; GRANADOS-PINEDA, J; PEDRAZA-CHAVERRI, J; PÉREZ-ROJAS, J. M; KUMAR-PASSARI, A; DIAZ-RUIZ, G; RIVERO-CRUZ, B. E. Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 70, 2020. DOI. 10.3390/antiox9010070

RODRIGUEZ-SAONA, L. E; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food. **Annual review of food science and technology**, v. 2, p. 467–483, 2011. DOI. 10.1146/annurev-food-022510-133750

ROSI, F; LEGAN, L; MILIANI, C; ROPRET, P. Micro transflection on a metallic stick: an innovative approach of reflection infrared spectroscopy for minimally invasive investigation of painting varnishes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 3187–3197, 2017. DOI. 10.1007/s00216-017-0260-7

ROUVEIX, B. Antibiotic Safety Assessment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 3, p. 215-221, 2003. DOI. 10.1016/S0924-8579(02)00354-0

RUBINHO, M. P; DE CARVALHO, P. L. N; REIS, A. L. L. E; DE ALENCAR, S. M; RUIZ, A. L. T. G; DE CARVALHO, J. E; IKEGAKI, M. A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis and their antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. **Natural Product Research**, v. 21, p. 1–6, 2019. DOI. 10.1080/14786419.2019.1607851

RUIZ-PEREZ, D; NARASIMHAN, G. So you think you can PLS-DA? **bioRxiv**, p. 207225, 2018.

RYBAK, M. J; LOMAESTRO, B. M; ROTSCHAFER, J. C; MOELLERING, R. C; JR; CRAIG, W. A; BILLETER, M; DALOVISIO, J. R; LEVINE, D. P. Therapeutic Monitoring of Vancomycin in Adults. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 29, p. 1275-1279, 2009. DOI. 10.1592/phco.29.11.1275

SACHAN, M; KAUR, M. Epigenetic modifications: therapeutic potential in cancer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 526-539, 2015. DOI. 10.1590/S1516-8913201500132

SADEER, N. B; MAHOMOODALLY, M. F. Antibiotic Potentiation of Natural Products: A Promising Target to Fight Pathogenic Bacteria. **Current drug targets**, v. 22, n. 5, p. 555–572, 2021. DOI. 10.2174/1389450121666200924113740

SAK, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2012, p. 282570, 2012. DOI. 10.1155/2012/282570

SAKHTEMAN, A; KESHAVARZ, R; MOHAGHEGHZADEH, A. ATR-IR fingerprinting as a powerful method for identification of traditional medicine samples: a report of 20

herbal patterns. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 3, p. 1–8, 2015.

SALATINO, A; FERNANDES-SILVA, C. C; RIGHI, A. A; SALATINO, M. L. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 5, p. 925–936, 2011. DOI. 10.1039/c0np00072h

SALEHAN, M. R., MORSE, H. R. DNA damage repair and tolerance: A role in chemotherapeutic drug resistance. **British Journal of Biomedical Science**, v. 70, p. 31-40, 2013. DOI. 10.1080/09674845.2013.11669927

SAMPAIO, P. S; BRITES, C. M. Near-Infrared Spectroscopy and Machine Learning: Analysis and Classification Methods of Rice. *In*: HUANG, M. (Ed.). **Integrative Advances in Rice Research**. Londres: Intech Open, 2021. DOI. 10.5772/intechopen.99017

SAWAYA, A. C. H. F; CUNHA, I. B. D. S; MARCUCCI, M. C; AIDAR, D. S; SILVA, E. C. A; CARVALHO, C. A. L; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis of native Brazilian stingless bees. **Apidologie**, v. 38, p. 93-103, 2007. DOI. 10.1051/apido:2006058

SAWAYA, A. C. H. F; CUNHA, I. B. S; MARCUCCI, M. C; RODRIGUES, R. F. O; EBERLIN, M. N. Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 398–407, 2006. DOI. 10.1051/apido:2006011

SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894–905, 2016. DOI. 10.1002/ptr.5605

SFORCIN, J. M., CONTI, B. J., SANTIAGO, K. B., CARDOSO, E.O., CONTE, F. L., OLIVEIRA, L. P. G., ARAÚJO, M. J. A. M. **Própolis e geoprópolis**: uma herança das abelhas. São Paulo: Unesp Digital, 2017. p. 10-69.

