

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAYARA SOARES CUNHA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GEOPRÓPOLIS
DE *Melipona fasciculata* Smith**

São Luís/ MA

2017

MAYARA SOARES CUNHA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GEOPRÓPOLIS
DE *Melipona fasciculata* Smith**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção de título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

São Luís/MA

2017

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

Soares Cunha, Mayara.

Composição química e atividade antitumoral da
geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith / Mayara Soares
Cunha. - 2017.

138 f.

Orientador(a): Maria Nilce Sousa Ribeiro.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2017.

1. Antitumoral. 2. Geoprópolis. 3. *Melipona*
fasciculata. 4. Taninos hidrolisáveis. 5. Triterpenos.
I. Sousa Ribeiro, Maria Nilce. II. Título.

MAYARA SOARES CUNHA

COMPOSTOS ANTITUMORAIS DA GEOPRÓPOLIS DE
Melipona fasciculata Smith

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Maranhão
Orientadora

Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais
(Fitoquímica) – Instituto Agrônômico de Campinas

Prof. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha

Departamento de Química - Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Flavia Maria Mendonça do Amaral

Departamento de Farmácia- Universidade Federal do Maranhão

A minha filha amada, Leila. A minha família maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter abençoado a mim e a minha família, enchendo nossas vidas de graças, e por ter me dado saúde, força e esperança para que este se concluísse.

Aos meus pais pelo verdadeiro alicerce que me deram e por sempre cuidarem de mim com muito amor e sabedoria.

Aos meus irmãos, André, Marlison e Assis Junior, por existirem em minha vida e por me darem muita alegria.

Ao meu marido, Agnaldo T. Silva Carvalho, que muito me ajudou, dando-me carinho e compreendendo todos os momentos difíceis.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro, um agradecimento muito especial pela confiança, pelo carinho, por ser essa pessoa batalhadora, amiga, mãe, sempre preocupada com seus alunos, minha verdadeira inspiração, agradeço muito a Deus por a ter colocado na minha vida, aprendi muito ao seu lado, e não somente conhecimentos científicos, mas conhecimentos para a vida toda.

À Profa Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e a Profa Dra Ana Paula Azevedo, pelas contribuições nos testes biológicos e por sempre terem me recebido com muito carinho no Laboratório de Imunofisiologia.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia I, Richard Dutra, Marisa Batista, Bruno Abreu, Vanessa Silva, Josiane Barbosa, José Wilson Mesquita, Ludmilla Mesquita, Wilany Esposito, Jessyca Wan Lume, Tallison Taylor, Andrea Jansen, Kleyton Veras pelo companheirismo nas horas de trabalho.

À Anne Karine e ao André do Laboratório de Imunofisiologia por terem me acompanhado nos testes antitumorais e pelo grande carinho.

À Profa Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral, pelas contribuições que sempre foram relevantes para engrandecer o trabalho e pelo carinho.

À Universidade Federal do Maranhão, pela infraestrutura para que esta pesquisa fosse realizada, e a todos os seus funcionários que direta ou indiretamente ajudaram na concretização desse trabalho.

Ao Laboratório de Imunofisiologia onde os testes biológicos foram realizados.

A CAPES pela bolsa de doutorado.

À FAPEMA pelo apoio financeiro do projeto “Validação de produtos bioativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* (tiúba) da Baixada Maranhense como base para certificação do recurso natural”.

Ao CNPq pelo apoio financeiro de projetos.

Aos meliponicultores pela doação das amostras de geoprópolis e por acreditarem nessa matéria-prima que ainda tem muito a contribuir para a ciência.

*“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter;
repugna-la-íamos se a tivéssemos. O perfeito é o
desumano porque o humano é imperfeito”.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Melipona fasciculata Smith (tiúba) é bastante cultivada no estado do Maranhão, principalmente nas regiões da Baixada e Cerrado e é uma abelha sem ferrão que produz mel, cera e geoprópolis, que é constituído por material resinoso coletado de espécies vegetais, misturado com cera, secreções salivares e terra. Estudos têm demonstrado que a geoprópolis de tiúba possui diversas atividades biológicas como antimicrobiana, leishmanicida, antioxidante, anti-helmíntica, antiproliferativa mostrando ser um produto natural promissor para novas pesquisas. Portanto, este trabalho teve por objeto avaliar a composição química por CL-EM-EM e o potencial antitumoral de extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* da Baixada e Cerrado maranhense. As amostras de geoprópolis foram coletadas nos municípios de Fernando Falcão, Cerrado e Palmeirândia-MA, Baixada, sendo que a coleta da geoprópolis do Cerrado foi pontual e a coleta da geoprópolis da Baixada foi temporal, mas todas as amostras foram submetidas a processo extrativo com solução hidroetanólica 70%, por maceração por 48h. Por se tratar de amostras de geoprópolis diferentes, foi possível desenvolver dois trabalhos, o primeiro foi com a amostra do Cerrado cujo extrato foi EGP que foi submetido a fracionamento com solventes de polaridade crescente e a avaliação da composição química, do teor fenólico, da atividade antioxidante e da ação citotóxica para células do tumor de Ehrlich, MCF-7 e RAW. Os resultados desse primeiro trabalho mostraram que EGP e suas frações acetato de etila (FA) e fração hidrometanólica (FM) têm altos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante e que tanto o EGP e essas duas frações (FM e FA) apresentam a melhor citotoxicidade para as células tumorais. No extrato EGP foi possível identificar 10 substâncias todas como taninos hidrolisáveis derivados do ácido gálico e ácido elágico. No segundo trabalho, com amostras da geoprópolis da Baixada, a coleta foi randomizada e anual, obtendo-se seis amostras e conseqüentemente seis extratos, codificados de EG1 a EG6 e avaliou-se a citotoxicidade para células do tumor de Ehrlich e conseqüente triagem para avaliação da composição química e ação antitumoral *in vivo* com tumor de Ehrlich na forma ascítica e sólida. Os resultados mostraram que os extratos da geoprópolis apresentaram concentração inibitória (CI₅₀) entre 180 a 419µg/mL para citotoxicidade com células tumorais, sendo selecionados quatro extratos mais citotóxicos e com perfil químico mais semelhante para identificação dos seus constituintes, que através de comparação com dados na literatura foi possível identificar tentativamente 13 substâncias, entres elas,

triterpenos, benzofenonas e um alcaloide. A partir de então, escolheu-se um extrato, o mais citotóxico *in vitro* e com maior rendimento, para avaliação antitumoral *in vivo* e os resultados demonstraram que EG1 inibiu o desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich, uma vez que reduziu o número de células tumorais, o volume ascítico, e aumentou a sobrevivência dos camundongos e que quando administrado de forma profilática e terapêutica sobre o tumor sólido de Ehrlich, as doses de 0,5 e 5 mg/kg inibem o desenvolvimento do tumor quando comparado ao controle e a dose 50 mg/kg. Com base nos resultados, observou-se que a geoprópolis de *M. fasciculata* da Baixada e Cerrado maranhense possuem um potencial antitumoral, mas com composição química diferente, conseqüentemente atuam por mecanismos terapêuticos diferentes, sendo necessário a continuação desses estudos para descoberta completa destes mecanismos de ação responsável pela atividade citotóxica.

Palavras-chave: Geoprópolis. *Melipona fasciculata*. Taninos hidrolisáveis. Triterpenos. Benzofenonas. Tumor Ehrlich. MCF-7.

ABSTRACT

Melipona fasciculata Smith (tiúba) is widely cultivated in the state of Maranhão, mainly in the Baixada and Cerrado regions, and is a stingless bee that produces honey, wax and geopropolis, which consists of resinous material collected from vegetable species, mixed with wax, salivary secretions and soil. Studies have shown that the thropic geopropolis has several biological activities, such as antimicrobial, leishmanicide, anti-helminthic, anthelmintic and antiproliferative, proving to be a promising natural product for further research. Therefore, the objective of this work was to evaluate the chemical composition by LC-MS-MS And the antitumor potential of extracts of geopropolis of *Melipona fasciculata* of Baixada and Cerrado of Maranhão. The geopropolis samples were collected in the municipality of Fernando Falcão, Cerrado and Palmeirândia-MA, Baixada, and the collection of the Cerrado geopropolis was punctual and the collection of the Baixada geopropolis was temporary, but all samples were submitted to extractive process with 70% hydroethanol solution, by steeping for 48h. Because of the different geopropolis samples, it was possible to develop two studies, the first one was the Cerrado sample whose EGP extract was submitted to fractionation with increasing polarity solvents and the evaluation of the chemical composition, phenolic content, activity antioxidant and cytotoxic action for Ehrlich tumor cells, MCF-7 and RAW. The results of this first work showed that EGP and its fractions ethyl acetate (FA) and hydrometanic fraction (FM) have high levels of phenolic compounds and antioxidant activity and that both EGP and these two fractions (FM and FA) present the best cytotoxicity for tumor cells. In the EGP extract it was possible to identify 10 substances all as hydrolysable tannins derived from gallic acid and ellagic acid. In the second work, with samples from the Baixada geopropolis, the collection was randomized and annual, obtaining six samples and consequently six extracts, encoded from EG1 to EG6 and evaluating the cytotoxicity to Ehrlich tumor cells and consequently screening for evaluation of the chemical composition and antitumor action *in vivo* with Ehrlich tumor in ascitic and solid form. The results showed that the extracts of the geopropolis had an inhibitory concentration (IC50) of 180 to 419 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for cytotoxicity with tumor cells, being selected four more cytotoxic extracts and with more similar chemical profile to identify their constituents, that by comparison with data In the literature it was possible to tentatively identify 13 substances, among them, triterpenes, benzophenones and an alkaloid. Thereafter, a more cytotoxic *in vitro* and higher yielding extract was selected for *in vivo* antitumor evaluation and the results demonstrated that EG1 inhibited the development of Ehrlich ascites tumor, as it

reduced the number of tumor cells, ascites volume, and increased survival of the mice and that when administered prophylactically and therapeutically on Ehrlich solid tumor, doses of 0.5 and 5 mg/kg inhibited tumor development when compared to control and dose 50 mg/kg. Based on the results, it was observed that the geopolyis of *M. fasciculata* from Baixada and Cerrado do Maranhão possess an antitumor potential, but with different chemical composition, consequently they act by different therapeutic mechanisms, being necessary the continuation of these studies for the complete discovery of these mechanisms of Responsible for cytotoxic activity.

Keywords: Geopolyis. *Melipona fasciculata*. Hydrolysable tannins. Triterpenes. Benzophenones. Tumor Ehrlich. MCF-7

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** *Melipona fasciculata* Smith (túbu) (esquerda) e colmeia de *Melipona fasciculata* (direita). Foto: Will Mesquita, 2016..... 21
- Figura 2.** Caixa rústica com colméia de *Melipona fasciculata* Smith com geoprópolis nas bordas da caixa. Fonte: Will Mesquita, 2016..... 24
- Figura 3.** Estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. Fonte: Sutandyo, 2013..... 36
- Figura 4.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2016..... 37

CAPITULO 1

- Figura 1.** Viabilidade das células tumorais da forma ascítica do tumor experimental de Ehrlich frente às concentrações de 0 µg/mL; 62,5 µg/mL; 125 µg/mL; 250 µg/mL e 500 µg/mL do extrato (EGP) e suas frações (Fração hidrometanólica- FM, Fração Acetato de Etila - FA, Fração Clorofórmica – FC e Fração Hexânica - FH) da geoprópolis de *Melipona fasciculata*. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) ANOVA (One way/Newman-Keuls)..... 67
- Figura 2.** Viabilidade das células MCF-7 (A) e RAW (B) frente às concentrações de 0,9 µg/mL; 1,9 µg/mL, 3 µg/mL, 7 µg/mL, 15 µg/mL, 31 µg/mL, 62,5µg/mL; 125µg/mL; 250µg/mL e 500 µg/mL do extrato de geoprópolis de *Melipona fasciculata* (EGP). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). ANOVA (One way/Newman-Keuls)..... 68
- Figura 3.** Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico da geoprópolis (EGP) de *Melipona fasciculata* Smith por CLAE-UV (280nm)..... 70
- Figura 4.** Estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis identificados no extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (EGP)..... 71

CAPITULO 2

- Figure 1.** Chromatographic profile of the hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1 to EG6) obtained by HPLC-UV-vis (254nm). 105
- Figure 2.** Base peak chromatogram (BPC) of the hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1, EG2, EG5 and EG6) obtained by HPLC-DAD..... 106
- Figure 3.** Chemical structure of compounds tentatively identified in the geopropolis extracts of *Melipona fasciculata*..... 107
- Figure 4.** Cell viability of the ascitic form of experimental Ehrlich tumor treated with 0, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL concentrations of hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1 to EG6). Different letters indicate significant differences (p<0.05), *** (p<0.001) ANOVA (One way/Newman-Keuls)..... 108
- Figure 5.** In vitro antitumor activity of hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1 to EG6) represented by mean inhibitory concentration (IC₅₀). The symbols and the vertical lines represent the means ± standard deviations of the indicated means (n=3), #Indicates a significant difference between them (p<0.01), ANOVA (Kruskal-Wallis)..... 109
- Figure 6.** Effect of treatment with a hydroethanolic extract of *Melipona fasciculata* geopropolis (EG1) on the development of Ehrlich ascites tumor. The animals were treated intraperitoneally with EG1 at the doses of 0.5, 5.0 and 50 mg/kg or with PBS (control) and inoculated with 2x10⁶ tumor cells 48 hours later. Ten days after inoculation, ascites was collected for the evaluation of volume (A), aspect (non-hemorrhagic-1, semi-hemorrhagic-2 and hemorrhagic-3) (B), total number of tumor cells (C), and tumor cell viability (D). Survival was monitored (E) and mean number of days of survival was calculated (F). Data represent the mean ± S.D. for 5 animals per group. *p≤ 0.05 compared to control. # p≤ 0.05 compared to the remaining EG1 doses..... 110
- Figure 7.** Effect of treatment with *Melipona fasciculata* geopropolis on solid Ehrlich tumor development in mice. Swiss mice were treated intraperitoneally with EG1 for prophylaxis and therapy at the doses of 0.5, 5 and 50 mg/kg. The

control groups received only PBS. Forty-eight hours after prophylactic or therapeutic treatment, the animals were inoculated with 105 Ehrlich tumor cells in the footpad and paw thickness was measured every 2 days with a digital pachymeter (A and B). Difference between the final and initial thickness after prophylaxis and therapy, respectively (C and D). Data are the mean \pm S.E.M. for 6 animals per group. *indicates a significant difference between the control and treated groups ($p \leq 0.05$), #indicates a significant difference between the treated groups ($p \leq 0.05$).....

111

Figure 8. Photomicrograph of footpad tumor cells of mice with Ehrlich tumor treated with a hydroethanolic extract of *Melipona fasciculata* geopropolis (EG1). Swiss mice were treated prophylactically and therapeutically with EG1 at the doses of 0.5, 5 and 50 mg/kg by the intraperitoneal route. The control groups received only PBS. The images represent histological sections of the footpad 14 days after Ehrlich tumor inoculation, stained with hematoxylin-eosin and analyzed at 400x magnification. Photomicrographs showing a panoramic view of neoplastic tissue in the dermis. Sagittal section. (A) Prophylactic control, (B) prophylactic EGS 0.5, (C) prophylactic EGS 5, (D) prophylactic EGS 50, (E) Therapeutic control, (F) therapeutic EGS 0.5, (G) therapeutic EGS 5, (H) therapeutic EGS 50. The black arrows indicate tumor cells and the red arrow indicates an inflammatory infiltrate.....

112

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Principais espécies de abelhas sem ferrão da Tribo Meliponini cultivadas nas regiões do Brasil (Adaptado de VILLA-BOAS, 2012).....	22
Tabela 2. Composição química da geoprópolis de espécies do gênero <i>Melipona</i>	28
Tabela 3. Atividade antitumoral de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão	42

CAPITULO 1

Tabela 1. Concentração de fenóis totais e atividade antioxidante do extrato e frações da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i>	69
Tabela 2. Compostos fenólicos tentativamente identificados no extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> por CL-DAD-ESI-EM/EM.....	70

CAPITULO 2

Table 1. Compounds tentatively identified in the geopropolis extract (EG) of <i>Melipona fasciculata</i> Smith by HPLC-DAD-ESI-EM/EM.....	103
Table 2. Effect of intraperitoneal (ip.) treatment with a hydroethanolic extract of <i>Melipona fasciculata</i> Smith geopropolis (EG1) on the increase of animal life expectancy.....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE- ESI-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte electrospray
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EG	Extrato de geoprópolis
EI	Ionização por impacto de elétrons
EM\EM	Espectro de fragmentação de massa-massa (<i>Tandem-MS</i>)
FA	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmica
FH	Fração hexânica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salina
<i>p/v</i>	Relação peso com volume
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Tr	Tempo de retenção
TMZ	Agente alquilante temozolomida
UV-Vis	Ultravioleta- Visível

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	Xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	Xiii
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Meliponíneos.....	20
2.2 Composição química de própolis e geoprópolis de meliponíneos.....	24
2.3 Câncer.....	35
2.4 Câncer e produtos naturais.....	38
2.5 Câncer e própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão.....	39
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos.....	30
4. RESULTADOS.....	47
4.1 CAPÍTULO 1 - Atividade citotóxica e antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão (<i>Melipona fasciculata</i> Smith) do Maranhão, Brasil.....	47
4.2 CAPÍTULO 2 - Antitumor activity and chemical composition of geopropolis from <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	72
5. CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS.....	126

1 INTRODUÇÃO

A maioria das abelhas sociais e as mais amplamente cultivadas e conhecidas pela população estão abrigadas na família Apidae, que está subdividida em quatro subfamílias: Andreninae, Apinae, Colletinae, Halictinae, Megachilinae (CAMARGO & PEDRO, 2013), e que possuem um importante papel na polinização da vegetação nativa e na manutenção da diversidade de plantas, tornando-se essenciais na conservação de diversos ecossistemas. A subfamília Apinae possui 20 tribos dentre estas a tribo Meliponini que é constituída por abelhas sem ferrão, conhecidas como meliponíneos, por possuírem ferrão atrofiado e assim serem incapazes de ferocar (CAMARGO & PEDRO, 2013), que ocupam grande parte das regiões de clima tropical do planeta, algumas regiões de clima temperado e subtropical. Constituem um grupo ecologicamente importante, pois atuam na manutenção da diversidade das plantas nativas e cultivadas, como efetivos polinizadores, no entanto, estas espécies vêm sendo dizimados há muitos anos, através da destruição da flora nativa, redução do substrato de nidificação, coleta predatória de ninhos e introdução de espécies exóticas (NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA, et al., 2002; VELTHUIS, et al., 2003).

As abelhas sem ferrão além de produzir mel, cera e própolis produzem também a geoprópolis a partir da mistura de resinas vegetais, pólen, cera, secreções salivares e terra e/ou barro o que as diferencia da própolis que não possui terra ou barro na sua composição (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Dentre os produtos das abelhas, a própolis de *Apis mellifera*, abelha com ferrão, se destaca pelas suas diversas propriedades terapêuticas, como cicatrizante, anti-inflamatória, antisséptica, antibacteriana, antifúngica, analgésica, antioxidante e antiprotozoária (FRANCHIN et al., 2012; ODA et al., 2016; RIZZOLO et al., 2016).

Os estudos químicos e farmacológicos de própolis têm se concentrado principalmente em material proveniente de abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera*, já havendo legislação brasileira para regulamentar a padronização de seus produtos para fins de comercialização. Um cenário contrário existe para produtos de abelhas sem ferrão, pois embora utilizados popularmente como recursos terapêuticos para tratar processos inflamatórios, tumores, fraquezas, hemorroidas, gastrites, tosses, promover cicatrização (KERR, 1987), ainda não possuem legislação específica para regulamentar o uso de seus produtos no Brasil. Contudo, pesquisas já comprovaram que a própolis e a geoprópolis de abelhas sem ferrão apresentam diversas propriedades terapêuticas como anti-inflamatória

(FRANCHIN et al., 2013), antioxidante (DUTRA et al., 2008; DUTRA et al., 2011; DUTRA et al., 2014), antimicrobiana (LIBÉRIO et al., 2011a, 2011b), leishmanicida (DUTRA, 2012) e inclusive citotóxica (ASSUNÇÃO, 2011; CUNHA, 2013) e antitumoral (ARAÚJO et al., 2010; ASSUNÇÃO, 2011), antiviral (RABELO; COELHO et al., 2015), e com composição química rica em compostos polifenólicos e terpenos (DUTRA et al., 2008; DUTRA, 2012; BATISTA, 2011; DUTRA et al., 2014; BATISTA et al., 2016). Logo, produtos dessas abelhas, como a geoprópolis, que até o momento não é aproveitado economicamente, demonstra ser um recurso natural que pode no futuro representar uma alternativa no tratamento de diversas doenças como o câncer que vem se tornando um mal mundial.

Nas últimas décadas, o câncer tem ganhado uma grande magnitude, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. O número estimado de novos casos de câncer no Brasil para 2016/2017 foi de aproximadamente 600 mil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA, 2016).

Atualmente, o tratamento anticâncer tem baixa eficácia em virtude do mecanismo de ação que as drogas supressoras tumorais possuem, inibindo o crescimento ou matando as células malignas, mas sendo na sua maioria genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação de outras células neoplásicas. Assim, os produtos naturais têm sido alvos de investigações e já contribuíram com cerca de 60% dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas (NEWMAN, GRAGG, 2007; 2016).

Diante do exposto, considerando o crescente número de casos de câncer, o uso terapêutico popular de produtos de abelhas sem ferrão e o potencial tecnológico para geração de produtos, este trabalho buscou identificar composição química e avaliar atividade antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith cultivada no estado do Maranhão.

Os resultados deste trabalho estão dispostos em dois artigos, o primeiro refere-se à atividade citotóxica com células tumorais, atividade antioxidante e composição química do extrato hidroetanólico e frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata* do Cerrado maranhense e o segundo artigo, demonstra composição química e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de extratos hidroetanólicos de geoprópolis *Melipona fasciculata* da Baixada maranhense.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Meliponíneos

As abelhas pertencem à ordem dos Himenópteros, reunidas na superfamília Apoidea e as que possuem hábitos sociais mais avançados constituem a família Apidae que está subdividida em 20 tribos: Anthophorini, Apini, Bombini, Centridini, Emphorini, Ericrocidini, Eucerini, Euglossini, Exomalopsini, Isepeolini, Melectini, Meliponini, Nomadini, Osirini, Protepeolini, Rhathymini, Tapinotaspidini, Teratognathini, Tetrapediini, Xylocopini (CAMARGO; PEDRO, 2007, 2013).

A tribo Meliponini é constituída por abelhas que possuem ferrão atrofiado, conhecidas como meliponíneos ou abelhas sem ferrão, ocupando grande parte das regiões de clima tropical do planeta, algumas regiões de clima temperado e subtropical, são polinizadores eficientes devido a sua constância e fidelidade à coleta e também a sua capacidade de reconhecimento de cor e sua memorização de odor. É de vital importância a polinização das plantas pelas abelhas, não só para o meio ambiente, porque garantem a perpetuação das espécies vegetais, mas também para a agricultura, por aumentarem sensivelmente a produção de frutos e sementes (NOGUEIRA-NETO, 1997; SANTOS, 2002; SOUZA et al., 2009).

Segundo último levantamento do Moure's bee Catalogue (CAMARGO; PEDRO, 2007, 2013), 417 espécies de abelhas sem ferrão já foram descritas nas regiões neotropicais. Destas, 244 espécies são registrados para o Brasil e cerca de 87 são endêmicas no país, correspondentes a 20% das espécies neotropicais de abelhas sem ferrão e apresentam heterogeneidade na cor, tamanho, forma, hábitos de nidificação e população dos ninhos (PEDRO, 2014). Elas são abelhas sociais nativas tradicionalmente manejadas pelos indígenas sendo conhecidas também como “abelhas indígenas” (NOGUEIRA-NETO, 1997; LOPES et

al., 2005) que diferem das demais abelhas não apenas pelo ferrão, mas por outras características, como ninhos feitos em troncos de árvores, fendas em pedras ou no solo, ou pendurados em galhos; favos sobrepostos horizontalmente; deposição de pólen no mel; e a inutilização ou expulsão dos machos da colônia após fecundarem a rainha (FABICHAK, 1989, VELTHUIS et al., 2003; LEVY et al., 2004; RÊGO et al, 2008).