SFORCIN, J. M; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011. DOI. 10.1016/j.jep.2010.10.032

SHAHINOZZAMAN, M; OBANDA, D. N; TAWATA, S. Chemical composition and pharmacological properties of Macaranga-type Pacific propolis: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 1, p. 207-222, 2021. DOI. 10.1002/ptr.6819

SILVA, M. S; CITÓ, A. L; CHAVES, M. H; LOPES, J. D. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina - PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 801-804, 2005. DOI. 10.1590/S0100-40422005000500013

SIMÕES; C. M. O; SCHENKEL; E. P; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

SINGH, V. K; ARORA, D; ANSARI, M. I; SHARMA, P. K. Phytochemicals based

chemopreventive and chemotherapeutic strategies and modern technologies to overcome limitations for better clinical applications, **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 12, p. 3064–3089, 2019. DOI. doi.org/10.1002/ptr.6508

SKENDERIDIS, P; MITSAGGA, C; GIAVASIS, I; PETROTOS, K; LAMPAKIS, D; LEONTOPOULOS, S; HADJICHRISTOFOULOU, C; TSAKALOF, A. The *in vitro* antimicrobial activity assessment of ultrasound assisted *Lycium barbarum* fruit extracts and pomegranate fruit peels. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 13, p. 2017–2031, 2019. DOI. 10.1007/s11694-019-00123-6

SOO, V. W. C; KWAN, B. W; QUEZADA, H; CASTILLO-JUÁREZ, I; PÉREZ-ERETZA, B; GARCÍA-CONTRERAS, S. J; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M; WOOD, T. K; GARCÍA-CONTRERAS, R. Repurposing of Anticancer Drugs for the Treatment of Bacterial Infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1157–1176, 2017. DOI. 10.2174/1568026616666160930131737

STEINMANN, D; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 744–757, 2011. DOI. 10.1016/j.jpba.2010.11.015

SUNG, B; PANDEY, M. K; AHN, K. S; YI, T; CHATURVEDI, M. M; LIU, M; AGGARWAL, B. B. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4880–4891, 2008. DOI. 10.1182/blood-2007-10-117994

SZLISZKA, E; KUCHARSKA, A. Z; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A; MERTAS, A; CZUBA, Z. P; KRÓL, W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 976415, 2013. DOI. 10.1155/2013/976415

TAKARA, K; FUJITA, M; MATSUBARA, M; MINEGAKI, T; KITADA, N; OHNISHI, N; YOKOYAMA, T. Effects of propolis extract on sensitivity to chemotherapeutic agents in HeLa and resistant sublines. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 9, p. 841–846, 2007. DOI. 10.1002/ptr.2165

TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 288 p.

THARWAT, A. Principal component analysis: a tutorial. **International Journal of Applied Pattern Recognition**, v. 3, n. 3, p. 197-240, 2016. DOI. 10.1504/IJAPR.2016.079733

THIRUGNANASAMPANDAN, R; RAVEENDRAN, S. B; JAYAKUMAR, R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 651–654, 2012. DOI. 10.1016/S2221-1691(12)60114-2

TORRES, A. R; SANDJO, L. P; FRIEDEMANN, M. T; TOMAZZOLI, M. M; MARASCHIN, M; MELLO, C. F; SANTOS, A. R. S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, p. 1-10, 2018. DOI. 10.1590/1414-431X20187118

TRIPLEHORN, C. A; JOHNSON, N. F. **Estudos dos insetos**: Tradução de Borror and DeLong's introduction to the study of insects. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809 p.

TUORKEY, M. J. Cancer Therapy with Phytochemicals: Present and Future Perspectives. **Biomedical and Environmental Sciences: BES**, v. 28, n. 11, p. 808–819, 2015. DOI. 10.3967/bes2015.112

VALENCIA, D; ALDAY, E; ROBLES-ZEPEDA, R; GARIBAY-ESCOBAR, A; GALVEZ-RUIZ, J. C; SALAS-REYES, M; JIMÉNEZ-ESTRADA, M; VELAZQUEZ-CONTRERAS, E; HERNANDEZ, J; VELAZQUEZ, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, v. 131, p. 645-651, 2012. DOI. 10.1016/j.foodchem.2011.08.086

VELIKOVA, M; BANKOVA, V; MARCUCCI, M. C; TSVETKOVA, I; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, v. 55, p. 785-789, 2000. DOI. 10.1515/znc-2000-9-1018

WACKHARD, A. A; AWAD, A. H; BHAGAT, A; KARUPPAYIL, S. M. Synergistic Activation of Doxorubicin against Cancer: A Review. **American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, p. 1-6, 2018.

WANG, P; YU, Z. Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 5, p. 277-284, 2015. DOI. 10.1016/j.jpha.2015.04.001

WHITE, R. L; BURGESS, D. S; MANDURU, M; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1914–1918, 1996. DOI. 10.1128/aac.40.8.1914

WHO. World Health Organization. **Cancer key facts**. 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 05/ago/2022.

WHO. World Health Organization. **Cancer overview**. 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab>. Acesso em: 12/jul/2022.

WISE, B. M; GALLAGHER, N. B; BRO, R; SHAVER, J. M; WINDIG, W; KOCH, R. S. PLS Toolbox 4.0 for use with MATLAB. **Eigenvector Research Inc.**, Manson, WA, 2006.

WITTER, S; BLOCHTEIN, B. **Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul**. 1. ed. Porto Alegre: Versátil Artes Gráficas, 2009. 70 p.

WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

XUAN, H; WANG, Y; LI, A; FU, C; WANG, Y; PENG, W. Bioactive Components of Chinese Propolis Water Extract on Antitumor Activity and Quality Control. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 9641965, 2016. DOI. 10.1155/2016/9641965

YAROSHCHYK, P; EBERHARDT, J. E. Automatic correction of continuum background in Laser-induced Breakdown Spectroscopy using a model-free algorithm. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 99, p. 138-149, 2014. DOI. 10.1016/j.sab.2014.06.020

YE, M; YANG, W. Z; LIU, K. DI; QIAO, X; LI, B. J.; CHENG, J; FENG, J; GUO, D. A; ZHAO, Y. Y. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSn. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 35-42, 2012. DOI. 10.1016/j.jpha.2011.09.009

YILMAZ, Ç; ÖZCENGİZ, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 43–62, 2017. DOI. 10.1016/j.bcp.2016.10.005

ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. e13394, 2020. DOI. 10.1111/jfbc.13394

ZHANG, T; WU, S; TANG, H; WANG, K; DUAN, Y; LI, H. Progress of Chemometrics in Laser-induced Breakdown Spectroscopy Analysis, **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 939-948, 2015. DOI. 10.1016/S1872-2040(15)60832-5

ZHOU, Y; XU, G; CHOI, F. F. K; DING, L. S; HAN, Q. BIN; SONG, J. Z.; QIAO, C. F; ZHAO, Q. S; XU, H. X. Qualitative and quantitative analysis of diterpenoids in *Salvia* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4847–4858, 2009. DOI. 10.1016/j.chroma.2009.04.017

ZINGUE, S; NDE, C. B. M; MICHEL, T; NDINTEH, D. T; TCHATCHOU, J; ADAMOU, M; FERNANDEZ, X; FOHOUE, F. N. T; CLYNE, C; NJAMEN, D. Ethanol-extracted Cameroonian propolis exerts estrogenic effects and alleviates hot flushes in ovariectomized Wistar rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1-17, 2017. DOI. 10.1186/s12906-017-1568-8