Na região Amazônica predominam espécies do gênero *Melipona* e na região Nordeste, especialmente no estado do Maranhão a espécie *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith. A meliponicultura, o cultivo das abelhas nativas e sua exploração racional vêm sendo desenvolvidos em diversas regiões do Brasil (Tabela 1), principalmente nas regiões Norte e Nordeste, pelas populações indígenas e rurais, o que tem contribuído para preservação da biodiversidade (LAURINO et al. 2006; VILLA-BÓAS, 2012).

No estado do Maranhão destaca-se a espécie *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, vulgarmente conhecida como tíuba ou tíuba do Maranhão (Figura 1) cujo cultivo é uma das principais fontes de renda para várias famílias da Baixada e Cerrado maranhense através da comercialização do mel que produzem. Essas abelhas são criadas principalmente em caixas rústicas sem padronização (Figura 2) e produzem além de mel, cera e geoprópolis e acumulam pólen (BEZERRA, 2004; MARTINS et al., 2011).



Figura 1. *Melipona fasciculata* Smith (tíuba) (esquerda) e colmeia de *Melipona fasciculata* (direita). Foto: Will Mesquita, 2016.

Tabela 1. Principais espécies de abelhas sem ferrão da Tribo Meliponini cultivadas nas regiões do Brasil (Adaptado de VILLA-BÓAS, 2012)

Região	Nome científico	Nome(s) Popular(es)	Estados
NORTE	<i>Melipona compressipes</i>	Jupará, Jandaira, Jandaíra-preta	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçu-cinzenta	PA, TO
	<i>Melipona seminingra</i>	Uruçu-boca-de-renda, Jandaíra-Amarela	AM, PA
	<i>Scaptotrigona sp.</i>	Canudo	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
NORDESTE	<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	MA, PI
	<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	AL, BA, PB, PE, RN, SE
	<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, Uruçu- Nordestina, Uruçu- Verdadeira.	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu	AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Scaptotrigona aff. postica</i>	Canudo	MA
CENTRO- OESTE	<i>Melipona compressipes</i>	Uruçu, Jandaíra	GO, MS, MT
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	GO, MS, MT

	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu	MT
	<i>Scaptotrigona sp.</i>	Canudo	GO, MS, MT
	<i>Tetragonista angustula</i>	Jantaí	GO, MS, MT
SUDESTE	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	MG, SP
	<i>Tetragonista angustula</i>	Jantaí	ES, MG, RJ, SP
SUL	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	PR, RS, SC
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	PR, RS, SC
	<i>Melipona mondury</i>	Monduri	PR, RS, SC
	<i>Tetragonista angustula</i>	Jantaí	PR, RS, SC

A geoprópolis (Figura 2) é formada a partir da mistura de resinas vegetais, pólen, cera, secreções salivares se diferenciando da própolis de abelhas com ferrão como *Apis mellifera*, pois apresenta sedimento de terra ou barro usado na sua elaboração, mas é usada assim como a própolis para fechar pequenas frestas, vedar entradas de ventilação excessiva, embalsamar insetos, entre outros (BARTH, 2006, NOGUEIRA-NETO, 1997).



Figura 2. Caixa rústica com colméia de *Melipona fasciculata* Smith com geoprópolis nas bordas da caixa. Fonte: Will Mesquita, 2016.

O estado do Maranhão reúne características bastante favoráveis para criação de abelhas sem ferrão, uma vez que possui uma região de transição, apresentando um grande número de ecossistemas, desde ambientes salinos com presença de manguezais, passando por campos inundáveis, cerrados, babaçuais e floresta amazônica, proporcionando às abelhas uma grande variedade de espécies vegetais e conseqüentemente influenciando na composição química e atividades biológicas dos produtos meliponícolas, em especial da geoprópolis (MUNIZ, 2004; MARTINS, 2011).

2.2 Composição química de própolis e geoprópolis de meliponíneos

A composição química de própolis e geoprópolis é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas (PARK et al., 2002) e com o período de coleta (ROCHA et al., 2003). Além disso, a variabilidade genética das abelhas rainhas também influencia na composição química (PARK et al., 1998, MOREIRA, 1986; BANKOVA 2005; SOUSA et al., 2007).

Estudos sobre a composição química de própolis e geoprópolis de meliponíneos vem sendo realizada desde a década de 90. Greenaway et al.(1991) analisando amostras de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (*Melipona* sp., *Nannotrigona tristella* Cockrell, *Scaptotrigona* sp. e *Tetragonisca* sp.) do Equador, observaram maior concentração de ácidos fenólicos, como ácido 3,5-dihidrobencóico, nessas amostras, diferentemente da própolis de *Apis mellifera* da Europa e da América do Norte, as quais são ricas em flavonoides.

Logo após, Tomas-Barberan et al. (1993) identificaram compostos fenólicos do tipo benzofenonas preniladas em própolis e geoprópolis das abelhas sem ferrão *Friseomelitta varia*, *Melipona compressipes*, *Melipona favosa*, *Scaptotrigona depilis* e *Paratrigona anduzei* oriundas da Venezuela, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM).

Analisando a própolis e a geoprópolis brasileira, produzida pelas abelhas *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Tetragona clavipes*, Bankova et al. (1998) identificaram mais de cinquenta compostos, dentre eles compostos fenólicos como benzofenonas, ácidos fenólicos e pinobaksina e triterpenos como β -amirina. Terpenos e compostos aromáticos foram identificados como constituintes majoritários em geoprópolis de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*, cultivados dos estados do Piauí e Paraná, no Brasil (KUJUMGIEV et al., 1999).

Sawaya et al. (2006) analisaram própolis de *Tetragonisca angustula* e própolis de *Apis mellifera* de diferentes estados brasileiros por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-EM), concluindo que a composição química de própolis de *Apis* é dependente da região de coleta; enquanto que a composição química de própolis de *Tetragonisca angustula* independente da região de coleta. Já em 2009, utilizando a mesma técnica (espectrometria de massas com ionização por eletrospray) observaram que a composição química de própolis das abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona* sp., *Scaptotrigona depili* e *Scaptotrigona bipunctata*, dos estados do Maranhão e São Paulo varia de acordo com a espécie de abelha, origem geográfica e época de coleta, diferente de própolis de *Tetragonisca angustula*.

Extrato etanólico e frações hexânica e aquosa da geoprópolis de *Melipona scutellaris* apresentaram atividade antinociceptiva frente a diferentes modelos de nocicepção, e sua composição química mostrou significativa presença de compostos fenólicos e ausência de flavonoides (FRANCHIN et al., 2012).

Estudos com própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Plebeia remota*, *Plebeia droryana*, *Plebeia sp.*, *Lestrimelitta spp.*, *Tetragona clavipes*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Melipona scutellaris* e *Melipona favosa*) de diferentes regiões do Brasil foram analisadas, visando a identificação da composição química e fonte vegetal usada pelas abelhas e concluíram que a maioria das abelhas sem ferrão coletaram resinas de *Schinus terebenthifolius*, espécie com ampla distribuição geográfica no território brasileiro. Nesse estudo, os autores enfatizam que as abelhas sem ferrão estudadas ignoram resinas de algumas espécies de plantas como, *Baccharis dracunculifolia*, muito utilizada por *Apis mellifera* para a produção de própolis verde (SAWAYA et al., 2007; 2011).

Dentre as abelhas sem ferrão, as espécies pertencentes ao gênero *Melipona* são as mais estudadas nos últimos anos, principalmente no Brasil, por serem espécies nativas e cultivadas em várias regiões do país. Estudos sobre a composição química de espécies do gênero *Melipoma* estão dispostos na Tabela 2.

As classes de compostos químicos ativos que predominam em geoprópolis das espécies do gênero *Melipona* são os fenólicos e terpenos, apresentando também ácidos aromáticos, hidrocarbonetos e açúcares, sendo as técnicas de CG/EM e CLAE/EM, as mais utilizadas para identificação.

Geoprópolis de *Melipona fasciculata*, espécie muito cultivada no estado do Maranhão, quando submetida à prospecção química revelou presença de compostos das classes dos compostos fenólicos, triterpenos e saponinas, além de elevados teores de polifenóis obtidos através da quantificação por métodos espectrométricos na região do UV-vis (DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

Estudos sobre a composição química de geoprópolis de *Melipona fasciculata* oriundas de diferentes localidades do estado do Maranhão demonstram que nesse material predominam substâncias das classes dos polifenólicos (taninos hidrolizáveis, flavonoides e ácidos fenólicos) e terpenos (CUNHA, 2011; DUTRA et al., 2014; BATISTA et al., 2016).

Pesquisas do grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFMA vêm demonstrando, que a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de diferentes localidades do estado do Maranhão, possui altos teores de compostos polifenólicos. Dutra et al. (2014) estudando amostras de geoprópolis de *M. fasciculata* do Cerrado maranhense mostrou que essas apresentam elevadas concentrações de polifenóis totais, alta atividade antioxidante,

além do ácido gálico, elágico e taninos hidrolisáveis, sugerindo que esses ácidos fenólicos sejam os responsáveis pela ação antioxidante da geoprópolis.

É interessante ressaltar que a geoprópolis de *M. fasciculata* da Baixada e Cerrado maranhense possuem um teor relativamente baixo de flavonoides, constituintes considerados comumente como responsáveis pelas propriedades terapêuticas de própolis de *Apis mellifera*, no entanto possuem outras substâncias como triterpenos e taninos, respectivamente, que também possuem diversas atividades biológicas.

Tabela 2. Composição química da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*

Espécies*	Local de origem	Classe de compostos	Compostos químicos	Método analítico	Referências
<i>Melipona (Melipona) favosa</i> (Fabricius, 1798)	Brasil/ Venezuela	Fenólicos	Benzofenonas preniladas	CLAE/EM CG/EM	Tomás-Barberan, et al., 1993; Velikova, et al., 2000 a.
		Terpenos	Ácidos diterpênicos, álcool triterpênico		
<i>Melipona (Melikerria) compressipes</i> (Fabricius, 1804)	Venezuela	Fenólicos	Benzofenonas preniladas, flavonoides	CLAE/EM	Tomás-Barberan, et al., 1993; Manrique & Santana, 2008.
<i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i> (Smith, 1854)	Brasil	Terpenos	α -Pinoeno, nerolidol, espatulenol, <i>t</i> -murolol, ácido dehidroabiético, ácido diterpênico, ácido diterpênico, friedooleanona-3-ona, lupeol, β -amirina, α -amirina, β -amirenona e α -amirenona.	CG/EM CLAE/EM	Bankova, et al., 1998; 1999; Kujumgiev, et al., 1999; Abreu, et al., 2006; Dutra, et al., 2008; Cunha, et al., 2009; Libério, et al., 2011; Dutra, et al., 2014; Araújo, et
		Fenólicos	Ácido gálico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido cinâmico, ácido <i>cis-p</i> -cumárico, ácido <i>trans-p</i> -cumárico, metil <i>p</i> -cumarato, hidroquinona, etilfenol, pinobanksina, dihidroximetoxiflavonona, 3-(2-OH-fenil)-		

	<p>propanolol, 3-(4-OH-fenil)-propanolol, 1-feniletanol-2-feniletanol, álcool benzílico, benzaldeído, cumarona, hidroxacetofenona, ácido gálico, ácido hexahidroxiclorogalicose, ácido hexahidroxiclorogalicose, ácido dihexahidroxiclorogalicose, trigalicose, ácido hexahidroxiclorogalicose, ácido valoneico dilactona, ácido hexahidroxiclorogalicose, ácido hexahidroxiclorogalicose, ácido elágico, ácido anacárdico, alquilresorcinol, heptadecilresorcinol, nonadecilresorcinol, pentadecilresorcinol, catequina, galocatequina, heperidina.</p>	<p>al., 2015; Araújo, et al., 2016; Batista et al., 2016.</p>
Ácidos graxos	<p>Ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido capróico.</p>	
Hidrocarbonetos	<p>Hidrocarbonetos com cadeia de C8-C25, alquibenzenos, alquilnaftalenos.</p>	

		Ácido inorgânico	Ácido fosfórico.		
		Açúcares	Glicose, pentose, dissacarídeos.		
<i>Melipona (Melipona) quadrifasciata</i> (Lepeletier, 1836)	Brasil	Terpenos	Terpineno-4-ol, <i>p</i> -menta-1,4-dien-8-ol, <i>trans</i> -carveol, carvona, <i>p</i> -cimeno, <i>p</i> -cimeno-8-ol, <i>p</i> -cimeno-7-ol, timol, sabineno, β -tujona, umbellulona, 2-careno, car-3-em-2-ona, α -pineno, β -pineno, <i>trans</i> -pinocarveol, verbenol, verbenona, aldeído α -canfoleno, β -burboneno, aromadendreno, espatulenol, óxido de cariofileno, ácido ent-kaur-16-em-19-oico, ácido ent-15 β -(3-metilbutanoiloxi-16-kauren-19-oico, ácido ent-15- β -hidroxi-16-kauren-19-oico, ácidos diterpênicos, ácidos E/Z comunico, ácido agatálico, ácido cuprêssico, ácido icocuprêssico, ácido 15-acetoxi-isocuprêssico.	CG/EM	Bankova, et al., 1998; 1999; Velikova, et al., 2000 a,b; Manrique & Santana, 2008; Cardozo, et al., 2015.
		Ácidos graxos	Ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido		

				margarínico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido pentadecanóico, ácido isovaleriânico.	
		Fenólicos		Ácido benzóico, ácido vanílico, ácido cinâmico, ácido dihidroferúlico, ácido caféico, álcool <i>p</i> -cumárico, <i>p</i> -cresol, benzaldeído, 4-isopropilideno benzaldeído, vanilina, coniferilaldeído, cumarona, flavonoides, vanilina, ácido <i>p</i> -cumarico, 3-hidroxi-4-metóxi-cinamaldeído, canferol, canferida, di-hidrocanferida.	
		Açúcar		Pentose	
		Hidrocarbonetos		C8-C25, alquibenzenos, alquilnaftalenos.	
<i>Melipona (Eomelipona) marginata</i> Brasil (Lepeletier, 1836)		Fenólicos		Ácido benzoico, ácido cinâmico, vanilina, ácido <i>p</i> -cumarico, 3-hidroxi-4-metóxi-cinamaldeído, ácido caféico, canferol, canferida, di-hidrocanferida.	CG/EM Velikova, et al., 2000a; Cardozo, et al., 2015.
		Terpenos		Ácidos E/Z comunico, ácido agatálico, ácido cuprésico, ácido icocuprésico, ácido 15-	

					acetoxi-isocuprêssico.		
<i>Melipona (Michmelia) scutellaris</i> (Latreille, 1811)	Brasil	Fenólicos	Ácido benzoico, ácido cinâmico, benzofenonas preniladas, ácido elágico, ácido gálico, catequina, galocatequina, heperidina, canferol, morina, rutina, 5,7-dihidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-propil-coumarina, 5,7-dihidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcoumarina, hidroximammeigina, cinamoiloxi-mammeisina, benzofenona prenilada, ent-nemorosone.	CG/EM	Velikova, et al., 2000 a; Franchin, et al., 2012; Cunha, et al., 2013; Araújo, et al., 2016; Da Cunha, et al., 2016.		
<i>Melipona (Melikerria) beecheyi</i> (Bennett, 1831)	México	Terpenos	3,5,5-trimetil-2-ciclopenten-1-ona, santolina trieno, triciclono, α -tujeno, α -pineno, canfeno, tuja-2,4(10)-dieno, β -pineno, 6-metil-5-hepteno-2-ona, mirceno, α -felandreno, δ -3-careno, <i>p</i> -menta-1-eno, limoneno, 1,8-cineol, m-cimeno, γ -terpineno, <i>cis</i> -sabineno hidrato do, <i>trans</i> -óxido de linalol, óxido de α -pineno, crisantenona, α -canfolenal, <i>trans</i> -pinocarveol,	CG/EM	Pino, et al., 2006; Torres-González, et al., 2016.		

cis-verbenol, *trans*-verbenol, pinocarvona, bomeol, *cis*-pinocanfona, terpineno-4-ol, p-cimeno-8-ol, α -terpineol, mirtenal, mirtenol, verbenona, *trans*-carveol, carvona, acetato de bornila, δ -elemeno, α -cubebeno, ciclosativeno, α -copaeno, β -burboneno, β -cubebeno, β -elemeno, β -cariofileno, *trans*- α -bergamoteno, α -humoleno, alo aromadendreno, γ -muroleno, biciclogermacreno, α -muroleno, β -bisaboleno, γ -cardineno, cubebol, δ -cardineno, β -vetiveno, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol, epoxido α -humuleno I, epoxido α -humuleno II, epi- α -cardinol, β -fencheno, stireno, benzaldeido, (*Z*)-ocimenona, *m*-cimeno, *trans*-isocarveol, α -canfolenal, *m*-cimenona, *trans*-pinocanfona, *trans*-pulegol.

	Hidrocarboneto	Heptadecano.			
<i>Melipona (Melipona) subnitida</i> (Ducke, 1910)	Fenólicos	6- <i>O-p</i> -coumaroil- <i>D</i> -galactopiranoze, cinnamoil-1- <i>O-p</i> -coumaroil- β - <i>D</i> -	6- <i>O</i> -	IV CLAE/EM	Souza, et al., 2013; De Sousa,

					glucopiranosose, 7- <i>O</i> -metil-naringenina, 7- <i>O</i> -metil- aromadendrina, 7,4'-di- <i>O</i> -metil aromadendrina, 4'- <i>O</i> -metil campferol, 3- <i>O</i> -metil quercetina, 5- <i>O</i> -metil aromadendrina A, 5- <i>O</i> -metil canferol, taninos hidrolisáveis, flavonoides.		et al., 2015.
				Terpenos	Triterpenos pentacíclicos livres.		
<i>Melipona (Melikerria) interrupta</i> (Latreille, 1811)	Brasil		Fenólicos	Narigenina, aromadendrina, 4'- <i>O</i> -β-D-glucopiranosideo de narigenina 3- <i>O</i> -β-D-glucopiranosideo de miricetina.	CLAE/EM RMN		Silva, et al., 2013.
<i>Melipona (Melipona) orbigny</i> (Guérin, 1844)	Brasil		Ácidos aromáticos	Ácido benzoico	CG/EM		Campos, et al., 2014.
			Fenólicos	Ácido dihidrocinâmico, ácido cinâmico, benzil-fenil cafeatos de cadeia longa, ácido cumárico C-prenilado			
			Terpenos	Ácido diterpênico, triterpenos alcoólicos.			

*Espécies de abelhas segundo o catálogo de abelhas Moure; CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas); CLAE-EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas); IV (Infra-vermelho); RMN (Ressonância Magnética Nuclear) (Adaptado de Batista, 2016).

2.3 Câncer

O câncer é doença multifatorial, caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle os quais dirigem a proliferação e a diferenciação celular (OLIVEIRA; ALVES, 2002; PATHANIA et al., 2013). A palavra câncer, nome dado para mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, tem origem latina e significa caranguejo, devido à capacidade de aderência da célula cancerígena e a obstinação de um caranguejo quando se agarra a algo.

As causas do câncer ainda não estão bem definidas, mas evidências apontam que os fatores externos ambientais sejam os principais fatores relacionados ao desenvolvimento da doença. As principais causas externas incluem os hábitos nutricionais, estilo de vida, agentes físicos (radiações ionizantes e não ionizantes), compostos químicos (naturais e sintéticos) e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*, vírus Epstein Barr, vírus do papiloma humano, vírus da hepatite B, parasitas como *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* e fatores de crescimento). Mas fatores internos também podem o induzir, como danos do sistema imune, idade, equilíbrio do sistema endócrino, condição fisiológica, inflamações causadas por etiologia desconhecida (colite ulcerosa, pancreatite etc.) e pré-disposição genética. Os fatores genéticos representam apenas 5% dos tumores, enquanto que 95% ocorrem devido a fatores ambientais, embora evidências sugiram que a maioria dos cânceres não são causados por um único fator ou evento (OLIVEIRA et al., 2007; ANAND et al., 2008; JEMAL et al., 2010; TANAKA et al., 2013; WONG et al., 2014).

O processo de desenvolvimento do câncer chamado de carcinogênese é em geral um processo complexo e de múltiplos passos, formando-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível (SUTANDYO, 2010). Os principais estágios da carcinogênese são a iniciação, a promoção e a progressão (Figura 3) (ALMEIDA et al., 2005; LASSANCE et al., 2012).

A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese e sendo um processo rápido e irreversível, onde as células saudáveis sofrem a ação de carcinógenos que modificam a estrutura do DNA resultando na alteração de genes fundamentais para regulação e controle do crescimento celular. Nessa fase a célula está geneticamente modificada e transmite a mutação

para as células filhas (GARCÍA; GONZÁLEZ-MOLES; MARTÍNEZ, 2005, TANAKA et al., 2013).

O estágio seguinte é a promoção, um processo reversível no qual ocorre alteração da expressão gênica, a célula iniciada é transformada em célula maligna de forma lenta e gradual, sendo necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno. Estes agentes quando expostos durante um período longo e continuado promovem novas alterações as quais se acumulam, adquirem vantagens proliferativas e capacidade de não responder aos mecanismos de controle do organismo. Dessa forma, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. A suspensão do contato com o agente cancerígeno muitas vezes interrompe o processo nesse estágio, porém a continuidade do processo vai resultar na proliferação e acumulação de células pré-neoplásicas (TANAKA et al., 2013; DORIA, 2015).

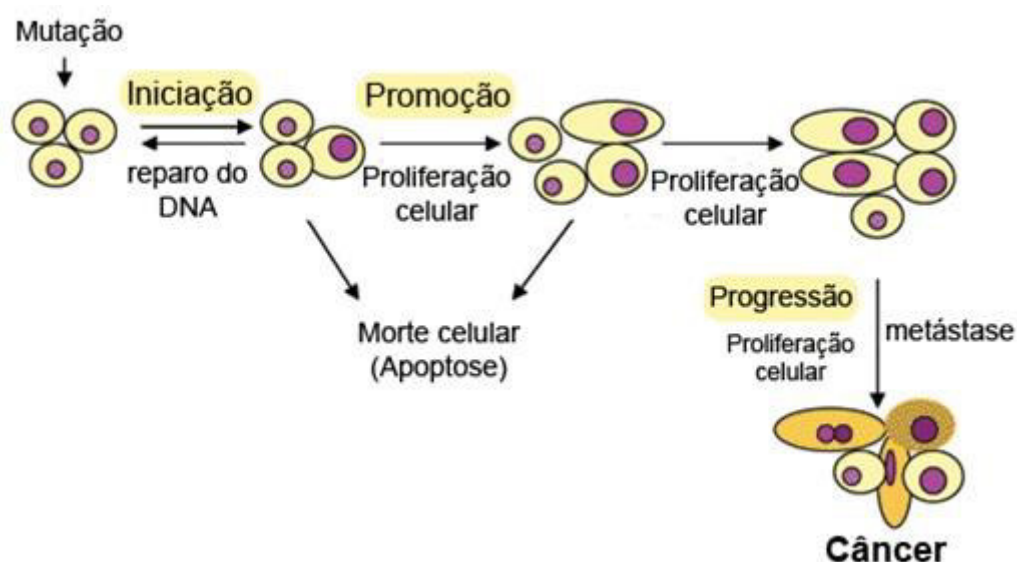



Figura 3. Estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. Fonte: Sutandyo, 2013.

A progressão, terceiro e último estágio da carcinogênese, compreende um processo irreversível caracterizado pela multiplicação descontrolada das células tumorais, instabilidade genética, perda do controle mitótico, invasão, metástase assim como alterações bioquímicas, do metabolismo e da morfologia das células, resultando no aumento da massa tumoral primária (GARCÍA; GONZÁLEZ-MOLES; MARTÍNEZ, 2005; TANAKA et al., 2013).