ZOROV, N. B; GORBATENKO, A. A; LABUTIN, T. A; POPOV, A. M. A review of normalization techniques in analytical atomic spectrometry with laser sampling: From single to multivariate correction. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 8, p. 642-657, 2010. DOI. 10.1016/j.sab.2010.04.009

ANEXO 1 –INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 03, DE 19-01-2001 (PARCIAL)**INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 03, DE 19-01-2001**

DOU 23-01-2001

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA, SUBSTITUTO, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 83, inciso IV do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998, considerando que é necessário instituir medidas que normatizem a industrialização de produtos de origem animal, garantindo condições de igualdade entre os produtores e assegurando a transparência na produção, processamento e comercialização, e o que consta do Processo nº 21000.002814/2000-67, resolve:

Art. 1º Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.

Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

RUI EDUARDO SALDANHA VARGAS

ANEXO VI

REGULANIENTO TÉCNICO PARA FIXAÇÃO DE SENTIDADE E QUALIDADE DE PRÓPOLIS

1. Alcance

1.1. Objetivo: Estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a Própolis.

1.2. Âmbito de Aplicação: O presente Regulamento refere-se à Própolis destinada ao comércio nacional ou internacional.

2. Descrição

2.1. Definição: Entende-se por Própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto.

2.2. Classificação:

2.2.1 Quanto ao teor de flavonóides:

2.2.1.1. A própolis será classificada em:

- Baixo teor: até 1,0 % (m/m);
- Médio teor: >1,0% - 2,0 % (m/m);
- Alto teor: >2,0 % (m/m).

2.3. Designação (Denominação de Venda): Própolis.

3. Referências:

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Normas ABNT. Plano de Amostragem e Procedimentos na Inspeção por atributos - 03.011 - NBR 5426 - JAN/1985.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, , 1992.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 16th Edition, cap. 4.1.03, 1995.

4. Composição e Requisitos

4.1. Composição: A Própolis compõem-se basicamente de resinas, produtos balsâmicos, cera, óleos essenciais, pólen e microelementos.

4.2. Características Sensoriais:

4.2.1. Aroma: característico (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica;

4.2.2. Cor amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica;

4.2.3. Sabor: característico de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica;

4.2.4. Consistência (à temperatura ambiente): maleável a rígida, dependendo da origem botânica;

4.2.5. Granulometria: heterogênea.

4.3. Requisitos físico-químicos:

4.3.1. Perda por dessecação: máximo de 8 % (m/m);

4.3.2. Cinzas: máximo de 5% (m/m);

4.3.3. Cera: máximo de 25 % (m/m);

4.3.4. Compostos Fenólicos: mínimo 5 % (m/m);

4.3.5. Flavonóides: mínimo de 0,5 % (m/m);

4.3.6. Atividade de oxidação: máximo de 22 segundos;

4.4. Provas Qualitativas:

4.4.1. Espectro de Absorção de Radiações Ultravioleta e Visível - a própolis deverá apresentar picos característicos das principais classes de flavonóides entre 200 e 400 nm;

4.4.2. Acetato de chumbo - Positivo;

4.4.3. Hidróxido de Sódio-Positivo.

4.4. Acondicionamento: O produto deverá ser embalado com materiais adequados para as condições de armazenamento e que lhe confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação.

5. Aditivos

Não se autoriza.

6. Contaminantes

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento específico.

6.1. Outros contaminantes:

Pesquisa de esporos de *Paenibacillus lavrae* em 25g de própolis (utilizando a metodologia descrita na Portaria 248, de 30/12/1998). Resultado Aceitável: ausência de esporos em 25g.

7. Higiene

7.1. Considerações Gerais:

As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o

O produto não deve conter substâncias estranhas, com exceção dos fragmentos, acidentalmente presentes, de: abelhas, madeira, vegetais e outros, inerentes ao processo de obtenção da própolis pelas abelhas.

Nota: Os critérios de tolerância, macro e microscópicos, serão estabelecidos em regulamento específico.

7.3. Critérios Microbiológicos.

Aplica-se o Regulamento Específico.

8. Pesos e Medidas

Aplica-se o Regulamento específico.