Câncer é uma doença invasiva que tem se apresentado como um inquestionável problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o seu impacto na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. E apesar dos notáveis avanços no tratamento observado recentemente, ainda são altas as taxas de morbidade e mortalidade, sendo a segunda maior causa de morte da população (INCA, 2016).

Nas últimas décadas, o câncer tem ganhado uma grande magnitude, o número estimado de novos casos de câncer no Brasil para 2016/2017 foi de aproximadamente 600 mil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 		Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 4. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2016.

É possível observar a existência de um perfil da magnitude de determinados tipos de câncer em países em desenvolvimento que se assemelha ao perfil em países desenvolvidos. É constatado que alguns tipos de câncer estão associados à melhor nível socioeconômico, como

o de mama, próstata, cólon e reto; enquanto elevadas taxas de incidência de câncer de colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral estão mais associados ao baixo nível socioeconômico. Incidência essa que pode ser justificada pela exposição diferenciada dos indivíduos aos agentes cancerígenos (agentes químicos, físicos e biológicos) e das condições de vida, que variam em função das desigualdades sociais (BRASIL, 2006; INCA, 2016).

O tratamento do câncer nos últimos anos ganhou grandes progressos com terapias como quimioterapia, radioterapia, cirurgia e/ou transplante de medula óssea, no entanto, ainda faz-se necessário avanço nas pesquisas em busca de drogas mais efetivas e seguras, com menos efeitos colaterais e mais seletivas (SHARMA et al., 2010; INCA, 2016; NEWMAN et al., 2016).

2.4 Câncer e produtos naturais

A terapêutica do câncer se baseia, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico e a quimioterapia. Na década de setenta estas formas clássicas de abordagem sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamento adjuvante. O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos, incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres. Infelizmente, muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento adjuvante tanto para os tumores primários quanto para as metástases (KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004). Portanto, torna-se imperativo a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir no arsenal médico, modalidades terapêuticas mais eficientes que possam oferecer ao número crescente de pacientes com doenças malignas disseminadas, oportunidades reais de controle das neoplasias (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microorganismos, no campo da oncologia, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007, 2016; HARVEY, 2008).

Dentre estes se destacam a vimblastina e a vincristina e os análogos vindesina e vinorelbina; o paclitaxel e o análogo docetaxel; a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo e teniposídeo; e a camptotecina e os análogos, topotecano e irinotecano. Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de bilhões de dólares (HARVEY, 2008; BRANDÃO et al., 2010). As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

2.5 Câncer e própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão

Os testes de citotoxicidade *in vitro* com células neoplásicas são os mais amplamente utilizados na avaliação da atividade antiproliferativa, sendo possível avaliar muitas substâncias em pouco tempo, possibilitando a descoberta de novas drogas anticâncer (SUGGIT, BIBBY, 2005). No entanto, a atividade citotóxica seletiva sobre células tumorais observada em modelos *in vitro* não se reflete necessariamente *in vivo*, pois, neste ensaio as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são consideradas, ao contrário do que acontece com os ensaios *in vitro*. Logo, o estudo combinado desses dois modelos é indicado para uma avaliação mais completa a respeito da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (SMITH et al., 2005).

Pesquisas buscando evidenciar o potencial antitumoral de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão têm utilizado ensaios *in vitro*, *in vivo* e mesmo os dois contra diversas linhagens de tumores humanos e animais.

Própolis da abelha sem ferrão *Trigona laeviceps*, coletada na região central da Tailândia, foi testada para atividade antiproliferativa *in vitro* em linhagens celulares de câncer cólon (SW620), mama (BT474), hepática (Hep-G2), pulmão (Chago) e estômago (Kato-III) e duas linhagens de células normais de fígado (CH-hepática) e de fibroblastos (SH-27); e revelou uma boa atividade antiproliferativa contra as linhagens de mama (BT474), de cólon (SW620) e de estômago (Kato-III) e a fração hexânica do extrato bruto obteve maior atividade antiproliferativa nas cinco linhagens de câncer apresentando menor citotoxicidade

sobre as células normais, demonstrando presença de compostos bioativos eficazes para essa atividade e que não possuem toxicidade para as células normais (UMTHONG et al., 2011).

Atividade antiproliferativa *in vitro* de extratos aquosos e metanólicos de própolis de *Trigona laeviceps* da Tailândia em células de câncer de cólon humano (SW620) mostraram fortes evidências de níveis significativos de perda de adesão celular e de mortalidade de células tumorais, mais comuns nas culturas tratadas com o extrato aquoso do que o extrato metanólico, tendo evidenciado atividade antiproliferativa e citotóxica de ambos os extratos sobre as células de câncer de cólon SW620 (UMTHONG, PUTHONG, CHANCHAO, 2009).

Extratos etanólicos de própolis de *Trigona spp* coletadas em cinco regiões da Indonésia (Pandeglang, Kendall, Banjarmasin, Makassar e Pekanbaru) foram testadas quanto à capacidade para induzir apoptose e a citotoxicidade para células MCF-7 (Michigan Câncer Foundation) e a própolis da região Makassar foi a que apresentou maior citotoxicidade com 47,71% de células viáveis. Própolis do mesmo gênero de abelha, *Trigona spp*, também foram testadas na Índia para avaliar seus efeitos citotóxicos e apoptóticos em quatro linhagens de células tumorais (células MCF-7 câncer de mama humano, HT-29-adenocarcinoma do cólon humano, Caco-2-adenocarcinoma colorretal humano e B16F1-melanoma de murino) revelando atividade citotóxica dose dependente com características morfológicas de apoptose em todas as linhagens de células após o tratamento com 250 µg/mL do extrato de própolis durante 24h (HASAN et al., 2014).

Aqui no Brasil também tem se estudado produtos de abelhas sem ferrão em células tumorais, como por exemplo, na Bahia onde estudando o extrato etanólico e frações de geoprópolis de *Melipona scutellaris* (cultivada na cidade de Entre Rios) frente à atividade antiproliferativa utilizando cultura de células de queratinócitos humanos, linhagem de células HaCaT, fibroblastos de murino normal (3T3) e oito linhagens de tumores humanos - células glioma (U251), melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), ovário multirresistente (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), e ovário (OVCAR-03) - foi possível observar que o extrato etanólico e a fração hexânica foram seletivos contra células tumorais humanas, embora apenas a fração hexânica demonstrou seletividade a baixas concentrações. Análises químicas desse extrato etanólico realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) sugeriram a ausência de flavonoides e a presença de benzofenonas como compostos

principais, e provavelmente os responsáveis pela atividade antiproliferativa (DA CUNHA et al., 2013).

A avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico de própolis de *Melipona orbignyi* (espécie cultivada no Mato Grosso do Sul, região centrooeste do Brasil) sobre células eritroleucêmicas K562 e demonstrou que o extrato na concentração de 500 µg/mL reduziu 83% das células viáveis, e nas concentrações de 250 e 500 µg/mL promoveram, respectivamente, a morte celular por necrose ($15\pm 1\%$ e $63\pm 2\%$) e necrose secundária ($12\pm 1\%$ e $21\pm 3\%$) das células neoplásicas, apresentado perfil dose dependente (CAMPOS et al., 2014).

Os principais dados de atividade antitumoral de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antitumoral de própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão

Espécie de abelha	Local de origem	Células tumorais	Resultado	<i>In vitro/ in vivo</i>	Composição química	Referências
<i>Trigona laeviceps</i>	Tailândia	Câncer de colón (SW620), mama (BT474), hepático (Hep-G2), pulmão (Chago) e estômago (Kato-III)	- Atividade antiproliferativa - CI ₅₀ 19,9 µg/mL - SW620 Baixa citotoxicidade para células normais	<i>In vitro</i>	Não relatado	Umthong et al. (2011)
<i>Trigona laeviceps</i>	Tailândia	SW620 (colón)	- Atividade antiproliferativa dos extratos aquosos e metanólicos - Perda de adesão celular	<i>In vitro</i>	Não relatado	Umthong et al. (2009)
<i>Trigona spp</i>	Regiões da Indonésia	MCF-7 (mama)	Propolis de Makassar: citotoxicidade – viabilidade de 47,71% e indução de apoptose	<i>In vitro</i>	Não relatado	Hasan et al. (2014)
<i>Trigona spp</i>	Índia	MCF-7 (mama), HT-29 (adenocarcinoma de colón), Caco-2 (adenocarcinoma colorretal), B16F1 (melanoma murinho)	Citotoxicidade dose dependente e indução de apoptose em todas as linhagens (250 µg/mL-24h)	<i>In vitro</i>	Não relatado	Milind et al. (2013)
<i>Melipona scutellaris</i>	Bahia - Brasil	U251 (glioma), UACC-62 (melanoma) MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário multirresistente), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário)	Atividade antiproliferativa	<i>In vitro</i>	CLAE/CG-EM Compostos principais: benzofenonas	Da Cunha et al. (2013)
<i>Melipona orbignyi</i>	Mato Grosso do Sul – Brasil	K562 (Eritroleucêmicas)	500µg/mL - Redução da viabilidade em 83% e morte por necrose com perfil dose dependente	<i>In vitro</i>	Não relatado	Campos et al. (2014)

<i>Scaptotrigona aff. postica</i>	Maranhão – Brasil	Tumor de Ehrlich forma sólida	Inibição do tumor Baixa toxicidade em altas doses de tratamento	<i>In vivo</i>	Não relatado	Araújo et al. (2010)
		Glioblastoma	Efeito antiproliferativo Efeito antiproliferativo sinérgico com TMZ	<i>In vitro</i>	Não relatado	Borges et al. (2011)
<i>Melipona fasciculata</i>	Maranhão-Brasil	Osteosarcoma (OSA)	Citotoxicidade	<i>In vitro</i>	Não relatado	Cinegaglia et al. (2013)
		HEp-2	Ação citostática	<i>In vitro</i>	CG/EM Triterpenos	Araújo et al. (2015)
		HEp-2	Geoprópolis associada ao fármaco doxorrubicina apresentou atividade citotóxica e induziu apoptose.	<i>In vitro</i>	Não relatado	Bartolomeu et al (2016)
		THP-1	Geoprópolis associada ao fármaco doxorrubicina apresentou atividade imunomoduladora.			Oliveira et al. (2016)

Própolis de *Scaptotrigona aff. postica* do estado do Maranhão apresentou atividade antitumoral *in vivo* no modelo de tumor de Ehrlich na forma sólida inibindo de forma significativa, comprovando ainda a baixa toxicidade em altas doses de tratamento (ARAÚJO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2011). Borges et al. (2011) mostraram um efeito antiproliferativo de própolis da mesma abelha (*Scaptotrigona sp*) contra glioblastoma, tumor cerebral mais comum em humanos, observando que sua combinação com o agente alquilante temozolomida (TMZ) tem efeito sinérgico antiproliferativo.

Extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do Estado do Maranhão foi testado em células de osteosarcoma (OSA) encontradas em cães e apresentaram efeito citotóxico após 6 horas, usando 50µg do extrato (CINEGAGLIA et al., 2013). Além disso, extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata* da mesma região apresentou ação citostática em células HEP-2 resistentes a carboplatina estimulando a produção de citocinas, sugerindo perfil de ativador de monócitos humanos (ARAÚJO et al., 2015).

Orsolíc et al. (2006; 2013) sugerem que a atividade antitumoral da própolis e de alguns de seus compostos está relacionada com a sua ação imunomoduladora, principalmente devido à estimulação da imunidade inata, através da ativação de macrófagos, os quais possuem importante papel na resposta antitumoral, por meio da citotoxicidade celular dependente de anticorpos, secreção de citocinas inibitórias para o crescimento tumoral e produção de intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio.

Alguns estudos também são voltados para avaliar se própolis ou geoprópolis aumentam o efeito anti-cancerígeno de agentes terapêuticos, como o desenvolvido por Bartolomeu e colaboradores (2016) onde avaliando a combinação de geoprópolis de *Melipona fasciculata* com drogas como carboplatina, metotrexato e doxorrubicina contra células carcinoma epidermóide da laringe humano (Hep-2), demonstraram que a geoprópolis inibiu a proliferação e a migração celular e a combinação de geoprópolis com doxorrubicina levou à maior atividade citotóxica, induzindo apoptose e levando à perda da integridade da membrana.

Geoprópolis da mesma região citada acima combinada com a droga doxorrubicina e usada para tratar células THP-1, linhagem monocíticas de leucemia humana, apresentou ação imunomoduladora, levando os autores a sugerir que doses mais baixas da droga podem ser utilizadas em associação com extrato da geoprópolis em pacientes com câncer, evitando efeitos colaterais e contribuindo com ação terapêutica (OLIVEIRA et al., 2016).

O número de pesquisas relacionadas à ação antitumoral da própolis e geoprópolis de abelhas sem ferrão e seus constituintes indica o caráter promissor de sua aplicabilidade e também a necessidade de novos estudos que possam contribuir para melhor aproveitamento do potencial antitumoral deste produto meliponícola.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar composição química, atividade antioxidante e atividade antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada e Cerrado maranhense.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* dos extratos e frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extrato e frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;
- Caracterizar os principais compostos químicos da geoprópolis de *Melipona fasciculata*;
- Identificar substâncias bioativas antitumorais da geoprópolis de *Melipona fasciculata*.

4. RESULTADOS

4.1 CAPITULO 1

Atividade citotóxica e antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão (*Melipona fasciculata* Smith) do Maranhão, Brasil

Mayara Soares Cunha, Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Artigo a ser submetido ao **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**

Fator de impacto: 1.931 Qualis Medicina I: B1

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA
SEM FERRÃO (*Melipona fasciculata* Smith) DO MARANHÃO, BRASIL**

Mayara Soares Cunha¹, Maria Nilce de Sousa Ribeiro^{1,*}

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Maranhão, Campus Bacanga, 65085-580, São Luís-MA, Brasil.

* Autor a quem correspondência deve ser endereçada; e-mail: mnribeiro@ufma.br;
Tel.: +55-98- 32728592

ABSTRACT: “Cytotoxic and antioxidant activity of the stingless bee geopropolis (*Melipona fasciculata* Smith) of Maranhao, Brazil.” *Melipona fasciculata* produces geopropolis by collecting resinous material of plants, mixed with wax and salivary secretions and also adds ground, used by bees to protect, seal the hives. This research aimed to evaluate potential antioxidant and cytotoxic in tumor cells of Ehrlich extract and geopropolis fractions of *Melipona fasciculata* relating their bioactivity with the predominant chemical composition. Were carried out tests to determine the content of phenolic compounds through the Folin-Ciocalteu, antioxidant in vitro free radical activity DPPH and FRAP, cytotoxicity on Ehrlich tumor cells and chemical composition through the analysis of chromatography high performance liquid coupled to mass spectrometer. The results showed that the geopropolis extract from *M. fasciculata* has a high content of phenolic compounds with strong antioxidant activity, as well as its fractions ethyl acetate (FA) and hydromethanol fraction (FM). Both the extract as the two most polar fractions (FM and FA) showed the best cytotoxicity to tumor cells and chemical composition predominantly derived from hydrolysable tannins of gallic acid and ellagic acid.

Keywords: Stingless bee. Geopropolis. Tannins. Tumor Ehrlich.

INTRODUÇÃO

Os meliponíneos também conhecidos como abelhas sem ferrão compreendem um diverso e abundante grupo de abelhas sociais, que habitam nas regiões tropicais do mundo e vivem em colônias de centenas a milhares de abelhas, dependendo da espécie. A espécie *Melipona fasciculata* Smith, vulgarmente conhecida como tiúba, é uma abelha sem ferrão produtora de mel, cera, acumula polén além de produzir geoprópolis. Esta última é produzida através da coleta de material resinoso de plantas, misturado com cera e secreções salivares da abelha e ainda com terra ou barro, com finalidade de proteger, selar as colmeias e evitar entrada excessiva de ar bem como assepsia da mesma (KERR, 1987; DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

Estudos têm relatado diversas propriedades biológicas de produtos de abelha, principalmente da própolis, com excelentes potenciais antioxidantes e antitumorais (SFORCIN; BANKOVA, 2011; PREMRATANACHAI; CHANCHAO, 2014; DUTRA et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; SILVA et al., 2013; BATISTA et al., 2016), fato importante, pois de acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer tem se tornado a segunda principal causa de morte em todo o mundo estando o câncer de mama entre os tipos mais frequentes e as terapias convencionais normalmente apresentam muitos efeitos colaterais, além do custo elevado e, por vezes são ineficientes na erradicação total de tumores (OMS, 2012; INCA, 2016).

Assim, na busca por novas alternativas, estudos vêm sendo desenvolvidos com produtos naturais, principalmente aqueles com propriedades antioxidantes, como compostos fenólicos, pois estes já mostraram efeitos anticarcinogênicos e antitumogênicos através da inibição de proliferação celular *in vitro* (KIM et al., 2010; MALTA et al., 2013).

Além do mais, substâncias antioxidantes quando presentes na dieta em quantidades significativas contribuem para a prevenção de doenças graves e crônicas, como alguns tipos de cânceres, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias associadas à formação de radicais livres. Por isso, o desenvolvimento de novos fármacos com ação antioxidante tem sido um importante objeto de estudo (TEERASRIPREECHA et al., 2012, DALEPRANE; ABDALLA, 2013; DE MELO et al., 2014).

Diante disso, o presente estudo buscou avaliar potencial antioxidante e citotóxico de extratos e frações de geoprópolis de *Melipona fasciculata* e sua composição química.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da geoprópolis. A geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foi coletada das partes internas da colmeia, em meliponário localizado no município de Fernando Falcão (6°08'99.2''S and 44°54'99.4''W), localizado na região do Cerrado no estado do Maranhão em fevereiro de 2012. Geoprópolis *in natura* foi triturada em moinho do tipo faca e o pó (500g) submetido a maceração com etanol 70%, na proporção geoprópolis/solvente 1:5 (p/v) por 48h (CUNHA et al., 2009). A solução extrativa resultante, após a filtração com papel de filtro sob pressão para separação da terra, foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50°C, obtendo-se o extrato hidroetanólico de geoprópolis (EGP).

Partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da geoprópolis. O extrato EGP (20g) foi dissolvido em metanol:água (8:2, v/v) sob agitação mecânica e a solução hidrometanólica foi submetida a partição líquido-líquido utilizando hexano, clorofórmio e acetato de etila. As soluções extrativas obtidas foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a 50°C, obtendo-se a fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC), fração acetato de etila (FA) e fração hidrometanólica (FM).

Atividade citotóxica *in vitro*

Células do Tumor de Ehrlich

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com peso em torno de 25-30 g e idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos sob condições ambientais padronizadas, alimentados com dieta balanceada e água *ad libitum*. A utilização dos animais obedeceu a princípios técnicos e éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo CEP/UEMA nº 010/2007). As células do tumor de Ehrlich, um adenocarcinoma mamário, foram mantidas na forma ascítica por meio de inoculações semanais de aproximadamente 10^6 células por via intraperitoneal em camundongos Swiss. Com

aproximadamente 8 dias de evolução do tumor os animais foram sacrificados e após excisão da parede abdominal, o fluido ascítico foi retirado com auxílio de seringa e agulha estéreis. As células tumorais foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi determinada através do método de exclusão pelo corante azul de tripan. A ascite tumoral foi colhida, centrifugada a 1200rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células tumorais foram então lavadas em solução tamponada de fosfato (PBS), centrifugadas e o sobrenadante descartado novamente, para garantir a total retirada do líquido ascítico que contém diversos fatores de crescimento para tumor. Após as lavagens, as células tumorais foram quantificadas, ajustadas e ressuspensas para 2×10^7 células/mL. Em seguida, foram adicionadas 10 μ L desta suspensão de células tumorais aos poços de placas de 96 poços contendo o extrato hidroetanólico de geoprópolis diluído seriadamente em meio RPMI nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5 μ g/mL. As placas foram incubadas por 24 horas, quando o número total de células tumorais vivas e mortas foi quantificado pelo método de exclusão vital com azul de tripan. O percentual da viabilidade celular dos extratos, sendo os testes realizados em triplicata (n=3), foi obtido pela seguinte fórmula: $\% = (\text{N}^\circ \text{ de células tumorais vivas} \times 100) / \text{N}^\circ \text{ total de células tumorais}$ e obtendo-se a concentração inibitória média de cada extrato (NASCIMENTO et al., 2006).

Cultura de células MCF-7 e RAW 264.7

As células MCF-7 que são células de adenocarcinoma mamário humano e células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 foram suspensas com 200 μ L de meio RPMI com soro fetal bovino a 10% em uma placa de cultura com 96 poços e levada em seguida para estufa de CO₂ por 48 horas. Após esse tempo a placa foi retirada da estufa e 100 μ L de cada poço foi descartado para adição de 100 μ L de meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% e o extrato nas seguintes concentrações: 20mg/mL; 10mg/mL; 5mg/mL; 2,5mg/mL; 1,2mg/mL; 0,6mg/mL; 0,3mg/mL. Como controle foi utilizado 100 μ L de meio sem suplementação com extrato. Posteriormente a placa foi colocada novamente na estufa de CO₂ por 24 horas. Ao término deste tempo se iniciou o teste de citotoxicidade, adicionando 10 μ L de MTT por poço, permanecendo 3 horas no escuro, e após as 3 horas adicionou-se 100 μ L de SDS/HCl por poço e deixou-se “overnight” no escuro. No dia seguinte, foi realizada leitura em leitor de Elisa a 540 nm e calculado o percentual de viabilidade (MOSMANN, 1983).

Determinação do Teor de Fenólicos Totais (TFT). O TFT foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 20%. A mistura reacional foi mantida no escuro durante 2 horas à temperatura ambiente e a absorvância medida a 760 nm em espectrofotômetro UV-vis (Lambda 35, Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA, EUA) (DUTRA et al, 2014). O teor fenólico total foi calculado a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico (1,0-30,0 µg/mL) e expressa como equivalente de miligramas de ácido gálico por grama de extrato de geoprópolis ou fração (mg GAE/g). As análises foram realizadas utilizando três alíquotas de cada amostra, medidas em triplicata, e o valor médio foi calculado para cada amostra.

Atividade antioxidante *in vitro*

Ensaio de sequestro de radicais DPPH

A atividade antioxidante do extrato e suas frações foram avaliadas pelo método fotolorimétrico *in vitro* utilizando o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) segundo Brand-Willians et al. (1995), com modificações. As amostras foram diluídas em diferentes concentrações em metanol P.A (5 a 100µg/mL), em seguida adicionados a solução metabólica de DPPH (40µg/mL). Após 30 min de reação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorvância de cada solução foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer) a 517nm. Padrões de ácido gálico e elágico foram usados como controle positivo, nas mesmas condições dos extratos e das frações. A percentagem de inibição foi obtida com a seguinte equação: atividade antioxidante (%) = $[(A_{DPPH} - A_{amostra}) / A_{DPPH}] \times 100$, onde A_{DPPH} é a absorvância do DPPH (controle negativo) e $A_{amostra}$ é a absorvância do radical na presença dos extratos, das frações ou dos padrões. A atividade antioxidante das amostras foi expressa como CI_{50} (concentração inibitória), que foi definida como a concentração da amostra necessária para causar uma inibição de 50% da concentração inicial de DPPH.

Capacidade redutora de ferro (FRAP - ferric reducing antioxidant power)

Este método foi utilizado para determinar a atividade antioxidante do extrato e suas frações baseando-se na redução do ferro usando o ensaio FRAP, que mede a capacidade das amostras, em meio ácido (pH 3,6), de reduzir o complexo férrico 2,4,6-tris(2-piridil)-s-

triazina (Fe^{3+} - TPTZ) para a forma ferrosa de coloração azul intensa (Fe^{2+}), que absorve a luz em 593 nm. O reagente FRAP foi preparado imediatamente antes da análise através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (20mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 μL de diferentes concentrações do extrato e suas frações (1-100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionada a 300 μL de água destilada e 3,0 mL de reagente de FRAP e as misturas foram incubadas no banho de água a 37°C durante 30 minutos. A absorbância da mistura reacional foi lida a 593 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, PerkinElmer) utilizando a solução de FRAP como branco (DUTRA et al., 2014).