9. Rotulagem

Aplica-se o Regulamento específico.

10. Métodos de Análise

Farmacopéia Brasileira 4ª Edição - 1988 - V 2.9 e V 2.10.

Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produto de Origem Animal e seus Ingredientes. Portaria nº 001181 - 07/10/1981. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

Metodologias validadas pelo Ministério da Agricultura.

Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Pesquisa de *Paenibacillus larvae* em mel e produtos apícolas. Portaria 248 - 30/12/ 1998. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

REGULAMENTO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE EXTRATO DE PRÓPOLIS

1. Alcance

1.1. Objetivo: Estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender o Extrato de Própolis.

1.2. Âmbito de Aplicação: O presente Regulamento refere-se ao Extrato de Própolis destinado ao comércio nacional ou internacional.

2. Descrição

2.1. Definição: Entende-se por Extrato de Própolis o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da Própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado.

2.2. Designação (Denominação de Venda): Extrato de Própolis.

3. Referências:

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Normas ABNT. Plano de Amostragem e Procedimentos na Inspeção por atributos- 03.011 - NBR 5426 - JAN/1985.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, , 1992.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 16th Edition, cap. 4.1.03, 1995.
- ASIS, M. Propoleo - El Oro Purpura de las Abejas. Cuba, 1989
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97

4.1. Composição:

O extrato de Própolis compõe-se de elementos solúveis da própolis em solução hidroalcoólica, álcool e água.

4.2. Requisitos:

4.2.1. Características Sensoriais:

4.2.1.1. Aroma: característico, dependendo da origem botânica (balsâmico e resinoso);

4.2.1.2. Cor: variada, dependendo da origem e da concentração (tons de âmbar, avermelhada e esverdeada);

4.2.1.3. Sabor: característico, de suave a forte, amargo e picante;

4.2.1.4. Aspecto: líquido límpido e homogêneo.

4.2.2. Requisitos Físico-Químicos:

4.2.2.1. Extrato seco: Mínimo de 11% (m/v);

4.2.2.2. Cera: máximo 1% do extrato seco (m/m);

4.2.2.3. Compostos flavonóides: Mínimo 0,25%(m/m);

4.2.2.4. Compostos fenólicos: Mínimo 0,50% (m/m);

4.2.2.5. Atividade de oxidação: Máximo 22 seg. ;

4.2.2.6. Teor alcoólico: Máximo de 70° GL (v/v);

4.2.2.7. Metanol: Máximo 20 mg (vinte miligramas) de metanol /100 mL (cem mililitros)

4.2.2.8. Espectro de Absorção de Radiações UV visível: o extrato de própolis deve apresentar picos característicos das principais classes de flavonóides entre 200 nm e 400 nm;

4.2.2.9. Acetato de Chumbo: Positivo;

4.2.2.10. Hidróxido de Sódio: Positivo.

4.2.3. Acondicionamento:

Deverá ser embalado em material bromatologicamente apto e que confira ao produto uma proteção adequada.

5. Aditivos

Não se admite.

6. Contaminantes

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento vigente.

6.1. Outros contaminantes:

Pesquisa de esporos de *Paenibacillus larvae* em 25ml de extrato de própolis (utilizando a metodologia descrita na Portaria 248, de 30/12/1998). Resultado Aceitável: ausência de esporos em 25ml.

7. Higiene

7.1. Considerações Gerais:

As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos.

7.3. Critérios Microscópicos:

O produto não deverá conter matérias estranhas, de qualquer natureza.

8. Pesos e Medidas

Aplica-se o Regulamento específico.

9. Rotulagem

Aplica-se o Regulamento específico, com a seguinte informação adicional - Extrato Seco: mínimo de ...%.

10. Métodos de Análise

Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Qualidade;

Metodologias validadas pelo Ministério da Agricultura;

Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Pesquisa de *Paenibacillus larvae* em mel e produtos apícolas. Portaria 248 - 30/12/1998. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

11. Amostragem

Seguem-se os procedimentos recomendados pela norma vigente (ABNT).