A curva analítica foi construída utilizando-se diferentes concentrações de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0-2000mM) ($R^2 = 0,9987$). Os resultados foram expressos em milimols de equivalente de Fe^{2+} de amostra. O padrão de Trolox foi tratado sob as mesmas condições que as amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise por CLAE/UV-Vis. As análises por CLAE foram realizadas num cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Autosampler (Thermo) (San Jose, CA, EUA), equipado com um injetor com loop de 25 μL , e um detector de UV-Vis. A coluna usada foi C-18 (250 x 4,6mm, 5 μm , Hypersil BDS) fornecido por Thermo Electron Corporation (Waltham, MA), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 3mm, 5 μm , Gemini, Phenomenex). A separação dos compostos dos extratos e frações da geoprópolis foram realizadas à temperatura ambiente com um programa de gradiente de eluição a uma taxa de fluxo de 1,0mL/min. As fases móveis utilizadas foram água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B) com gradiente de 0-1 min, 5% B; 1-60 min, 5-30% B; 60-90 min, 30-100% B. As amostras antes de serem injetadas no CLAE foram diluídas em metanol e água Milli-Q com 0,1% de ácido fórmico e filtradas em filtro de seringa de Nylon (0,22 μm , Allcrom). O volume da amostra injetado foi de 25 μL e detecção foi realizada em 280nm. Todas as análises foram realizadas sob as mesmas condições.

Análise por CL/DAD/ESI-EM. O extrato EGP foi analisado por cromatógrafo líquido (LC-10AD, Shimadzu) equipado com um detector de arranjo de diodos, acoplado a um espectrômetro de massas (Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics) com ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo íon trap. As condições para a diluição de cada amostra

e composição da fase móvel foram as mesmas descritas anteriormente. As condições de ionização foram as seguintes: voltagem de electrospray com fonte de íons a 40V, um potencial de 4,0kV e temperatura a 320°C. Hélio ultrapuro (He) foi usado como gás de colisão e nitrogênio (N₂) como gás de nebulização. A nebulização foi auxiliada por um gás de azoto a uma pressão de 27 psi. A dessolvatação foi facilitada utilizando uma corrente de fluxo de 7,0L/min. As análises foram realizadas utilizando fuel scan, em modo de ionização negativa e digitalização de dados MS² dependente de *m/z* 100 a 1000. As identificações foram obtidas com base na massa do íon molecular, na fragmentação do íon molecular e comparação com dados da literatura.

Análise estatística. Todas as análises biológicas foram realizadas em triplicata. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e, em seguida, analisados pelo programa GraphPad Prism (version 5.0). Os dados de teor de fenólicos totais e concentração inibitória (CI₅₀) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para as análises antitumorais utilizou a Análise de variância (ANOVA) e teste t-students, sendo o nível de significância, considerado quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade frente às células do tumor de Ehrlich mostrou que o extrato EGP foi citotóxico em todas as concentrações, não apresentando diferença significativa ($p < 0,001$) (Figura 1) e as frações FM e FA foram as que apresentaram melhor atividade citotóxica, sendo a fração FM a mais ativa e a fração FH a que não apresentou qualquer toxicidade para essas células (Figura 1). A citotoxicidade para células MCF-7 também foi observada nas maiores concentrações do extrato EGP, havendo morte total das células na maior concentração (500µg/mL), as concentrações 250, 125 e 62µg/mL conseguiram diminuir a viabilidade para próximo de 50% e a concentração de 31 µg/mL diminuiu a viabilidade para 89%. Já para células RAW 264.7 o EGP, foi tóxico nas quatro maiores concentrações, com ausência de citotoxicidade a partir da dose 31 µg/mL.

Atividade antioxidante e teor fenólico total

Os resultados da atividade antioxidante e dos teores de compostos fenólicos de EGP e suas frações estão demonstradas na Tabela 1. O extrato EGP apresentou CI_{50} de $5,53\mu\text{g/mL}$, mostrando-se ativo quando comparado com os padrões, o que é justificável pela alta concentração de fenois totais. Dentre as frações, a fração acetato de etila (FA) foi a mais ativa inibindo 50% da concentração inicial de DPPH em concentração inferior a $4\mu\text{g/mL}$ (CI_{50} $3,64\mu\text{g/mL}$) e também a que apresentou maior teor de polifenóis totais ($598,3\text{ mgGAE/g}$). A fração hexânica não demonstrou atividade antioxidante e apresentou os menores teores de fenólicos totais.

No ensaio FRAP, FA, EGP e FM apresentaram as melhores capacidades de redução férrica ($20,01$, $16,03$ e $12,07\text{ mmol de Fe}^{2+}/\text{g}$, respectivamente), com potencial antioxidante superior ao Trolox. A FH não demonstrou nenhuma atividade antioxidante em qualquer dos ensaios antioxidantes (Tabela 2).

Composição química

Os dados obtidos por CLAE-UV-Vis e CL-ESI-EM-EM permitiram a identificação de 10 constituintes da classe dos taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) como sendo hexahidroxi-difênico(HHDP)-glicose (1), galoil-glicose (2), digaloil-glicose (3), Di-HHDP-glicose (4), galoil-HHDP-glicose (5), trigaloil-glicose (6), digaloil-HHDP-glicose (7), di-HHDP-galoil-glicose (8), trigaloil-HHDP-glicose (9) e derivado do ácido elágico (10), conforme Figura 3 e 4.

Na Tabela 3 estão listados os dados de tempos de retenção (TR), íon molecular ($[M-H]^-$) e padrões de fragmentações EM/EM dos 10 picos de fragmentações do EGP. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com dados publicados na literatura.

A substância **1** com íon molecular m/z 481 $[M-H]^-$ e íon fragmento m/z 301 (ácido elágico), após perder uma unidade de glicose, foi tentativamente identificado como HHDP-glicose (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2010; DUTRA et al., 2014)

A substância **2** apresentou íon molecular m/z 483 $[M-H]^-$ - produzindo íons fragmentos de m/z 331 após a perda de galoil $[M-H-152]$ e m/z 169 $[M-H-162]$ pela perda de glicose, tentativamente identificada como digaloil-glicose (MEYER et al., 2006; SANDHU et al., 2010).

A substância **3**, tentativamente identificado como trigaloil-glicose, exibiu ion pai m/z 635[M-H]⁻ com íons fragmentos de m/z 483 [MH-152] referente a perda de galoil, m/z 465 [M-H-18] após perda de água e m/z 421 [MH-44] e m/z 313 [M-H-152], referentes a descarboxilação do ácido gálico e perda de outro grupo galoil, seguida da fragmentação do anel cruzado de glicose (m/z 301) (DUTRA et al., 2014).

A substância **4** com íon molecular m/z 783[M-H]⁻, apresentou os íons fragmentos m/z 764 (após perder uma molécula de água) e m/z 481(menos um HHDP) e o m/z 301 (HHDP-glicose), correspondendo segundo a literatura a pedunculagina (di-HHDP-glicose) (FERNANDES et al., 2010; KOSINSKA et al., 2013).

A substância **5** foi tentativamente identificada como galoil-HHDP-glicose (corilagina). A fragmentação do íon molecular m/z 633 [M-H]⁻, produziu os íons fragmentos m/z 481 (HHDP-glicose) após perder um grupo galoil e íon m/z 301, que corresponde a uma unidade de HHDP após o processo de lactonização para o ácido elágico (KOSINSKA et al., 2013 ; DUTRA et al., 2014).

A substância **6** com íon molecular m/z 635[M-H]⁻, seguido dos íons fragmentos m/z 483, 465 e 313, após perder sucessivamente grupos galoil e m/z 301 (ácido elágico), foi tentativamente identificado como trigaloil-glicose (SANDHU; GU, 2010).

A substância **7** com m/z 785[M-H]⁻, foi identificado tentativamente como digaloil-HHDP-glicose por apresentar os íons m/z 633 (menos um grupo galoil), m/z 483 (menos um unidade de HHDP) e m/z 313 após perder uma unidade de HHDP, um grupo galoil e água, respectivamente (SILVA et al., 2014).

A substância **8** com íon molecular m/z 935 [M-H]⁻ seguido dos fragmentos m/z 633 (galoil-HHDP-glicose), m/z 481(HHDP-glicose) e o íon correspondente ao ácido elágico (m/z 301), foi identificado como di-HHDP-galoil-glicose (KOSINSKA et al., 2013; ZHU et al., 2015).

A substância **9** foi tentativamente identificado como Trigaloil-HHDP-glicose por apresentar íon molecular m/z 937 [M-H]⁻, seguido dos íons m/z 785 e 767 (após perder um grupo galoil e água, respectivamente), além dos íons fragmentos m/z 635 (menos uma grupo HHDP), m/z 465 (menos um grupo HHDP e ácido gálico), além do íon m/z 301, que corresponde a uma unidade de HHDP após o processo de lactonização para a ácido elágico m/z 301 (DUTRA et al., 2014).

A substância **10** apresentou íon molecular m/z 602 $[M-H]^-$ e íon fragmento característico do ácido elágico (m/z 301 $[M-H]^-$) levando a sugerir que se trata de um derivado do ácido elágico, ou até mesmo um dímero.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Própolis e geoprópolis são produtos de abelhas que apresentam uma variedade de atividades biológicas já estabelecidas, como antimicrobiana (LIBÉRIO et al., 2011; ARAUJO et al., 2015), antioxidante (DUTRA et al., 2014; BATISTA et al., 2016), anti-inflamatória (FRANCHIN et al., 2012) e antitumoral (DA CUNHA et al., 2013, ARAUJO et al., 2015), sendo esta última amplamente estudada nos últimos anos. No entanto, a maioria dos estudos é voltada para produtos de abelhas com ferrão como *Apis mellifera* o que vem valorizando seus produtos no mercado atual, enquanto que, a falta de mais estudos e de legislação brasileira para produtos de abelhas sem ferrão, em parte, tem dificultado sua inserção neste mercado. Dessa forma, o presente estudo mostrou alto potencial citotóxico para células tumorais e forte ação antioxidante de extrato e frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata* da região do Cerrado maranhense.

A avaliação da citotoxicidade revelou que o extrato de geoprópolis (EGP) e suas frações FA e FM foram citotóxicos para as células tumorais de Ehrlich, causando a morte de mais de 90% das células tumorais nas duas maiores concentrações. Além disso, foi citotóxico para células tumorais MCF-7 e células RAW nas maiores concentrações, com ausência de toxicidade para os macrófagos a partir da concentração de 31 $\mu\text{g/mL}$, concentração esta que apresentou citotoxicidade contra as células MCF-7.

Estudos demonstraram que extratos de própolis vermelha brasileira (KAMIYA et al., 2012), própolis chinesa (XUAN et al., 2014) e própolis turquesa (VATANSEVER et al., 2010) reduziram significativamente a viabilidade das células MCF-7 através da indução de apoptose, disfunção mitocondrial, atividade de caspase-3 e fragmentação do DNA.

O EGP rico em compostos fenólicos com 523,8mg GAE/g no extrato, demonstrou ser citotóxico para as linhagens de células tumorais testadas, tendo suas frações mais ativas aquelas com as maiores concentrações desses metabólitos (FA 598,38mg GAE/g e FM 478,2 mg GAE/g). Além disso, apresentou atividade antioxidante, causando inibição de 50% da

concentração inicial de DPPH com concentrações inferiores a 5µg/mL, concentração muito próxima da concentração do controle positivo (Trolox), além de uma elevada capacidade redutora do ferro, confirmando ainda mais seu potencial antioxidante. As frações FM e FA também apresentaram as menores CI₅₀.

Os compostos fenólicos são citados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes em própolis brasileiras (DA SILVA et al., 2006; CABRAL et al., 2009; DUTRA et al., 2014). Batista et al. (2016) demonstraram a relação entre atividade antioxidante e presença de compostos fenólicos totais em extratos hidroalcoólicos de geoprópolis de *M. fasciculata* do estado do Maranhão, comprovando que os extratos com maiores concentrações de compostos fenólicos apresentaram melhor atividade antioxidante, o que também foi comprovado neste estudo.

Compostos fenólicos são metabólitos secundários, dentre os quais se destacam ácidos fenólicos, flavonoides e taninos como os mais comuns antioxidantes de fonte natural (DO et al., 2013). Pesquisas com extratos fenólicos têm crescido, principalmente devido ao aumento da sua demanda mundial e à sua aplicação na indústria como agentes antioxidantes (MELO et al., 2011). Além disso, estudos relatam largamente suas propriedades antioxidantes e sua relação com os seus efeitos anticarcinogênicos e antitumogênicos através da inibição de proliferação celular *in vitro*, além da sua capacidade anti-inflamatória e inibidora da angiogênese (MALTA et al., 2013; APOSTOLOU et al., 2013; KIM et al., 2014).

A atividade antioxidante está relacionada à atividade antitumoral e quimiopreventiva, pois o estresse oxidativo, ou seja, a produção de radicais livres pode causar dano ao DNA provocando, assim, mutações que podem ser permanentes e, muitas vezes, levar à malignidade (VECHIA et al., 2009; CAO et al., 2013). Os possíveis mecanismos de inibição da carcinogênese por compostos fenólicos estão relacionados com o aumento da expressão de superóxido dismutase, inibição da cicloxigenase e lipoxigenase (SAKATA et al., 2003; APOSTOLOU et al., 2013), indução de apoptose e repressão do ciclo celular, como demonstrado em células carcinogênicas humanas *in vitro* (JAGATHEESH et al., 2010; WATANABE et al., 2011; KIM et al., 2014).

Policarpo et al. (2004) observaram que o aumento de superóxido dismutase permite diminuição do ânion superóxido e aumento do nível de peróxido de hidrogênio. Esta relação tem sido estudada e correlacionada com a malignidade do câncer de mama, e a diminuição deste radical está associada com a reversão da malignidade da linhagem MCF-7.

O perfil cromatográfico do extrato EGP obtido por CL-ESI-EM-EM comprovou a predominância de compostos fenólicos do tipo galotaninos e elagitaninos. A presença de elagitaninos é confirmada pela detecção do íon m/z 301 que indica a lactonização espontânea do HHDP, formando o ácido elágico, enquanto a lactonização parcial do HHDP forma o íon m/z 319, que sofre descarboxilação e forma o íon m/z 275 (TAN et al., 2010; DUTRA et al., 2014). Taninos hidrolisáveis foram identificados por Dutra et al (2014) e Batista et al. (2016) em amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* da mesma região, o que sugere a fidelidade da abelha em visitar as mesmas fontes vegetais.

Taninos hidrolisáveis que são derivados do ácido gálico apresentam atividades terapêuticas incluindo propriedades antioxidantes, antimicrobiana, anti-viral além de anticarcinogênica (SEERAM et al., 2005; BUZZINI et al., 2008; OKUDA&ITO, 2011). Essa classe de compostos possui maior atividade citotóxica contra carcinomas de células escamosas orais humanas e linhagens de células tumorais de glândulas salivares que fibroblastos gengivais humanos normais enquanto que o ácido gálico, uma unidade monomérica dos taninos, possui citotoxicidade seletiva muito mais fraca. A atividade citotóxica dos compostos dímeros é geralmente superior a dos compostos monoméricos, sendo que os oligômeros de elagitaninos apresentam a maior atividade citotóxica do que as do ácido gálico e do galato de epigallocatequina, possivelmente explicada por sua capacidade indutora de apoptose (SAKAGAMI et al., 2000; SEERAM et al., 2005).

Os elagitaninos assim como seu produto de hidrólise, ácido elágico, induziram a apoptose em células tumorais de cólon humano Caco-2 através da via mitocondrial, sem indução de apoptose em células do cólon normal (CCD-112CoN), sendo que esse efeito anticarcinogênico dos elagitaninos é atribuído principalmente ao seu produto de hidrólise, ácido elágico (LARROSA et al., 2006). Wang et al. (2000) demonstraram cuphiin D1, tanino hidrolisável macrocíclico, isolado de *Cuphea hyssopifolia*, apresentou atividade antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*, induzindo apoptose em células de leucemia promielocítica humana (HL-60) causando a fragmentação do DNA e inibição da expressão de Bcl-2.

Assim, conclui-se que a geoprópolis de Fernando Falcão, Maranhão, Brasil, apresenta composição química rica em compostos fenólicos, principalmente taninos hidrolisáveis com potencial antioxidante e citotóxico para células tumorais, sendo suas frações FM e FA as mais ativas. Portanto, os dados sugerem que os taninos hidrolisáveis são os principais responsáveis por essas atividades e geram perspectivas para a continuidade das pesquisas com essa

geoprópolis e contribuem para que esta futuramente possa servir como matéria-prima para medicamentos que auxiliem o tratamento antitumoral.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado de Mayara Soares Cunha. Aos meliponicultores pelas amostras das geoprópolis. Ao CNPq e FAPEMA pelo suporte financeiro.

REFERENCIAS

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, M.A.; HORNEDO-ORTEGA, R.; CERESO, A.B.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Effects of the strawberry (*Fragaria ananassa*) purée elaboration process on non-anthocyanin phenolic composition and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.164, p.104-112, 2014.

APOSTOLOU, A.; STAGOS, D.; GALITSIOU, E.; SPYROU, A.; HAROUTOUNIAN, S.; PORTESIS, N.; TRIZOGLOU, I.; HAYES, A.W.; TSATSAKIS, A.M.; KOURETAS, D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p.60–68, 2013.

ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO, M.C.; CONTI, B.J.; FERNANDES JR, A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, p.12-20, 2015.

BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B.; DUTRA, R.P.; CUNHA, M.S.; AMARAL, F.M.M.; TORRES, L.M.B.; RIBEIRO, M.N.S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v.46, n.3,p. 1-27, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERST, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebens Wissen Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.

BUZZINI, P.; ARAPITSAS, P.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; TURCHETTI, B.; PINELLI, P.; IERI, F.; ROMANI, A. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, n.12, p.1179-1187, 2008.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, p. 1523-1527, 2009.

CAO, D.; LI, H.; YI, J.; ZHANG, J.; CHE, H.; CAO, J.; YANG, L.; ZHU, C.; JIANG, W. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. **PLoS One**, v.6, p. 21071, 2011.

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

DA CUNHA, M.G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L.C.C.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; ROSALEN, L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.13, n.23, 2013.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-8, 2013.

DA SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.99, p.431–435. 2006.

DE-MELO, A.A.M.; MATSUDA, A.H.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.

DO, Q.D.; ANGKAWIJAYA, A.E.; TRAN-NGUYEN, P.L.; HUYNH, L.H.; SOETAREDJO, F.E.; ISMADJI, S.; JU. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.22, p.296-302, 2013.

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

FERNANDES, A.; SOUSA, A.; MATEUS, N. CABRAL, M.; FREITA, V. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. **Food Chemistry**, v.125, p. 1398-1405, 2011.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v.139, p.578-588, 2013.

FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M.G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M.H.; CUNHA, T.M.; KOO, H.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1b and TNF-a. **Journal of Ethnopharmacology**. v.143, p.709–715, 2012.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm, **Nature Reviews Cancer**, v.13, p.714–726, 2013.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. [Acessado em 16 de agosto de 2016]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1.

JAGATHEESH, K.; ARUMUGAM, V.; ELANGO VAN, N.; PAVANKUMAR, P. Evaluation of the anti-tumor and antioxidant activity of *Amorphophallus paeonifolius* on DMBA induced mammary carcinoma. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.2, 2010.

KAMIYA, T.; NISHIHARA, H.; HARA, H.; ADACHI, T. Ethanol extract of brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n.44, p.11065-11070, 2012.

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

KIM, H.; MOON, J.; KIM, H.; LEE, D.; CHO, M.; CHO, H.; KIM, Y.S.; MOSADDIK, A.; CHO, S.K. Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mngifera indica* L.) flesh and peel. **Food Chemistry**, v.121, p.429-436, 2010.

KIM, H.; QUON, M.J.; KIM, J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v.2, p.187–195, 2014.

KOSINSKA, A.; DIERING, S.; PRIM, D.; HERITIER, J.; ANDLAUER, W. Phenolic compounds profile of strawberry fruits of *Charlotte* cultivar. **Journal of Berry Research**, v.3, p.15–23, 2013.

LARROSA, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, n.9, p.611–625, 2006.

LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAUJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v.11, p.108, 2011.

MALTA, L.G.; TESSARO, E.P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G.M.; LIU, R.H. Assessment of antioxidante and antiproliferative activites and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v.53, p.417-425, 2013.

MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciencia Rural**, v.41, p.1088-1093, 2011.

MEYERS, K. J.; SWIECKI, T. J.; MITCHELL, A. E. Understanding the native Californian diet: Identification of condensed and hydrolyzable tannins in tanoak acorns (*Lithocarpus densiflorus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7686-7691, 2006.

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.

NASCIMENTO, F.R.F.; CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AZEVEDO, A.P.S.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Science**. v.78, p.2650-2653. 2006.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants—Hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, v.16, p.2191-2217, 2011.

OMS, **Organização Mundial da Saúde**. Câncer 2012. Disponível em: http://http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em: 10 de janeiro de 2017.

POLICARPO, L.; MOLINARI, B.; LARCHER, F.; BLANCO, P.; PODHAJECER, O.L.; COSTA, C.S.; ROJAS, P.; DURAN, H. Imbalance of antioxidante enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. **Molecular Carcinogenesis**, v.39, p.103-113, 2004.

PREMRATANACHAI, P.; CHANCHAO, C. Review of the anticancer activities of bee products. **Asian Pac J Trop Biomed**, v.4, p.337-344, 2014.

SAKAGAMI, H.; JIANG, Y.; KUSAMA, K.; ATSUMI, T.; UEHA, T.; TOGUCHI, M.; IWAKURA, I., SATOH, K.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines-A possible mechanism. **Phytomedicine**, v.7, n.1, p.39-47, 2000.

SAKATA, K.; HIROSE, Y.; QIAO, Z.; TANAKA, T.; MORI, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters**, v.199, p. 139-145, 2003.

SANDHU, A. K.; GU, L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (muscadine grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.58, p.4681-4692, 2010.

SEERAMA, N.P.; ADAMSA, L.S.; HENNINGA, S.M.; NIUA, Y.; ZHANGB, Y.; NAIRB, M.G.; HEBERA, D. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, n.6, p.360–367, 2005.

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

SILVA, N. A. D.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z.; de ROSSO, V. V. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.5072-5084, 2014.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, p.253-260, 2011.

TAN, H.P.; LING, S.K.; CHUAH, C.H. Characterisation of Galloylated Cyanogenic Glucosides and Hydrolysable Tannins from Leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. **Phytochemical Analysis**. p.1312, 2011.

TEERASRIPREECHA, D.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANCHAO, C. *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 30, n. 1, p. 12-27, 2012.

VATANSEVER, H.S.; SORKUN, K.; GURHAM, S.I.D.; OZDAL-KURT, F.; TURKOZ, E.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. **Acta Histochemica**, v.112, n.6, p.546-556, 2010.

VECHIA, L.D.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1245-1252, 2009.

WANG, C.; CHEN, L.; YANG, L. Cuphiin D1, the macrocyclic hydrolyzable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line. **Cancer Letters**, v.149, p.77-83, 2000.

WATANABE, M.A.E.; AMARANTE, M.K.; CONTI, B.J.; SFORCIN, J.M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.63, p.1378-1386, 2011.

XUAN, H.; LI, Z.; YAN, H.; SANG, Q.; WANG, K.; HE, Q.; WANG, Y.; HU, F. Antitumor activity of chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-11, 2014.

ZHU, M.; DONG, X.; GUO, M. Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. **Molecules**, v.20, p.22463-22475, 2015.

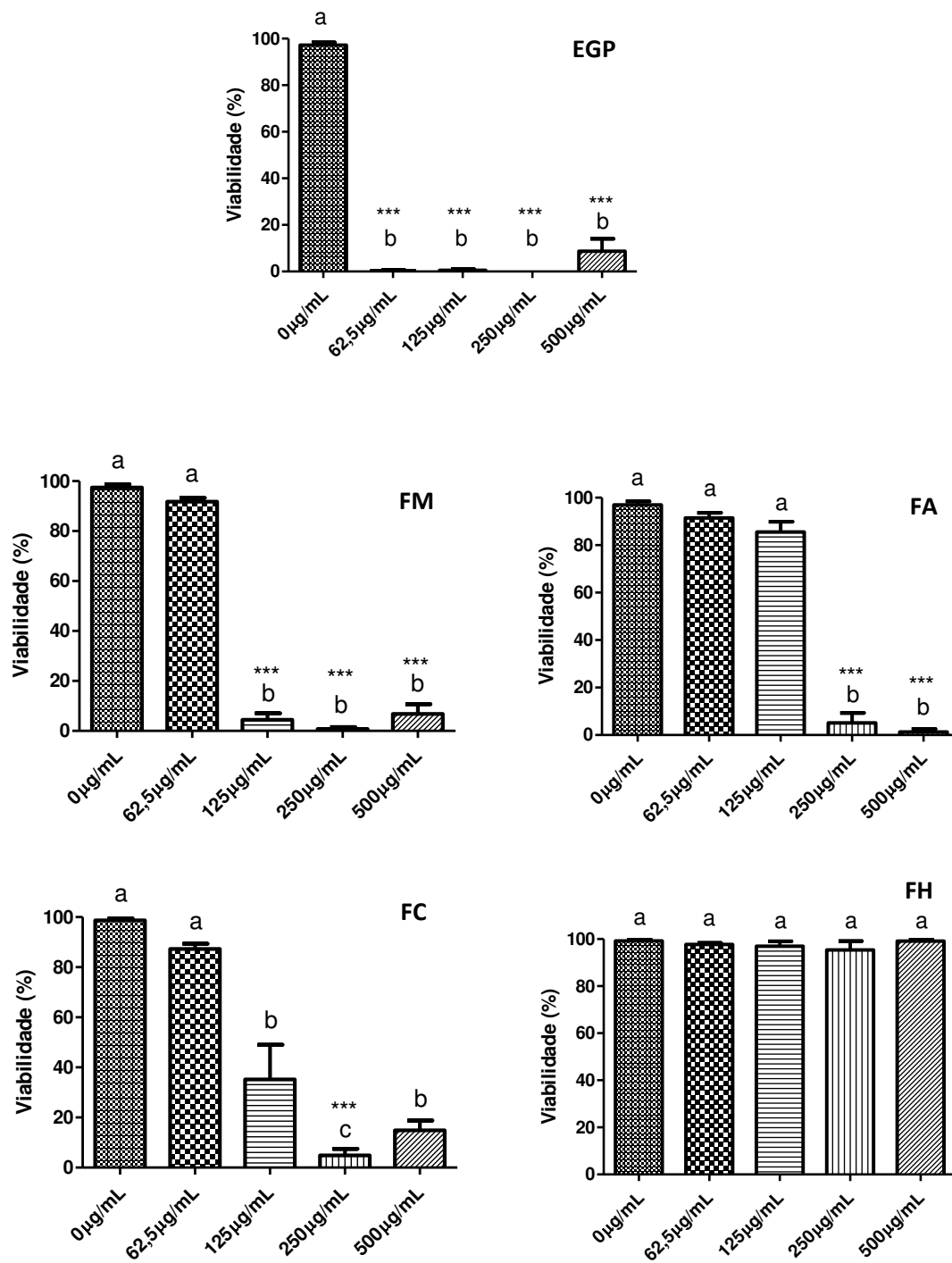


Figura 1. Viabilidade das células tumorais da forma ascítica do tumor experimental de Ehrlich frente às concentrações de 0 µg/mL; 62,5µg/mL; 125µg/mL; 250µg/mL e 500 µg/mL do extrato (EGP) e suas frações (Fração hidrometanólica- FM, Fração Acetato de Etila - FA, Fração Clorofórmica – FC e Fração Hexânica - FH) da geoprópolis de *Melipona fasciculata*. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$) ANOVA (One way/Newman-Keuls).

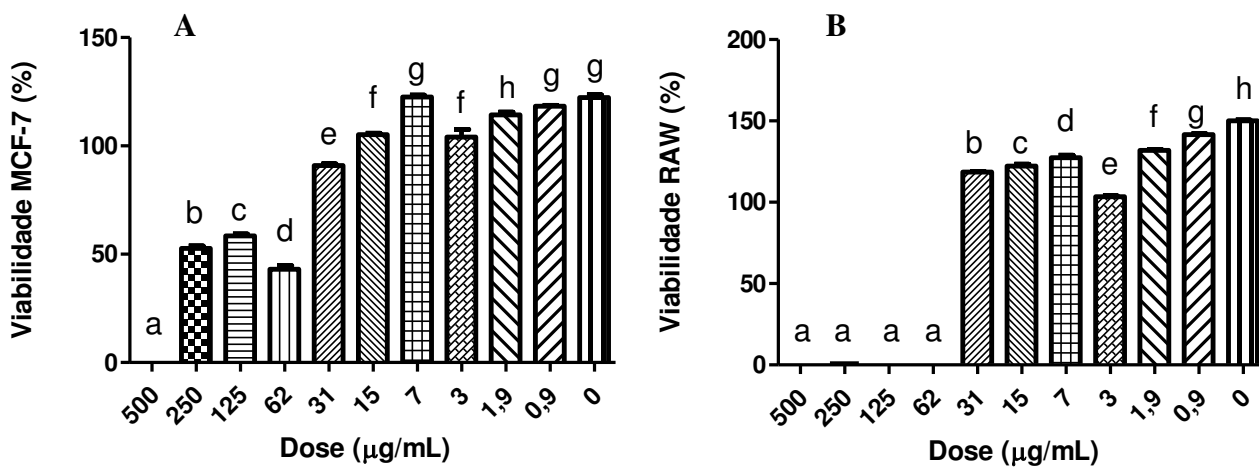


Figura 2. Viabilidade das células MCF-7 (A) e RAW (B) frente às concentrações de 0,9 µg/mL; 1,9 µg/mL, 3 µg/mL, 7 µg/mL, 15 µg/mL, 31 µg/mL, 62,5µg/mL; 125µg/mL; 250µg/mL e 500 µg/mL do extrato de geoprópolis de *Melipona fasciculata* (EGP). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), ANOVA (One way/Newman-Keuls).

Tabela 1. Concentração de fenóis totais e atividade antioxidante do extrato e frações da geopropolis de *Melipona fasciculata*

Amostra	TFT (mg GAE/g)	DPPH	FRAP
		(CI ₅₀ µg/mL)	(FeSO ₄ /g)
EGP	523,8 ± 0,04 ^b	4,53 ± 0,16 ^b	16.03 ± 0.11 ^a
FM	478,2 ± 0,08 ^c	8,33 ± 0,13 ^c	14.07 ± 0.07 ^b
FA	598,3 ± 0,07 ^d	3,64 ± 0,09 ^b	20.01 ± 0.09 ^c
FC	160,6 ± 0,01 ^e	19,86 ± 0,04 ^d	7.01 ± 0.15 ^d
FH	54,9 ± 0,02 ^f	Nd	Nd
Trolox	-	5.11 ± 0.04 ^g	9.09 ± 0.10 ^g

^a Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 3). Diferentes letras na mesma coluna indicam uma diferença significativa (teste de Tukey, p <0,05). TFT, teor fenólico total; EGP, extrato hidroalcoólico de geopropolis; FM, fração hidrometanólica; FA, fração acetato de etila; FC, fração clorofórmica; FH, fração hexânica; Nd, não detectado. DPPH, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; FRAP (ferric reducing antioxidant power), poder antioxidante reduzido férrico.

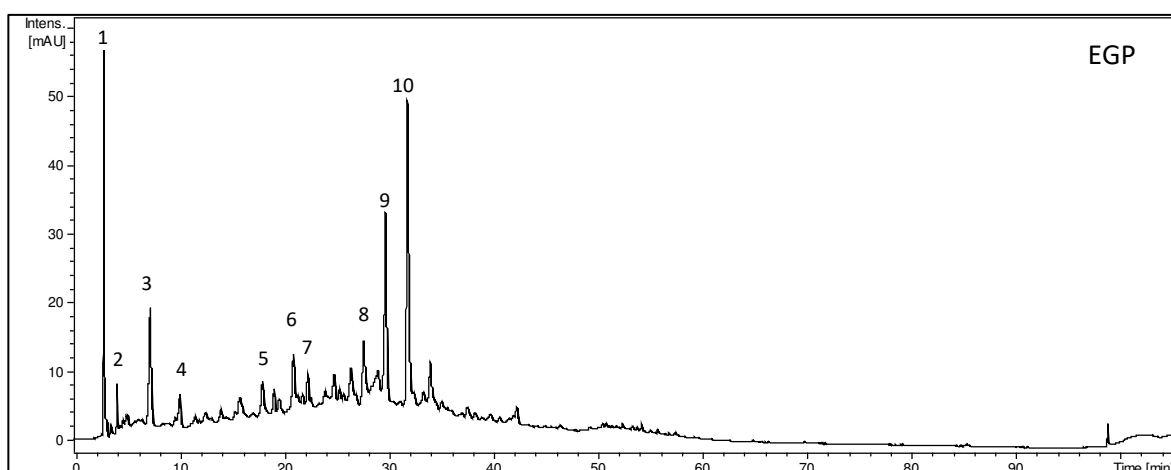
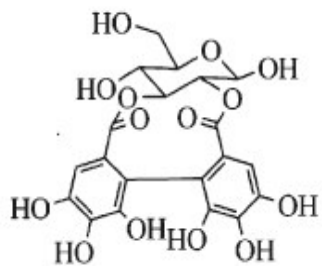


Figura 3. Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico da geoprópolis (EGP) de *Melipona fasciculata* Smith por CLAE-UV (280nm).

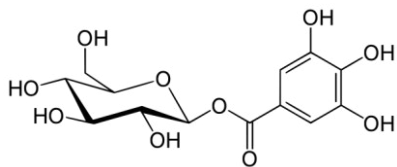
Tabela 2. Compostos fenólicos tentativamente identificados no extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* por CL-DAD-ESI-EM/EM

Composto	MM	[M-H] ⁻ m/z	Principais íons EM ² (m/z)	Compostos identificados
1	482	481	301, 275, 169	HHDP-glicose
2	332	331	271, 193, 169	Galoil-glicose
3	484	483	331, 313, 169	Digaloil-glicose
4	784	783	481, 301, 275	Di-HHDP-glicose
5	634	633	481, 301, 275	Galoil-HHDP-glicose
6	636	635	483, 465, 421, 313	Trigaloil-glicose
7	786	785	765, 633, 483, 301	Digaloil-HHDP-glicose
8	936	935	933 784 741 633 451 301 275	Di-HHDP-galoil-glicose
9	938	937	785 767 635 465 301 275	Trigaloil-HHDP-glicose
10	603	602	301	Derivado do ácido elágico

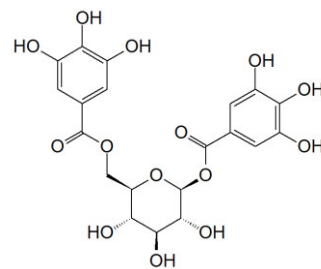
^aAbreviação usada na tabela: MM, massa molecular; [M-H]⁻, íon molecular. HHDP, hexahidroxidifênico



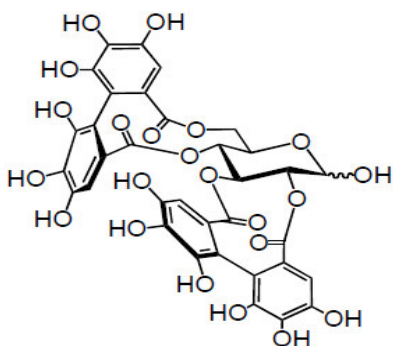
(1)



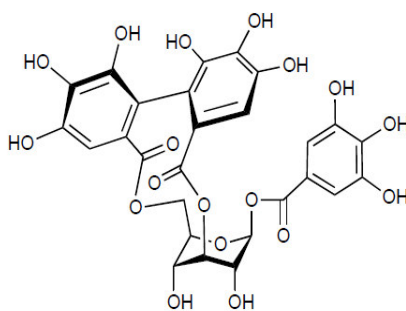
(2)



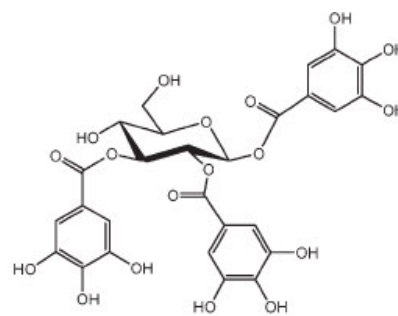
(3)



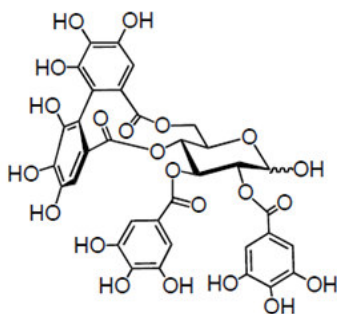
(4)



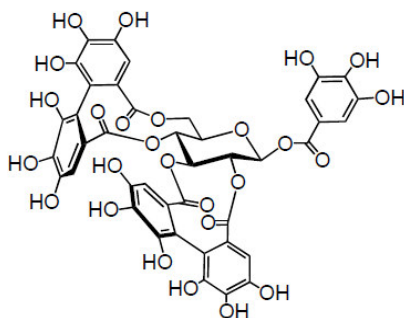
(5)



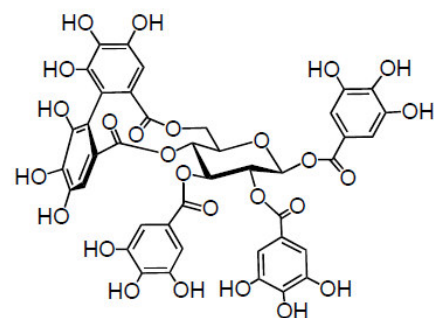
(6)



(7)



(8)



(9)

Figura 4. Estruturas químicas dos taninos hidrolisáveis identificados no extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (EGP)

4.2 CAPITULO 2

Antitumor activity and chemical composition of geopropolis from

***Melipona fasciculata* Smith**

**Mayara Soares Cunha[‡], Anne Karine Martins Assunção[†], Eder Magalhães Silva Fialho[†];
Ludmilla Santos Silva de Mesquita[‡]; José Wilson Carvalho de Mesquita[‡]; Marisa
Cristina Aranha Batista[‡], Richard Pereira Dutra[‡], Flávia Raquel Fernandes do
Nascimento[†], Maria Nilce de Sousa Ribeiro^{*‡}**

[‡]Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses
1966, 65085-580 São Luís, Maranhão , Brazil

[†]Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses
1966, 65085-580 São Luís, Maranhão , Brazil

Corresponding Author

*E-mail: mnribeiro@ufma.br (M.N. Sousa Ribeiro). Phone: (+55) 98 32728592.

Artigo submetido ao **Journal of Agricultural and Food Chemistry**
(ISSN: 0021-8561)

Fator de impacto: 2.816 Qualis Medicina I: B1

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Antitumor activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID	jf-2017-01156s
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	14-Mar-2017
Complete List of Authors:	Ribeiro, Maria Nilce; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Farmacognosia Cunha, Mayara; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Farmacognosia Assunção, Anne Karine; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Imunofisiologia Fialho, Eder ; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Imunofisiologia Batista, Marisa; Universidade Federal do Maranhao de Mesquita, Ludmilla ; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Farmacognosia de Mesquita, José Wilson ; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Farmacognosia Dutra, Richard ; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Farmacognosia Nascimento, Flavia; Universidade Federal do Maranhao, Laboratório de Imunofisiologia

SCHOLARONE™
Manuscripts

ABSTRACT: *Melipona fasciculata* Smith, stingless bee (Apidae: Meliponini), produces honey, wax and geopropolis, which is a mixture of resins plant, waxes, salivary secretion and soil. This paper describes the antitumoral activity and chemical composition of geopropolis produced by *M. fasciculata*. The hydroethanolic extract were evaluated for in vitro and in vivo antitumor activity against Ehrlich ascites tumor and was chemically analyzed by HPLC and HPLC-DAD-ESI-MS/MS. The extracts (EG1 to EG6) were cytotoxic to tumor cells. In vivo antitumor tests (most active extract, EG1) inhibited the development of Ehrlich ascites tumor, reducing the number of tumor cells and the ascytes volume and increasing the survival of mice. The prophylactic and therapeutic treatment (EG1) inhibited the development of the solid form of the tumor. Thirteen compounds belonging to the classes of alkaloid and polyprenylated benzophenones and pentacyclic triterpenes derivatives were tentatively identified. These compounds are responsible for the antitumor activity of geopropolis.

Keywords: Stingless bee, *Melipona fasciculata*, Ehrlich tumor, benzophenones, triterpenes, alkaloid.

INTRODUCTION

Tropical stingless bees (Apidae: Meliponini) constitute a diverse group of social insects that produce honey, wax, pollen, propolis and geopropolis historically valued by human beings¹. In Brazil, especially in the North and Northeast regions, there is a predominance of stingless bees of the genus *Melipona* such as *Melipona fasciculata* Smith, popularly known as “tiúba”, bees extensively reared for honey production and commercialization^{2,3}. However, in addition to producing honey, tiúba bees accumulate pollen and produce wax and geopropolis, which consists of resinous material of plant species mixed with wax, salivary secretion and soil, in order to build, maintain, and defend their nests⁴.

Unfortunately, research on geopropolis has not been conducted systematically, so that little information is available. A small number of reports have documented the beneficial effects of stingless bee geopropolis in different contexts, such as antimicrobial⁵, antinociceptive⁶, antiviral⁷, gastroprotective⁸, anti-inflammatory⁹, antioxidant¹⁰ and anti-tumor cell proliferation activities^{11,12}. Studies with geopropolis of *M. fasciculata* have demonstrated a significant antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Candida albicans*, confirming its potential to control or prevent infections in the oral cavity and its high flavonoid content¹³, as well as its action against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains¹¹, and its antioxidant activity with a high total phenolic content and predominance of gallic acid and ellagic acid and hydrolyzable tannins^{14,15}, and its immunomodulatory/inflammatory activity¹⁶. Anticancer studies have revealed a cytotoxic effect of geopropolis on canine osteosarcoma¹⁷ and a cytostatic action on human laryngeal epidermoid carcinoma cells, with biological properties that may be due to triterpenes^{11,18}.

The objective of the present study was to evaluate the chemical composition and antitumor activity of the hydroethanolic extract of geopropolis (EG) from *Melipona fasciculata* Smith against Ehrlich ascites tumor in Swiss albino mice.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Standards. Ethanol, formic acid, hydrochloric acid and anhydrous sodium sulfate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used in the study were of analytical or HPLC grade. Tripan blue Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), solução tamponada de fosfato (PBS) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), meio RPMI (Rousevelt Parked Memorial Institute) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), formol 10%, EDTA solution, hematoxylin-eosin dye.

Geopropolis samples. Geopropolis (G1 a G6) produced by *M. fasciculata* was collected in a randomized and annual way (in October 2006, February 2007, August 2007, October 2008, February 2009, and October 2010) from the internal parts of a beehive located in the municipality of Palmeirândia (2°40'80.3"S e 44°52'66.1"W) in the northeastern region of the state of Maranhao, Brazil.

Preparation of hydroethanolic extracts of geopropolis (EG). The geopropolis samples was separately triturated using a knife mill, and the geopropolis powder (500 g) obtained was extracted by maceration with in 1000 mL of 70% ethanol/water (70:30.v/v) for 48 h. The extracts were filtered through Whatman no. 1 filter paper (Whatman, Durham, UK) in a Buchner funnel and concentrated to a small at 40 °C in a rotary evaporator under vacuum, yielding the hydroethanolic extract of geopropolis. The extracts were coded as EG1, EG2, EG3, EG4, EG5 and EG6.

HPLC/UV–Vis Analysis of geopropolis extracts (EG1 to EG6). HPLC analysis was carried out in a Thermo Finnigan Surveyor Autosampler liquid chromatograph (San Jose, CA, USA) equipped with an injector with a 25 μ L loop and a UV detector. A Hypersil BDS C-18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA), protected by a C-18 precolumn (4 \times 3 mm, 5 μ m, Gemini; Phenomenex), was used. The compounds of the geopropolis extract were separated at room temperature using a gradient elution program at a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phases consisted of Milli-Q water containing 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B). The following linear gradient was applied: 0–1 min, 5% B; 1–10 min, 5–30% B; 10–20 min, 30–70% B; 20–60 min, 70–100% B. The column was reequilibrated for 10 min before the next run. The injection volume into the HPLC system was 25 μ L, and UV–vis detection was performed at 254 nm. Before injection into the HPLC system, each extract was dissolved in the same solvent used for extraction (HPLC grade) to obtain a final concentration of about 5 mg/mL and then filtered through a 0.22 μ m nylon syringe filter obtained from Allcrom (São Paulo, SP, Brazil).

HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of geopropolis bioactives extracts. The most active extracts (EG1, EG2, EG4 and EG6) were analyzed with an HPLC system (LC-10AD, Shimadzu) equipped with a photodiode array detector, which was coupled to an Esquire 3000 Plus ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using electrospray ionization (ESI). The conditions for dilution of the samples and the mobile phase composition were the same as described above. The ionization conditions were adjusted as follows: electrospray voltage of the ion source of 40 V, capillary voltage of 4.0 kV, and capillary temperature of 320 °C. Ultrahigh-purity helium (He) was used as the collision gas and high-purity nitrogen (N₂) as the nebulizing gas. Nebulization was aided with a coaxial nitrogen sheath gas provided at a pressure of 27 psi. Desolvation was facilitated using a counter current

nitrogen flow set at a rate of 7.0 L/min. Analyses were carried out using full-scan mass spectra in the positive ionization mode and data-dependent MS² scans from m/z 100 to 3000. The compounds were identified on the basis of the molecular ion mass, fragmentation, UV–visible spectra according to literature data.

Animals. Male albino Swiss mice, eight to twelve weeks old, weighing 25–30 g have been maintained for many generations in the Animal House of Universidade Federal do Maranhão (São Luís, MA, Brazil) under standard conditions. Animals were age matched, fed sterilized food and acidified water and treated according to UFMA Animal Welfare guidelines. All procedures described were reviewed and approved by the Animal Ethics Committee (Protocol CEP/UEMA n° 010/2007).

Maintenance of Ehrlich's tumor. Ehrlich tumor cells, a mammary adenocarcinoma, were maintained ascitic by means of weekly inoculations of approximately 10⁶ cells intraperitoneally in Swiss mice. With approximately 8 days of tumor evolution the animals were sacrificed and, after excision of the abdominal wall, the ascitic fluid was aspirated with the aid of a sterile syringe and needle. The total number of tumor cells were counted in a Neubauer chamber and viability was determined using vital exclusion by Trypan blue¹⁹.

In vitro antitumor activity. Tumor ascites was collected and centrifuged at 1200 rpm for 10 minutes and the supernatant was discarded. Tumor cells were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged and the supernatant was again discarded in order to guarantee full removal of ascitic fluid, which contains various tumor growth factors. After washing, tumor cells were quantitated, adjusted and resuspended to a concentration of 2x10⁷ cells/mL. Next, 10 µL of this tumor cell suspension was added to the wells of 96-well plates containing the hydroethanolic geopropolis extracts serially diluted in RPMI medium at concentrations of 500, 250, 125, and 62.5 µg/mL. The plates were incubated for 24 hours and

the total number of live and dead tumor cells was counted by the Trypan blue vital exclusion method. Percent cell viability of the extracts was determined using the following formula: % = (N° of live tumor cells x 100)/total N° of tumor cells, and the calculation of the mean inhibitory concentration of each extract. Each test was carried out in triplicate (n=3)¹⁹.

In vivo antitumor activity. Evaluation of the development of Ehrlich ascites tumor after treatment. The animals were divided into four groups (n=10/group), a control group and three experimental groups. The control group received 0.2 mL PBS by the intraperitoneal (ip.) route. The experimental groups received EG1 at the doses of 0.5, 5 and 50 mg/kg ip. and were named EG1A0.5, EG1A5 and EG1A50, respectively, with each group being treated with a single dose.

Forty-eight hours after treatment with EG1 as described above, 10 animals /group were inoculated ip. with 2×10^6 mL Ehrlich tumor cells (ascites tumor). Ten days after the inoculum, five animals per group were exsanguinated and sacrificed for the assessment of tumor development. Ascites was collected and the number and viability of tumor cells it contained were quantitated. The volume and aspect of the ascites (non-hemorrhagic-1, semi-hemorrhagic-2 and hemorrhagic-3) was also determined.²⁰

The five remaining animals were kept alive for survival analysis. Percent increase of life expectancy was calculated according to the following formula, adapted from Plowman et al.²¹:

$$\text{ILS (\%)} = [(\text{treated MST group}/\text{control MST group}) - 1] \times 100.$$

$$\text{MST} = (\text{day of 1}^{\text{st}} \text{ death} + \text{day of last death}) / 2.$$

Where ILS = Increased Life Span and MST = Mean Survival Time

Development of Ehrlich tumor in the solid form. The animals were divided into eight groups (n=6/group). Four groups received prophylactic treatment with PBS or EG1

administered ip. in a single dose 48 hours before inoculation of Ehrlich tumor and the other four received therapeutic treatment with PBS or EG1 administered ip. in a single dose 48 hours after tumor inoculation. The groups were called Control, EG1S 0.5, EG1S5 and EG1S50. Forty-eight hours after EG1 treatment as described above, five animals/group were inoculated into the footpad with 1×10^6 tumor cells.

Tumor development was assessed by measuring paw thickness with a digital pachymeter every two days until the 14th day, when the animals were exsanguinated and sacrificed by cervical dislocation. The paws were amputated for the determination of tumor development, weighed and fixed in 10% formol for 48 hours. Next, the paws were decalcified with 5% EDTA solution and embedded in paraffin. Sections measuring 5 μm in diameter were obtained and stained with hematoxylin-eosin. Slides were analyzed and photographed with a common light microscope at 400X magnification. The following parameters were considered for histological analysis: presence of an infiltrate, tumor cells, mitotic figures, necrosis, and edema, each being scored as 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (intense), and the type of infiltrate was classified^{22,23}.

Statistical Analysis. All biological experiments were carried out in triplicate. Data are reported as mean \pm standard deviation (S.D.) for 5-10 animals/group. The survival curve was determined using the Kaplan–Meier curve and analyzed statistically by the log-rank test.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, hydroethanolic extracts of geopropolis from stingless bees of the Palmeirândia region, Maranhão, Brazil, were obtained during randomized periods of collection in order to determine their predominant chemical composition and their cytotoxic activity in vitro. An extract was then selected for the determination of its in vivo action

against an experimental Ehrlich tumor, a mammary adenocarcinoma of Swiss mice, in the ascitic and solid form, with the prophylactic and therapeutic response of the latter model being observed.

Extraction yields of extractives

The extraction yield of the hydroethanolic extracts of *M. fasciculata* geopropolis extracts EG1, EG2, EG3, EG4, EG5 and EG6 was 8.11%, 5.32%, 3.89%, 5.22%, 6.45% and 5.10%, respectively.

Analyses of the chemical constituents of the bioactive extracts by HPLC-UV-vis and HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

The chromatograms obtained by HPLC/UV-vis (254 nm) revealed that all geopropolis extracts had a similar chemical composition (Figure 1), with substances showing the same retention time despite different collection times. However, on the basis of the in vitro results obtained with tumor cells, the more active extracts (EG1, EG2, EG4 and EG6), which were also the ones with a more identical chemical profile, were submitted to chemical characterization by HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis (Figure 2). Table 1 summarizes the tentatively identified chemical compounds, their retention time (Rt), molecular weight, MS data for protonated molecules $[M+H]^+$, molecular ion and main product ions obtained by HPLC-MS/MS for the 13 fragmentation peaks of extracts. The chemical constituents were identified by comparing their fragments with those described in the literature (Figure 3).

The main classes detected in the extracts were alkaloids, triterpenes and benzophenones, revealing for the first time the presence of classes such as alkaloids and benzophenones in *M. fasciculata* geoprópolis.

Alkaloids. Substance **1**, with molecular ion m/z 318 and fragment ions m/z 274 and 256 corresponding to the loss of C_2H_4O and $C_2H_6O_2$, respectively, referring to trachelanthic or

viridifloric acid residues,²⁴ was tentatively identified as the pyrrolizidine alkaloid dihydroheliospathuline-N-oxide²⁵.

Pyrrolizidine alkaloids such as 1,2-dihydropyrrolizidine and echimidine have been identified in products of bees with stings such as pollen and honey^{26,27}. Echimidine, pyrrolizidine alkaloids have been identified in propolis of the stingless bees *Scaptotrigona postica*⁷. However, this alkaloid were detected for the first time in *M. fasciculata* geopropolis.

This monoester alkaloid class is usually detected in plants of the Asteraceae and Fabaceae families²⁶ which are present in the municipality of Palmeirandia-MA and are visited by bees of the genus *Melipona*^{28,29}.

Triterpenes. Substances **2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 and 12** are pentacyclic triterpenes derived from boswellic acid with an ursane or oleanane skeleton. The fragmentation profile of triterpenes occurred with ions mainly related to the loss of water (-18 Da) and CO (-28 Da), but also involved fragments originating from the loss of the acetyl group (-60 Da). Additionally, ions of B/C-ring retro-Diels-Alder cleavage were observed.^{30,31}

Substance **2** with molecular ion m/z 455 [M+H]⁺ producing fragment ions of m/z 437 [M+H-18]⁺ related to water loss and of m/z 409 [M+H-28]⁺ related to carbonyl loss was tentatively identified as 9,11-dehydro- β -boswellic acid^{31,32}.

Substance **3** had a molecular ion of m/z 437 and fragment ions of m/z 419 [M+H-18]⁺ related to the loss of a water molecule and of m/z 391 [M+H-28]⁺ due to the loss of a carbonyl. However, it also showed a fragment ion of m/z 241 in the mass spectrum, possibly formed by a break of the D ring with a consequent Retro-Diels-Alder reaction that results in the formation of a methide quinone characteristic of this triterpene type known as 15-hydroxytingenone³¹.

The mass spectrum of substance **4** was tentatively identified a pentacyclic triterpene of the oleanane type olean-12-ene-2,3,21,23,28-pentol, exhibited a protonated molecule of m/z 491 producing fragment ions of m/z 473, 455 and 437 obtained by the loss of water molecules³¹.

Substance **5** had a molecular ion of m/z 471 producing fragment ions by the loss of water molecules of m/z 453, m/z 435 and an ion related to the loss of carbonyl of m/z 407 that was tentatively identified as 3,4-di-epigypsogenin³¹. In contrast, substance **9**, speciosaperoxide, with a protonated ion of m/z 531, in addition to showing a fragment ion due to water loss, m/z 513, also showed a fragment ion corresponding to the loss of the acetyl group of m/z 453³¹.

Substance **6** was also tentatively identified as an acid triterpene known as 3 β ,6 β ,7 α -trihydroxyolean-12-em-27-oic acid, showing a protonated molecule of m/z 489 and fragment ions of m/z 471, 453, 435, also due to the loss of water molecules³¹.

Substances **8** and **11** were also identified as boswellic acid derivatives, showing molecular ion m/z 513 and 515, respectively. Compound **8** was identified as 3-acetyl-11-keto- α -boswellic acid and compound **11** as 3-acetyl-11-hydroxy- α -boswellic acid, both presenting fragment ions related to the loss of water $[M+H-18]^+$ and of the acetyl group $[M+H-60]^+$.^{31,32}

Substance **10** was another tentatively identified triterpene with a molecular ion of m/z 439 with fragmentation of m/z 421 and 404 which, according to the literature, is a ketone triterpene known as 12-ursene-2-diketone³¹. Substance **12**, in contrast to the other triterpenes, was suggested to be a euphane-type triterpene with a molecular ion of m/z 441 and fragment ions of m/z 423 $[M+H-18]^+$ and m/z 405 $[M+H-18]^+$ identified as 20,22- epoxyeupha-24-ene-3-one^{31,32}.

The pentacyclic triterpenes with an oleanane and ursane skeleton and the boswellic acids detected in the geopropolis extracts are quite common in the resins of *Boswellia serrata*³⁵ and in species of the genus *Protium*, family Burseraceae³³. Plant species of the family Burseraceae are visited by *M. fasciculata* in the region under study^{28,29}.

Using GC-MS analyses of *M. fasciculata* Smith geopropolis, Araujo et al.¹¹ and Batista et al.¹⁵ demonstrated the presence of triterpenes such as β -amyrin, β -amyrenone, lupeol, cycloursane, and cycloartenol, but the triterpenes **2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 and 12** were detected for the first time in stingless bee products in the present study.

Benzophenones. The mass spectrum of substance **7** showed a peak corresponding to the molecular ion of m/z 603 $[M+H]^+$ with fragmentation of m/z 585, $[M+H-18]^+$, m/z 467 $[M+H-118]^+$, m/z 411 $[M+H-56]^+$, m/z 343 $[M+H-68]^+$, m/z 287 $[M+H-56]^+$, which, according to the literature, corresponds to a benzophenone called garcinol^{34,35}. Substance **13** is another possible benzophenone since it has a molecular ion of m/z 671, although it has the same fragmentation profile as that of substance **7**, differing from the latter by the presence of a prenyl radical (m/z 69). Garcinol is a polyisoprenyl benzophenone with anti-inflammatory, antioxidant, antiproliferative and anticancerigenous activities which is detected in species of the genus *Garcinia*,³⁶ and in the species *Clusia burchellii* (“gameleira”)³⁷ and *Platonia insignis* (“bacurizeiro”)³⁷ of the family Clusiaceae. It should be pointed out that plant species of the family Clusiaceae, especially the genera *Platonia*, *Vismia* and *Clusia*, are found in the municipality of Palmeirândia-MA²⁹. Polyisoprenyl benzophenones have also been identified in brown propolis from Cuba³⁸ and from Bahia-BR³⁹. Tomás-Barberán et al.⁴⁰ identified benzophenones in Venezuelan propolis and suggested that bees collect floral resins of the genus *Clusia* in order to produce propolis. The benzophenone ent-nemorosone was isolated

from the geopropolis of *M. scuterralis*, stingless bees, and its presence has also been detected in plant species of the family Clusiaceae extensively growing in the region⁹.

In vitro and in vivo antitumor activity

The cell viability of the ascitic form of Ehrlich tumor treated with extract concentrations of 0, 62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$ is illustrated in Figure 4. At the highest concentrations (500 and 250 $\mu\text{g/mL}$) the extracts were cytotoxic to Ehrlich tumor cells, with EG1, EG2, EG4 and EG6 being the most cytotoxic, inducing almost a 50% reduction of cell viability starting at the concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$. In contrast, EG3 and EG5 only induced a 50% reduction of cell viability at the highest concentration (500 $\mu\text{g/mL}$). The mean CI_{50} values of the extracts were: EG1=270 $\mu\text{g/mL}$, EG2=315 $\mu\text{g/mL}$, EG3=340 $\mu\text{g/mL}$, EG4=309 $\mu\text{g/mL}$, EG5=419 $\mu\text{g/mL}$, and EG6=180 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 5), with no statistically significant difference between them, except for EG6 which showed the lowest CI_{50} (180.06 $\mu\text{g/mL}$).

In order to better understand the effects of the extracts of *M. fasciculata* geopropolis we investigated the in vivo antitumor action of EG1 on the ascitic and solid forms of Ehrlich tumor of Swiss mice. Although this was not the extract with the best cytotoxicity, it was the one with the best extraction yield and its cytotoxicity and chemical profile were closely similar to those of EG6, the most active extract.

Thus, we observed that EG1 significantly inhibited the number of total tumor cells and reduced the ascites volume of the tumor at the dose of 50 mg/kg in all treated groups (Figure 6A). There was no difference in the aspect of the tumor ascites, most of which had a score of 1, i.e., a non-hemorrhagic aspect (Figure 6B).

Ascitic fluid is essential for tumor growth since it represents a direct nutritional source for tumor cells. Its production in Ehrlich ascites tumor is mainly guaranteed by the hyperpermeability of the capillaries present in the peritoneal cavity, a feature due to the fact

that the neoplastic cells induce an increased expression of receptors that promote angiogenesis, with the subsequent formation of large amounts of ascitic fluid^{41,42}.

The number of tumor cells in the ascites was significantly inhibited in the EG1A50 group, treated with the extract at the highest concentration, compared to control and to the remaining treated groups (Figure 6C). However, there was no significant difference in the viability of these cells (Figure 6D).

Regarding the survival curve of the animals, only the EG1A50 group showed a significant increase compared to control (Figure 6E). Similarly, the mean number of days of survival of the EG1A50 group of animals was significantly higher compared to control and to the remaining treated groups (Figure 6F), with a 9.5% increase in life expectancy (Table 2).

We should emphasize the increased survival and life expectancy of the animals treated with EG1 since an increased life expectancy is definitely an important criterion for the assessment of any chemotherapeutic agent^{19,41}.

According to studies on propolis, we know that the increase survival of experimental animals may be mainly related to the prevention of the implantation of a transplantable tumor and to the fact that propolis inhibits DNA synthesis in tumor cell cultures, thus directly acting on the destruction of cytoplasmic and nuclear structures.^{43,45}

A Croatian propolis extract showed a synergistic antitumor effect with cisplatin on Ehrlich tumor, inhibiting tumor growth, increasing animals survival by an additional 115% rate and reducing the toxic and cytotoxic effect of cisplatin on normal cells without affecting its cytotoxicity for tumor cells⁴⁵.

For the treatment of Ehrlich tumor in the solid form, EG1 administered 48 hours before tumor implant (prophylactic treatment) induced a significant reduction of paw thickness in the EG1S 0.5 group on the 8th, 10th, 12th and 14th day compared to control and

to the EG1S 50 group. At the dose of 5 mg/kg, there was a reduction of paw thickness on the 4th, 8th, 10th, 12th and 14th day compared to control and a reduction on the 8th, 12th and 14th day compared to the EG1S 50 group (Figure 7A).

EG1S administered at the dose of 5 mg/kg after tumor implant (therapeutic treatment) significantly inhibited the increase in paw thickness on the 12th day compared to control and to the higher dose of 50 mg/kg and also significantly inhibited tumor growth compared to control on the 14th day (Figure 7B).

The variation between the final and initial thickness in the prophylactic treatment revealed a significant reduction at the doses of 0.5 and 5 mg/kg compared to control and to the dose of 50 mg/kg. In the therapeutic treatment, the dose of 5 mg/kg induced a significant reduction compared to control and to the remaining treated groups (Figure 7C and 7D).

EG1 also had a significant inhibitory effect on the growth of Ehrlich tumor in the solid form in the paw even when the animals were treated ip., data that were confirmed both by macroscopic measurement and by microscopic analysis, with a reduction of paw thickness being observed in treated animals. These results agree with those reported by Araujo et al.²⁴ who demonstrated that a propolis extract of *Scaptotrigona aff. postica*, stingless bees inhibited the progression of Ehrlich tumor in the paws of mice starting on the 6th day after inoculation of single doses of 5 and 50 mg/kg, even when the tumor was implanted at a distance from the treatment site.

This model is primarily evaluated on the basis of increased paw thickness, a fact that may express unreal development since paw thickness may reflect not only tumor development per se, but also the intense inflammatory infiltrate commonly occurring in this tumor model, being crucial for histopathological evaluation.

Histopathology revealed that when EG1 was administered in a prophylactic manner the EG1S 0.5 group showed a significant reduction in the number of tumor cells compared to control and to the treated groups, with increased edema in the EG1S 5 group compared to control and to the remaining treated groups, and with polymorphonuclear cells being present in the infiltrate (Figure 8A, B, C and D). However, the highest dose (50 mg/kg) did not differ from control, leading us to suggest that this may have been due to swelling of the paw not because of an increase in tumor cells, but possibly because of the presence of an inflammatory infiltrate. This because the implantation of Ehrlich tumor indices, of itself, a local inflammatory reaction resulting in the formation of intense edema and cell migration. In addition, it has been previously demonstrated that the geopropolis extract of *M. fasciculata* from Palmeirândia has an immunomodulatory action with a proinflammatory response when used to treat THP-1 cells, a monocytic cell line of human leukemia¹⁶.

In contrast, when administered in a therapeutic manner, the EG1S 0.5 group showed a significant reduction of tumor cells compared to control and to the treated groups, with a reduced necrosis in the EG1S 5 and EG1S 50 groups compared to control. And the cell types present in the infiltrate were also polymorphonuclear (Figure 8E, F, G and H).

In general, the efficacy of an antitumor drug is assessed on the basis of its ability to reduce the quantity of tumor cells. However, the importance of the immune response of the host to the tumor should be underscored, reflected by the presence of inflammatory cells at the site of the neoplasia, since an inflammatory response is essential for the modulation of tumor development. Several studies have confirmed the presence of inflammatory infiltrates (macrophages and polymorphonuclear cells) in the stroma and in the periphery of neoplastic tissues as prognostic factors, supporting the dependence between inflammation and tumor

growth, with the influx of inflammatory cells such as neutrophils promoting tumor development⁴⁵.

Both the prophylactic and therapeutic treatments had an inhibitory effect against Ehrlich tumor, even though involving the administration of a single dose. However, the prophylactic treatment proved to be more effective, causing tumor regression since the 8th day, whereas the therapeutic treatment was significantly different starting on the 12th day. This may be explained by the fact that in the prophylactic treatment the active substances are already bioavailable at concentrations high enough to produce an effect, whereas in the therapeutic treatment tumor progression ends up being faster than the bioavailability of active substances. Or yet again, since geopropolis can modulate the immunological system by inducing proinflammatory cytokines, prophylactic treatment becomes more rapid and efficient.

These results underscore the fact that, even when administered as a single dose, the geopropolis extract can induce a satisfactory response against the tumor. This is an important fact that raises the perspectives of new research with this product as a promising material for the production of medications aiding antitumor treatment, mainly because its chemical composition revealed constituents such as benzophenones, triterpenes and alkaloids with a high therapeutic potential whose various biological activities, including the antitumor action, have already been studied.

Thus, we suggest that the antitumor action of *M. fasciculata* geopropolis may be related to the synergistic effect of benzophenones and triterpenes, since benzophenones such as garcinol identified in these extracts have inhibitory effects on MCF-7 tumor cells, with toxicity for these tumor cells at concentrations of more than 20 μM , inducing a substantial loss of adherence and cell lysis⁴⁶. In addition, this geopropolis extract inhibits cell proliferation

and induces cell apoptosis in multiple tumor cell lines of breast and prostate cancer, as well as pancreatic cancer, showing selectivity for tumor cells, since normal epithelial cells of the breast were not affected.⁴⁷

Additionally, pentacyclic triterpenes with an oleanane and ursane skeleton have already been shown to be able to induce apoptosis of tumor cells, to increase the level of caspase activation and to interfere with central regulators of the mechanisms of cell development, proliferation and death, as is the case for p53, for the PI3K/Akt and MAPK pathways, and for NF- κ B.⁴⁸

Pyrrrolizidine alkaloids are considered to be potent antitumor agents since the products of their oxidative metabolism promote the formation of cross-binding of the DNA-protein type⁴⁹. And alkaloids are considered to be the most promising secondary metabolites in the area of antitumor agents⁵⁰.

On this basis, the present data demonstrate that the geopropolis extract of *M. fasciculata* from Palmeirândia-MA has antitumor activity causing the reduction of tumor cell numbers both in vitro and in vivo, increasing the survival of animals with ascites tumor and also reducing the size of solid tumors both when administered before the inoculation of tumor cells (prophylactic treatment) and after tumor implant and fixation (therapeutic treatment). In addition, it contains chemical constituents such as alkaloids, benzophenones and triterpenes, first reported here in *M. fasciculata* geopropolis, which predominate even at different times of collection, thus guaranteeing their constant biological activity. Furthermore, the present study also opens perspectives for new investigations involving the isolation of these chemical substances and the elucidation of their mechanism of antitumor action.

ABBREVIATIONS USED

EG	geopropolis extract
HPLC	high performance liquid chromatography
UV-Vis	ultraviolet visible
ESI	electrospray ionization
MS	mass spectrometry
DAD	diode array detection
MS/MS	tandem mass spectrometry
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PBS	phosphate buffered saline

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the beekeepers for donating the geopropolis samples.

FUNDING

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Foundation for the Support of Research Scientific and Technological Development of the State of Maranhão (FAPEMA).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Santos, G.M.; Antonini, Y. The traditional knowledge on stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene-Nawe tribe in western Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed*, **2008**, 4, 1-9.
- (2) Villas-Boas, J. K.; Malaspina, O. Parâmetros físico-químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. *Mensagem Doce*, **2005**, 82,6-16.
- (3) Souza, B.A.; Carvalho, C.A.; Alves, R.M.O.; Dias, C.S.; Clarton, L. **Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa**. Série Meliponicultura, Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, **2009**, 46.
- (4) Dutra, R. P.; Nogueira, A. M. C.; Marques, R. R. O.; Costa, M. C. P.; Ribeiro, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, 18, 557-562.
- (5) Da Cunha, M.G.; Franchin, M.; Galvão, L.C.C.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Ikegaki, M.; Alencar, S.M.; Koo, H.; Rosalen, L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. *BMC Complement Altern Med.* **2013**, 13, 23.
- (6) Franchin, M.; da Cunha, M. G.; Denny, C.; Napimoga, M. H.; Cunha, T. M.; Koo, H.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *J. Ethnopharmacol.* 2012, 143, 709-715.
- (7) Coelho, G.R.; Mendonça, R.Z.; Vilar, K.S.; Figueiredo, C.A.; Badari, J. C.; Taniwaki, N.; Namiyama, G.; Oliveira, M.I.; Curti, S.P.; Silva, P.E.; Negri, G. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against

- Antiherpes Simplex Virus (HSV-1). *Evid Based Complement Alternat Med*, **2015**, 2015, 1-10.
- (8) Ribeiro-Junior, J.A.; Franchin, M.; Cavallini, M.E.; Denny, C.; Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P.L. Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2015**, 2015, 1-5.
- (9) Da Cunha, M. G.; Rosalen, P. L.; Franchin, M.; de Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Ransom, T.; Beutler, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* **2016**, 82, 190-194.
- (10) Silva, E. C. C.; Muniz, M. P.; Nunomura, R. C. S.; Nunomura, S. M.; Zilse, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quím. Nova*, **2013**, 36, 628-633.
- (11) Araújo, M. J. A. M.; Búfalo, M. C.; Conti, B. J.; Fernandes Jr, A.; Trusheva, B.; Bankova, V.; Sforcin, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, 4, 12-20.
- (12) Premratanachai, P.; Chanchao, C. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2014**, 4, 337-344.
- (13) Libério, S.A.; Pereira, A.L.A., Dutra, R.P.; Reis, A.S.; Araújo, M.J.A. M.; Mattar, N.S.; Silva, L.A.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F.; Guerra, R.N.M.; Monteiro-Neto, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med.*, **2011**, 11, 1-10.

- (14) Dutra, R. P.; Abreu, B. V. B.; Cunha, M. S.; Batista, M. C. A.; Torres, L. M. B.; Nascimento, F. R. F.; Ribeiro, M. N. S.; Guerra, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 2549–2557.
- (15) Batista, M.C.A.; Abreu, B.V.B.; Dutra, R.P.; Cunha, M.S.; Amaral, F.M.M.; Torres, L.M.B.; Ribeiro, M.N.S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. *Acta Amaz.*, **2016**, 46, 1-7.
- (16) Oliveira, L.P.G.; Contea, F.L.; Cardoso, E.O.; Conti, B.J.; Santiago, K.B.; Golim, M.A.; Cruz, M.T.; Sforcin, J.M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geoprópolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. *J. Pharm. Pharmacol*, **2016**, 68, 1551-1558.
- (17) Cinegaglia, N. C.; Bersano, P. R. O.; Araújo, M. J. A. M.; Búfalo, M. C.; Sforcin, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in vitro*. *Evid. Based Complement. Alternat.Med.* **2013**, 2013, 737-386.
- (18) 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. *Biomed Pharmacother*, **2016**, 81, 48-55.
- (19) Nascimento, F.R.F.; Cruz, G.V.B.; Pereira, P.V.S.; Maciel, M.C.G.; Silva, L.A.; Azevedo, A.P.S.; Barroqueiro, E.S.B.; Guerra, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.*, **2006**, 78, 2650-2653.

- (20) Huang, L.L.; Xia, H.H.X.; Zhu, S.L. Ascitic fluid analysis in the differential diagnosis of ascites: focus on cirrhotic ascites. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, **2014**, 2, 58–64.
- (21) Plowman, J.; Dykes, D.J.; Hollingshead, M.; Simpsons-Herren, L.; Alley, M.C. Anticancer drug development guide: Preclinical screening, clinical trials and approval, ed.-Teicher B., *Humana*, Totowa, NJ, 1995, 101.
- (22) Araújo, M.J.A.M.; Dutra, R.P.; Costa, G.C., Reis, A.S.; Assunção, A.K.M.; Libério, S.A.; Maciel, M.C.G.; Silva, L.A.; Guerra, R.N.M.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, 20,4, 580-587.
- (23) Calixto-Campos, C.; Zarpelon, A.C.; Correa, M.; Cardoso, R.D.R.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Cecchini, R.; Moreira, E.G.; Crespigio, J.; Bernardy, C.C.; Casagrande, R.; Verri, W.A.Jr. The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: A novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. *Biomed Res Int.* **2013**, 2013.
- (24) Mroczek, T.; Ndjoko, K.; Glowniak, K.; Hostettmann, K. On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1056, 91–97.
- (25) Mroczek, T.; Ndjoko, K.; Glowniak, K.; Capala, A.M.; Hostettmann, K. Investigation of *Symphytum cordatum* alkaloids by liquid–liquid partitioning, thin-layer chromatography and liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 566, 157–166.

- (26) Boppré, M.; Colegate, S.M.; Edgar, J.A. Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 594–600.
- (27) Boppré, M.; Colegate, S.M.; Edgar, J.A.; Fischer, O.W. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 5662–5672.
- (28) Barros, M.H.M.R.; Da Luz, C.F.P.; De Albuquerque, P.M.C. Pollen analysis of geopropolis of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 (Meliponini, Apidae, Hymenoptera) in areas of Restinga, Cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. *Grana*, **2013**, 52, 81–92.
- (29) Barros, M.H.M.R.; De Albuquerque, P.M.C.; Da Luz, C.F.P. Pollen profile of Geopropolis samples collected of “Tiúba” (*Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith 1854) in areas of Cerrado and flooded fields in the state of Maranhão, Brazil. *Braz. J. Bot.*, **2016**, 39, 3, 895–912.
- (30) Turetek, F.; Hanus, V. Retro-Diels-Alder reaction in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* **1984**, 3, 85-152.
- (31) Liu, Y.; Liu, Z.; Luc, C.; Lid, J.; Ning, Z.; Song, Z.; Wang, C.; Dub, Z.; Lua, X.; Zhao, S.; Lu, A. Comprehensive identification of active triterpenoid metabolites in frankincense using a coupling strategy. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 963, 90–98.
- (32) Zhang, Y.; Ning, Z.; Lu, C.; Zhao, S.; Wang, J.; Liu, B.; Xu, X.; Liu, Y. Triterpenoid resinous metabolites from the genus *Boswellia*: pharmacological activities and potential species-identifying properties. *Chem. Cent. J.*, **2013**, 7, 153.
- (33) Lima, E.M.; Nascimento, A.M.; Lenz, D.; Scherer, R.; Meyrelles, S.S.; Boëchat, G.A.P.; Andrade, T.U.; Endringer, D.C. Triterpenes from the *Protium heptaphyllum*

- resin – chemical composition and cytotoxicity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2014**, 24, 399-407.
- (34) Rane, S.; Damale, S.; Raju, S.; Kochhar, R.; Bhandarkar, D.; Datar, A.; Kelkar, J.; Rasam, P.; Kher, M.; Barbade, K. Identification of antibacterial componente from extract of *Garcinia indica* fruit rinds using LC/MS/MS. Shimadzu, ASMS, **2013**, MP34-689.
- (35) Bharate, J.B.; Vishwakarma, R.A.; Bharate, S.B.; Kushwaha, M.; Gupta, A.P. Quantification of the polyisoprenylated benzophenones garcinol and isogarcinol using multiple reaction monitoring LC/Electrospray Ionization-MS/MS analysis of ultrasound-Assisted Extracts of *Garcinia indica* Fruits. *Journal of AOAC International*, **2014**, 97, 1317-1322.
- (36) Naldoni, F.J.; Claudino, A.L.R.; Cruz Jr, J.W.; Chavasco, J.K.; Faria e Silva, P.M.; Veloso, M.P.; Dos Santos, M.H. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. *J. Med. Food.*, **2009**, 12, 403-407.
- (37) Anholeti, M.C.; De Paiva, S.R.; Figueiredo, M.R.; Kaplan, M.A.C. Chemosystematic aspects of polyisoprenylated benzophenones from the genus *Clusia*. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2015**, 87, 289-301.
- (38) Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A.L.; Fernandez, M.C.; Hernández, I.M.; Rosado, A.; Rastrelli, L. Chemical characterization of cuban propolis by HPLC–PDA, HPLC–MS, and NMR: the brown, red, and yellow cuban varieties of propolis. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 7502–7509.
- (39) Castro, M.L.; Nascimento, A.M.; Ikegaki, M.; Costa-Neto, C.M.; Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. Identification of a bioactive compound isolated from brazilian propolis type 6. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 5332–5335.

- (40) Tomas-Barberan, F.A.; Garcia-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F. Tomas-Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical from Venezuela. *Phytochemistry*, **1993**, 34, 191-196.
- (41) Gupta, M., Mazumder, U.K., Kumar, R.S., Kumar, T.S. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2004**, 25, 1070-1076.
- (42) Badr, M.O.T.; Edrees, N.M.M.; Abdallah, A.A.M.; El-Deen, N.A.M.N.; Neamat-Allah, A.N.F.; Ismail, H.T.H. Anti-tumour effects of Egyptian propolis on Ehrlich ascites carcinoma. *Vet. Ital.*, **2011**, 47, 341-350.
- (43) Orsolich, N.; Terzic, S.; Mihaljevic, Z.; Sver, L.; Basic, I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull.* **2005**, 28, 1928-1933.
- (44) Orsolich, N.; Car, N.; Lisicic, D.; Benkovic, V.; Knezevic, A.H.; Dikic, D.; Petrik, J. Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice. *J. Pharm. Sci.*, **2013**, 102, 4395–4405.
- (45) Dos Santos, O.J.; TCBC-MA; Sauaia Filho, E.N.; Nascimento, F.R.F.; Silva Júnior, F.C.; Fialho, E.M.S.; Santos, R.H.P.; Santos, R.A.P.; Serra, I.C.P.B. Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de Ehrlich. *Rev. Col. Bras.Cir.*, **2016**, 43, 018-021.
- (46) Collins, H.M.; Abdelghany, M.K.; Messmer, M.; Yue, B.; Deeves, S.E.; Kindle, K.B.; Mantelingu, K.; Aslam, A.; Winkler, G.S.; Kundu, T.K.; Heery, D.M. Differential effects of garcinol and curcumin on histone and p53 modifications in tumour cells. *BMC Cancer*, **2013**, 37.

- (47) Ahmad, A.; Sarkar, S.H.; Aboukameel, A.; Ali, S.; Biersack, B.; Seibt, S.; Li, Y.; Bao, B.; Kong, D.; Banerjee, S.; Schobert, R.; Padhye, S.B.; Sarkar, F.H. Anticancer action of garcinol *in vitro* and *in vivo* is in part mediated through inhibition of STAT-3 signaling. *Carcinogenesis*, **2012**, 33, 2450–2456.
- (48) Vechia, L.D.; Gnoatto, S.C.B.; Gosmann, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Quím. Nova*, **2009**, 32, 5, 1245-1252.
- (49) Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L.; Lopes, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quím. Nova*, **2005**, 28, 118-129.
- (50) Mello, F.M.S.; Pires, W.C.; Pereira, F.C.; Lima, A.P.; Vilanova-Costa, C.A.S.T. Atividade citotóxica do extrato bruto etanólico de *Spermacoce poaya* A. Saint-Hilaire (Rubiaceae) em células normais e tumorais *in vitro*. *Rev. Biol. Neotrop.* **2011**, 8, 25-32.

Figure captions

Figure 1. Chromatographic profile of the hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1 to EG6) obtained by HPLC-UV-vis (254nm).

Figure 2. Base peak chromatogram (BPC) of the hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1, EG2, EG5 and EG6) obtained by HPLC-DAD.

Figure 3. Chemical structure of compounds tentatively identified in the geopropolis extracts of *Melipona fasciculata*.

Figure 4. Cell viability of the ascitic form of experimental Ehrlich tumor treated with 0, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL concentrations of hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1 to EG6). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$) ANOVA (One way/Newman-Keuls).

Figure 5. In vitro antitumor activity of hydroethanolic extracts of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1 to EG6) represented by mean inhibitory concentration (IC_{50}). The symbols and the vertical lines represent the means \pm standard deviations of the indicated means ($n=3$), #Indicates a significant difference between them ($p < 0.01$), ANOVA (Kruskal-Wallis).

Figure 6. Effect of treatment with a hydroethanolic extract of *Melipona fasciculata* geopropolis (EG1) on the development of Ehrlich ascites tumor. The animals were treated intraperitoneally with EG1 at the doses of 0.5, 5.0 and 50 mg/kg or with PBS (control) and inoculated with 2×10^6 tumor cells 48 hours later. Ten days after inoculation, ascites was

collected for the evaluation of volume (A), aspect (non-hemorrhagic-1, semi-hemorrhagic-2 and hemorrhagic-3) (B), total number of tumor cells (C), and tumor cell viability (D). Survival was monitored (E) and mean number of days of survival was calculated (F). Data represent the mean \pm S.D. for 5 animals per group. * $p \leq 0.05$ compared to control. # $p \leq 0.05$ compared to the remaining EG1 doses.

Figure 7. Effect of treatment with *Melipona fasciculata* geopropolis on solid Ehrlich tumor development in mice. Swiss mice were treated intraperitoneally with EG1 for prophylaxis and therapy at the doses of 0.5, 5 and 50 mg/kg. The control groups received only PBS. Forty-eight hours after prophylactic or therapeutic treatment, the animals were inoculated with 10⁵ Ehrlich tumor cells in the footpad and paw thickness was measured every 2 days with a digital pachymeter (A and B). Difference between the final and initial thickness after prophylaxis and therapy, respectively (C and D). Data are the mean \pm S.E.M. for 6 animals per group. *indicates a significant difference between the control and treated groups ($p \leq 0.05$), #indicates a significant difference between the treated groups ($p \leq 0.05$).

Figure 8. Photomicrograph of footpad tumor cells of mice with Ehrlich tumor treated with a hydroethanolic extract of *Melipona fasciculata* geopropolis (EG1). Swiss mice were treated prophylactically and therapeutically with EG1 at the doses of 0.5, 5 and 50 mg/kg by the intraperitoneal route. The control groups received only PBS. The images represent histological sections of the footpad 14 days after Ehrlich tumor inoculation, stained with hematoxylin-eosin and analyzed at 400x magnification. Photomicrographs showing a panoramic view of neoplastic tissue in the dermis. Sagittal section. (A) Prophylactic control, (B) prophylactic EGS 0.5, (C) prophylactic EGS 5, (D) prophylactic EGS 50, (E)

Therapeutic control, (F) therapeutic EGS 0.5, (G) therapeutic EGS 5, (H) therapeutic EGS 50.

The black arrows indicate tumor cells and the red arrow indicates an inflammatory infiltrate.

Table 1. Compounds tentatively identified in the geopropolis extract (EG) of *Melipona fasciculata* Smith by HPLC-DAD-ESI-EM/EM

Compound	MW	[M+H] ⁺ m/z	MS/MS fragments (m/z)	Tentative identification
1	317	318	300, 274, 256	Dihydroheliospathuline-N-oxide
2	454	455	437, 409, 359, 295	9,11-Dehydro-β-bowellic acid
3	436	437	419, 391	15-Hydroxytingenone
4	490	491	455, 437	Olean-12-ene-2,3,21,23,28-pentol
5	470	471	453, 435, 407	3,4-Di-epigypsogenin
6	488	489	471, 453, 435	3,6,7-Trihydroxyolean-12-em-27-oic acid
7	602	603	585, 467, 411, 343, 287	Garcinol
8	512	513	495, 453, 435	3-Acetyl-11-keto-α-bowellic acid
9	530	531	513, 453	Speciosaperoxide
10	438	439	421, 404	12-Ursene-2-diketone
11	514	515	497, 437, 345	3-Acetyl-11-hydroxy-β-bowellic acid
12	440	441	423, 405	20, 22- Epoxyeupha-24-ene-3-one
13	670	671	585, 467, 411, 343, 301	Poliisoprenyl benzophenone

^a RT, retention time, MW, molecular weight; [M+H]⁺, molecular ion

Table 2. Effect of intraperitoneal (ip.) treatment with a hydroethanolic extract of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis (EG1) on the increase of animal life expectancy

Parameters	Control	EG 0.5 mg/kg	EG 5 mg/kg	EG 50 mg/kg
Median survival time (days)	21.0± 1.8	20.5± 1.2	20.0± 4.3	23.0 ±3.7
Increase in life expectancy (%)	-	-2.4	-4.8	9.5

Values are expressed as mean ± SD

Figures Graphics

Figure 1

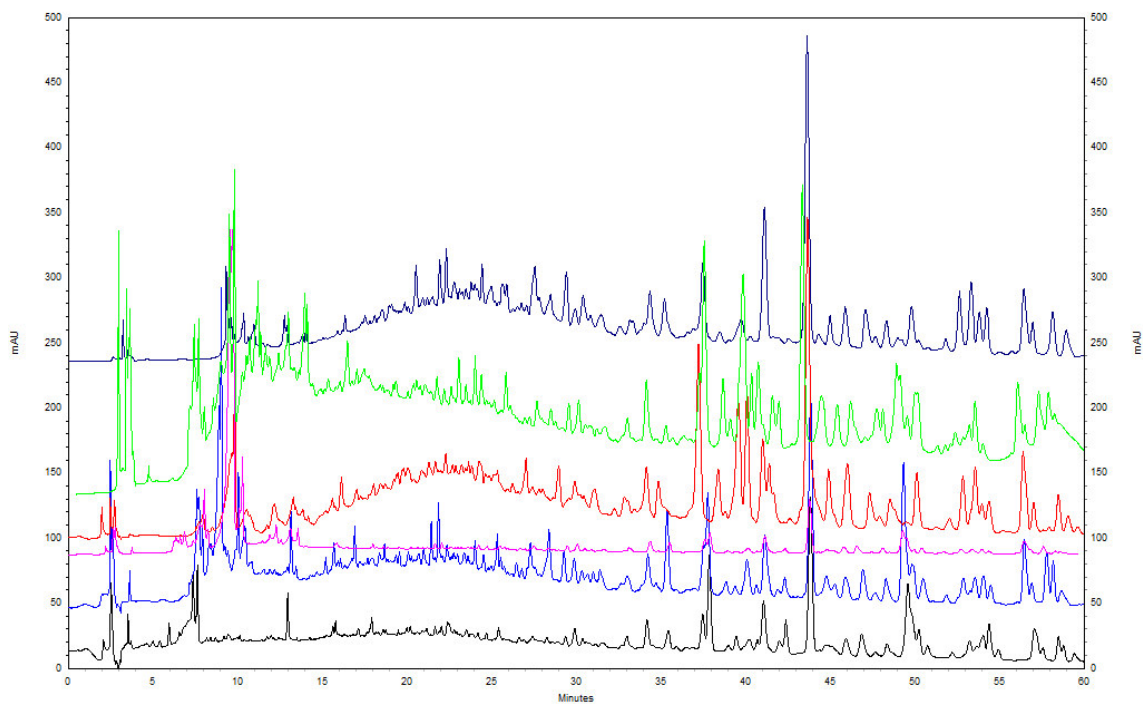


Figure 2

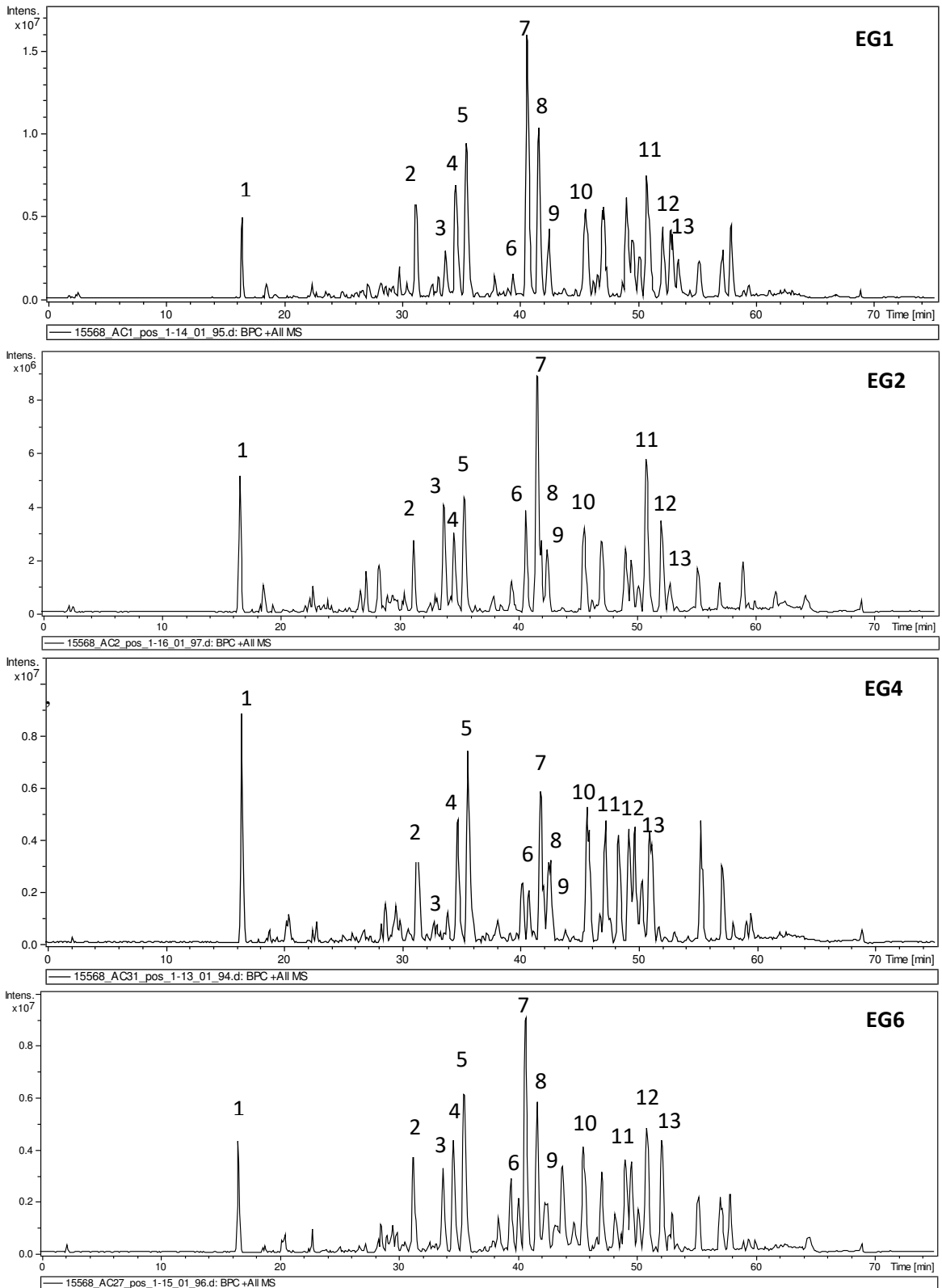


Figure 3

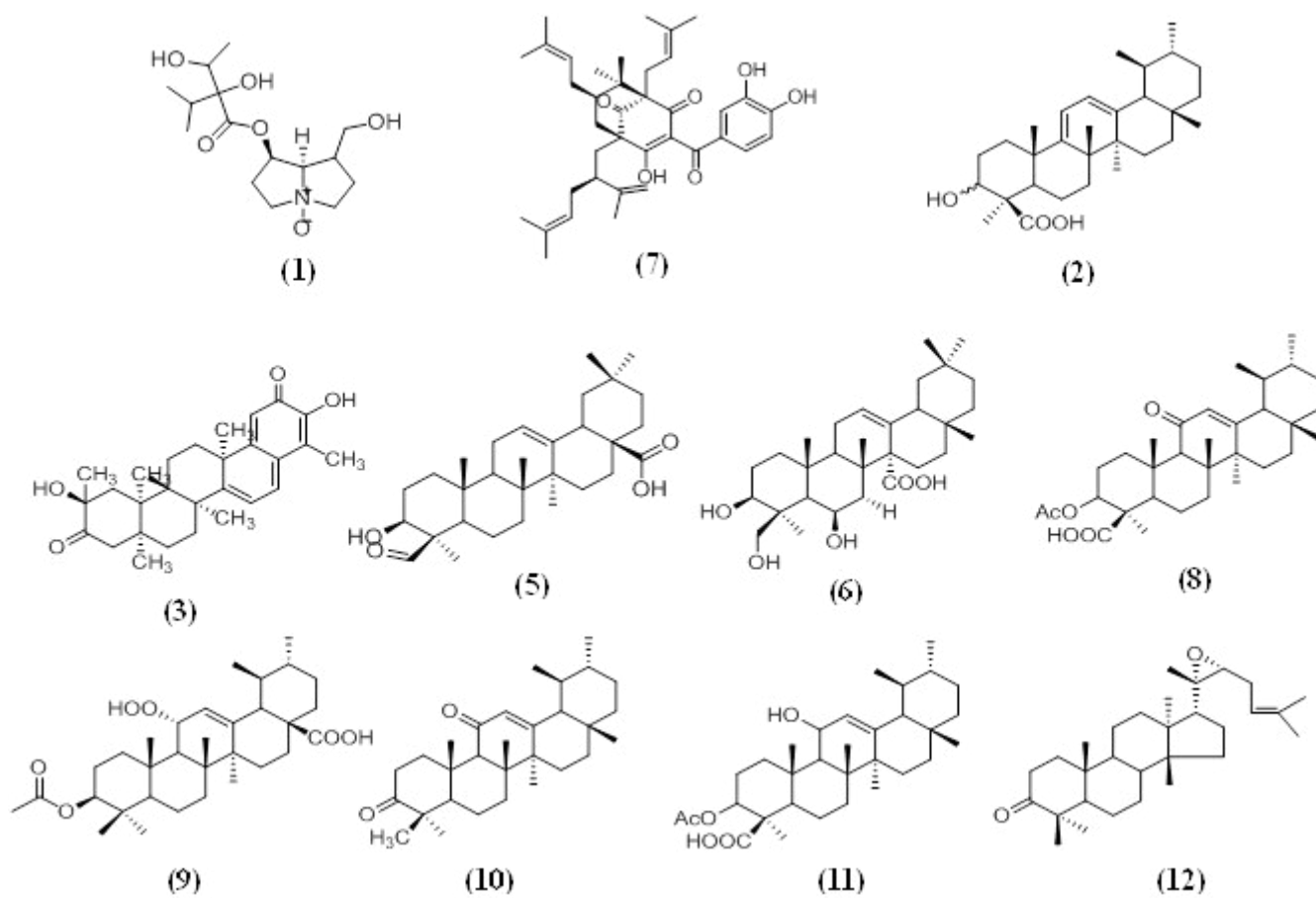


Figure 4

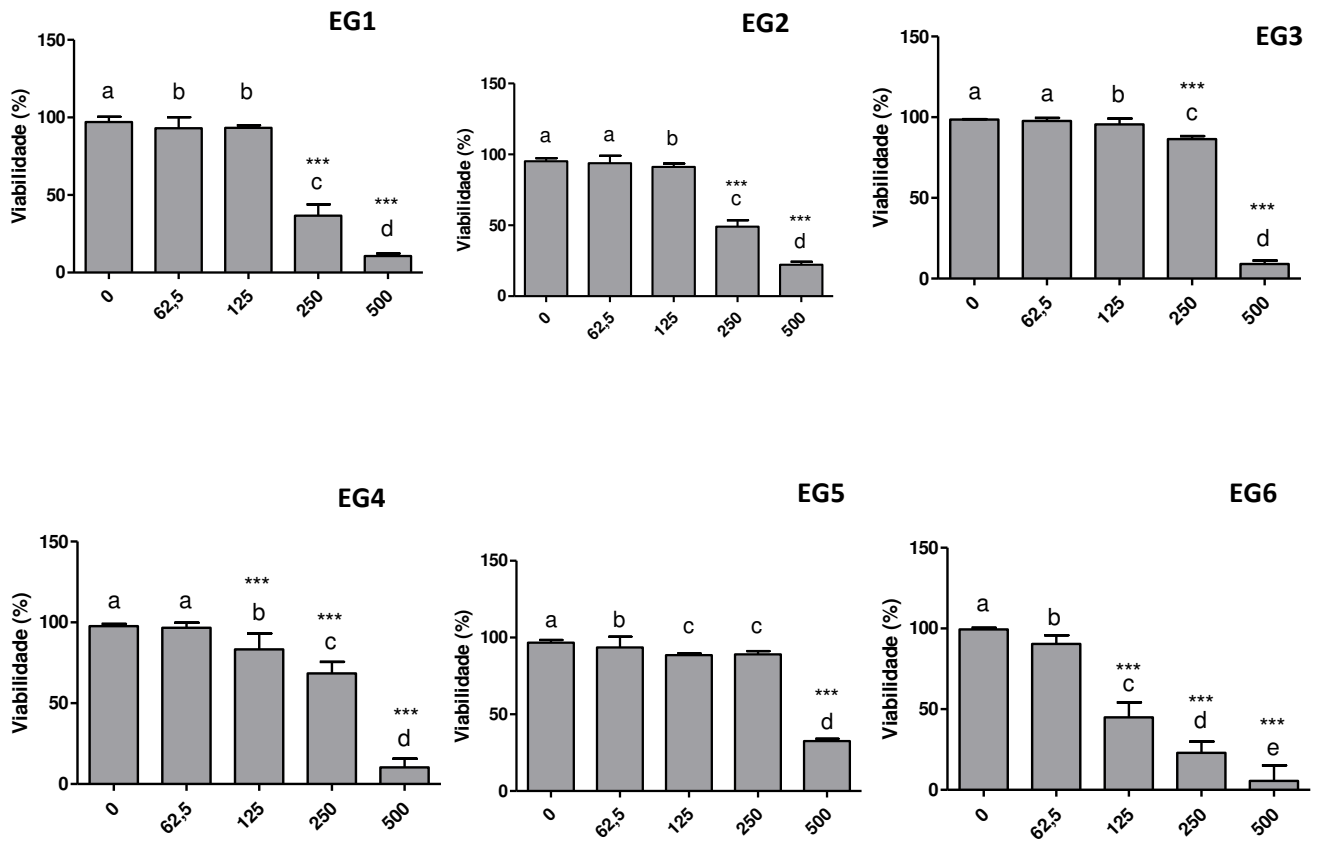


Figure 5

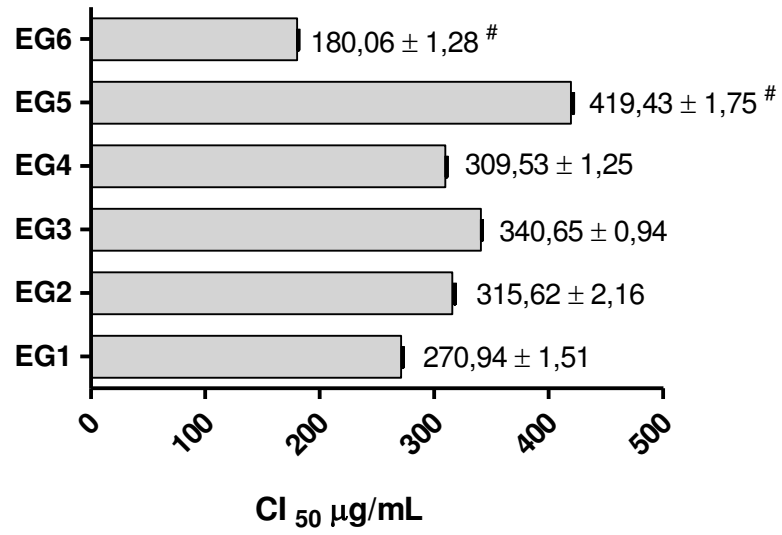


Figure 6

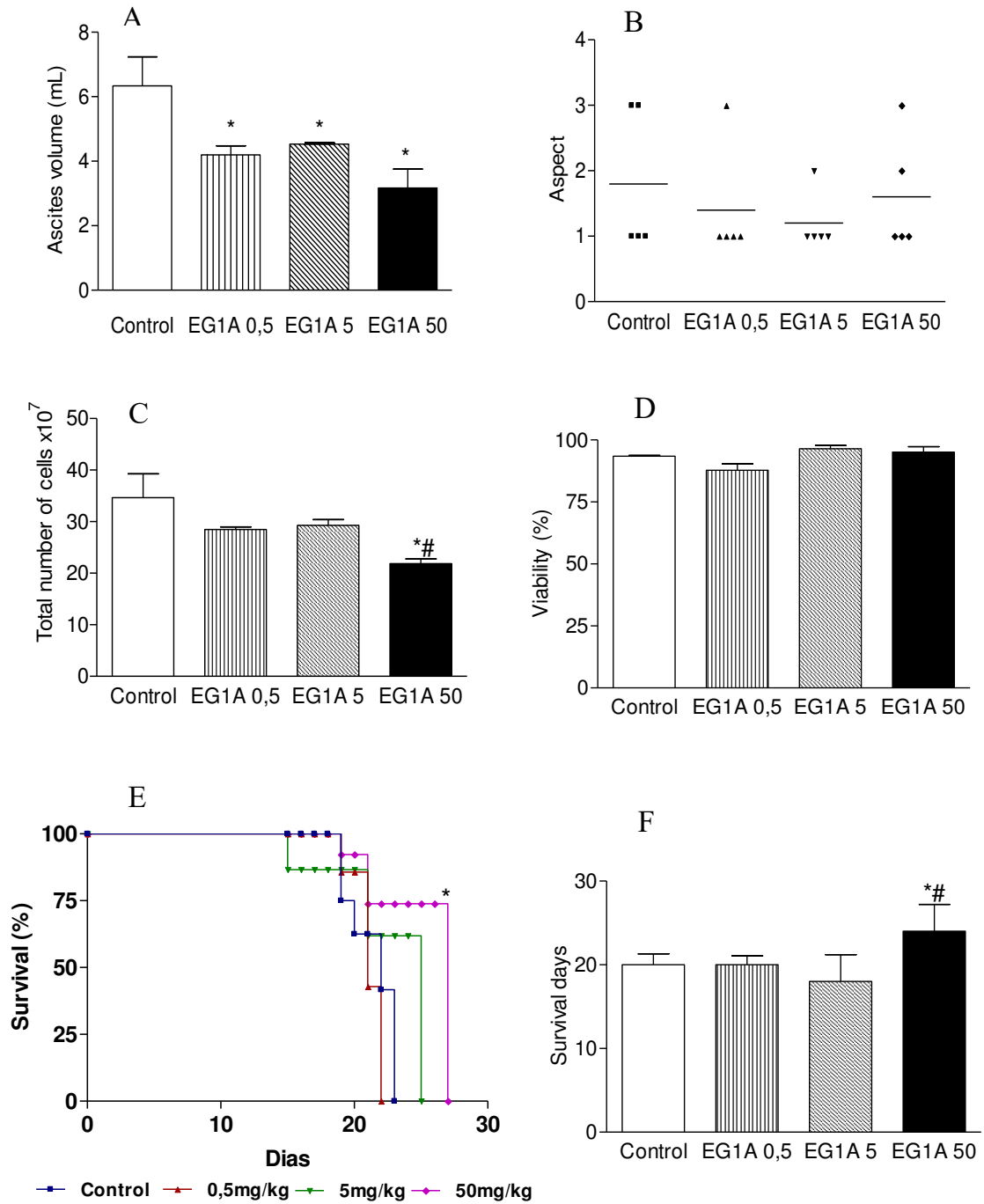


Figure 7

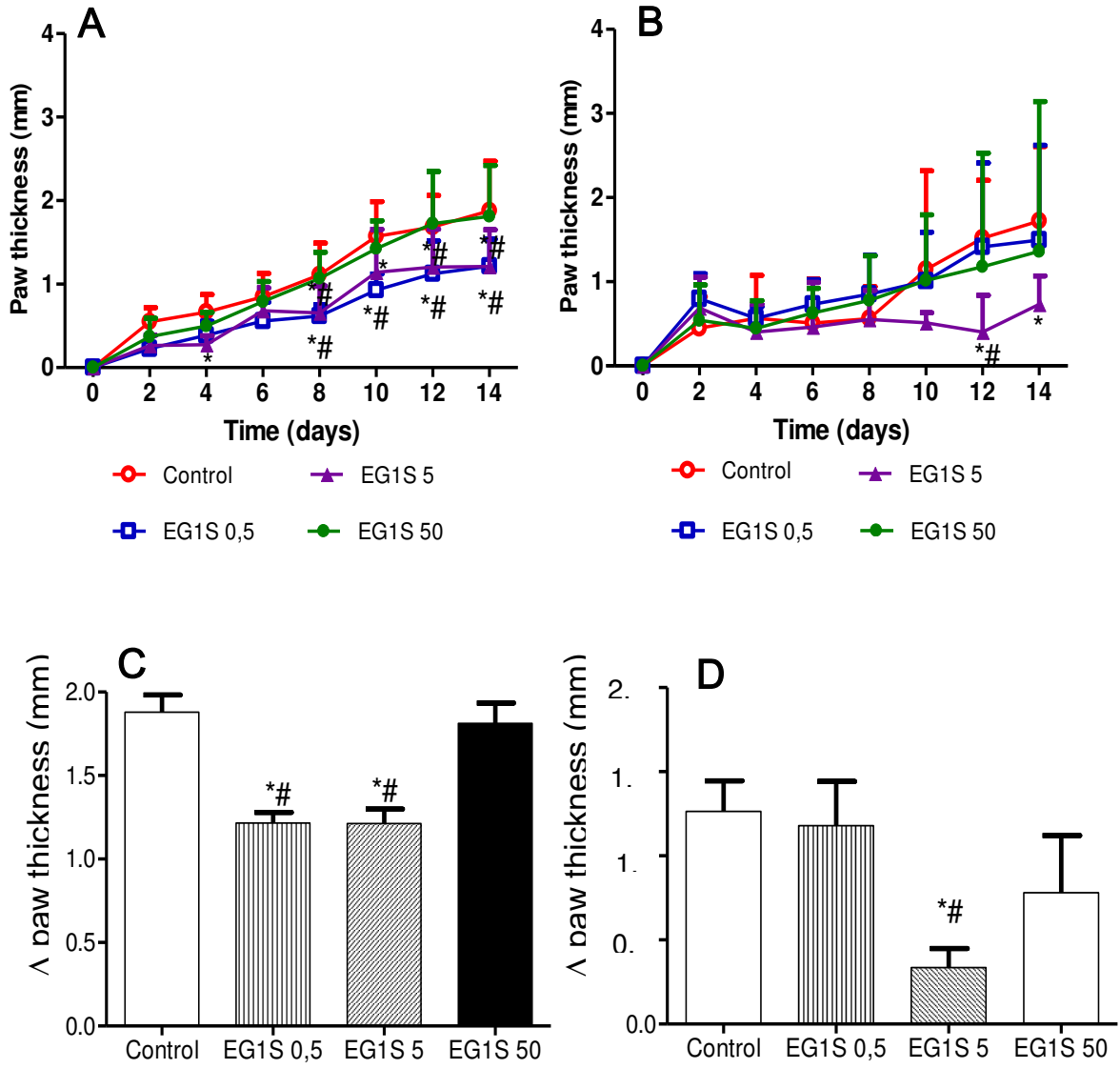


Figure 8

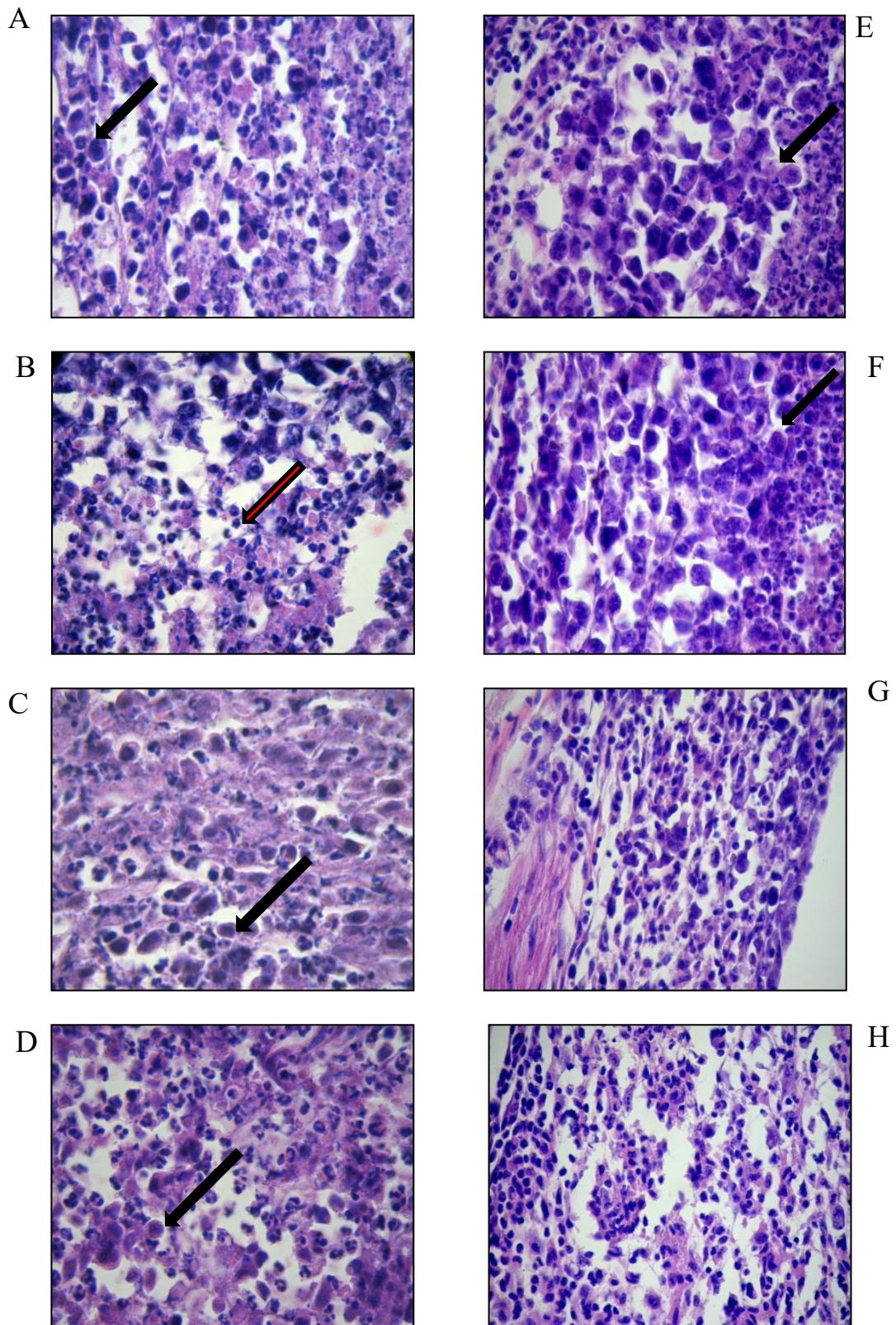


Table of Contents Graphic (TOC)



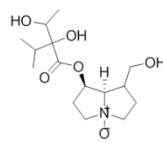
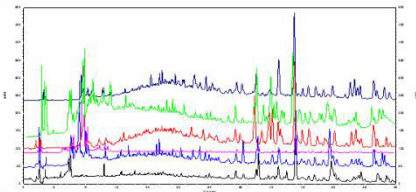
Melipona fasciculata



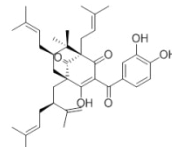
Geoprópolis



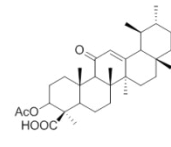
**Antitumor activity
Tumor Ehrlich**



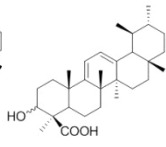
Alkaloids



Benzophenones



Triterpenes



5. CONCLUSÕES

- Os extratos hidroetanólicos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de diferentes regiões fitogeográficas do estado do Maranhão apresentam composição química distinta, mas atividades biológicas semelhantes.
- O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Fernando Falcão, região do Cerrado maranhense, e suas frações acetato e hidrometanólica apresentaram maior citotoxicidade para células tumorais Ehrlich, MCF-7 e RAW, sendo que doses citotóxicas para células do tumor de Ehrlich e MCF-7 não foram citotóxicas para células RAW.
- O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* do Cerrado maranhense e suas frações acetato e hidrometanólica também apresentaram atividade antioxidante e composição química rica em compostos fenólicos, como taninos hidrolisáveis, provavelmente os responsáveis pela citotoxicidade para células tumorais.
- O extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Palmeirândia - MA apresentou atividade antitumoral causando diminuição do número de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, aumentando a sobrevivência dos animais portadores de tumor ascítico, bem como induzindo a diminuição do tumor sólido, tanto quando administrado de forma profilática como terapêutica.
- Além disso, apresentou constituintes químicos como alcaloide, benzofenonas e triterpenos que provavelmente em sinergismos são os responsáveis por essa atividade biológica.
- A bioatividade da geoprópolis de *Melipona fasciculata* abre perspectiva para o seu aproveitamento como matéria-prima para futuros medicamentos que ajudem no tratamento antitumoral e também para mais pesquisas para o esclarecimento de seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, B. V. B.; DUTRA, R. P.; BATISTA, M. C. A.; AZEVEDO, C. C.; NOGUEIRA, A. M. C.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, 8, 1, 18-24, 2006.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNI, C.L. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.
- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAI, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v.25, p.2097-2116, 2008.
- ARAÚJO, M.J.A.M.; DUTRA, R.P.; COSTA, G.C.; REIS, A.S.; ASSUNÇÃO, A.K.M.; LIBÉRIO, S.A.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira Farmacognia**, v.20, p. 580-587, 2010.
- ARAÚJO, M.J.A.M., MATAR, N.S.; REIS, A.S.; SERRA, I.C.P.B.; FIALHO, E.M.S.; ASSUNÇÃO, A.K.M.; DUTRA, R.P.; NOGUEIRA, A.M.C.; LIBÉRIO, S.A.; GUERRA, R.N.M.; LOPES, A.S.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. **Natural Product Research**, v.12, p.1-10, 2011.
- ARAÚJO, M. J. A. M., BÚFALO, M. C., CONTI, B. J., FERNANDES JUNIOR, A., TRUSHEVA, B., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, 4, 1, 12-20, 2015.
- ARAÚJO, K. S. D. S.; SANTOS JÚNIOR, J. F. D.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M., BARBOSA, R. D. S.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARIANO, S. M. B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, 46,1, 61-68, 2016.
- ASSUNÇÃO, A. K. M. Efeito antitumoral do tratamento com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em modelo experimental de tumor de

Ehrlich. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of brazilian propolis. **Apidologie**, 29, 361-367, 1998.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 1, 23–28, 2009.

BANKOVA, V; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, 1, 1, 88-92, 2007.

BANKOVA, V; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, 48, 28, 1-8, 2014.

BARTH, O. M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apacta**, v.41, p.71-85, 2006.

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**, 81, 48-55, 2016.

BATISTA, M. C. A. **Composição química e atividade antioxidante de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do município de Palmeirândia, Maranhão, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B.; DUTRA, R.P.; CUNHA, M.S.; AMARAL, F.M.M.; TORRES, L.M.B.; RIBEIRO, M.N.S. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v.46, n.3,p. 1-27, 2016.

BEZERRA, J.M.D. **Meliponicultura: uma atividade essencial para a economia familiar do trópico úmido.** In: Moura, EG. Agroambientes de Transição: entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. São Luís: UEMA. 312, 2004.

BORGES, K.S.; BRASSESCO, M.S.; SCRIDELI, C.A.; SOARES, A.E.E.; TONE, L.G. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.2, p.310-314, 2011.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2006. 120p.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acessado em: 10/04/2016.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. (2007). Meliponini Lepeletier, 1836. In J.S. Moure; D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs.), **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** (pp. 272-578). Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P; MACORINI, L. F. B.; MELO, A. M. M. F; JOSÉ BALESTIERI, B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, 65, 374–380, 2014.

CARDOZO, D. V.; MOKOCHINSKI, J. B.; SCHINEIDER, C. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, 7, 6, 2456-2474, 2015.

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

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia

Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Química**, v.2, n. 1, p.47-58, 2010.

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

CUNHA, M.S. **Bios prospecção antitumoral de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA; 2013.

DA CUNHA, M.G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L.C.C.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; ROSALEN, L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.13, n.23, 2013.

DA CUNHA, M. G.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. DE; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. A. Antiproliferative constituents of geoprópolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, 82,190–194, 2016.

DE SOUSA, D. M. N.; OLINDA, R. G.; MARTINS, C. G; ABRANTES, M. R; COELHO, W. A. C.; DA SILVA, J. B. A.; DE MORAIS, S. M; BATISTA, J. S. Prospecção fitoquímica, toxicidade *in vitro* e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, 9, 2, 134-140, 2015.

DORIA, G.A.A. **Avaliação da atividade antitumoral da *Remirea maritima***. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, 178p., 2015.

DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M. C.; MARQUES, R. R. O.; COSTA, M. C. P; RIBEIRO, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18, 4, 557-562, 2008.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; BATISTA, M. C. A; SANTOS, J. R.; CUNHA, M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; TORRES, L. M. B.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M.. Chemical composition of *Melipona fasciculata* Smith geoprópolis produced in the savana of the state of Maranhao, Brazil. In: APIMONDEA, Argentina. Anais... Buenos Aires, CD-ROM, 2011.

DUTRA, R. P. **Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith como insumo na geração de produtos leishmanicidas.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

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

FABICHAK, I. **Abelhas indígenas sem ferrão Jataí.** São Paulo: Nobel, 1989.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology**, 143, 709–715, 2012.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M. H.; CUNHA, T. M.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M; ROSALEN, P. L. Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: Involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 1-9, 2013.

GARCÍA, V.; GONZÁLEZ-MOLES, M. A.; MARTÍNEZ, B. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. **Avances en odontoestomatología**, v. 21, n. 6, p. 287-295, 2005.

GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.46, p.111-121, 1991.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p.894-901, 2008.

HASAN, A.E.Z.; MANGUNWIDJAJA, D.; SUNARTI, T.C.; SUPARNO, O.; SETIYONO, A. Investigating the antioxidant and anticytotoxic activities of propolis collected from five regions of Indonesia and their abilities to induce apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.5, p.390-398, 2014.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. [Acessado em 16 de agosto de 2016]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1.

JEMAL, A.; CENTER, M. M.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 19, p. 1893-1907, 2010.

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

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; **ROBBINS & COTRAN – Pathology Basis of Disease**, 7a. ed., WB Saunders: China, 2004.

LAURINO, M. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; AGUILAR, I. B.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA NETO, P. Global Meliponiculture: Challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, p. 275-292, 2006.

LEVY, I. **Abelhas sem ferrão podem proteger Mata Atlântica**. Ciência Hoje online, 2004.

LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAUJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO, V.. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)**, v.11, p.108, 2011a.

LIBÉRIO, S. A.; RIBEIRO, M. N. S.; MONTEIRO-NETO, V.; GUERRA, R. N. M. Composições farmacêuticas e odontológicas à base de geoprópolis e uso dessas composições. **Revista de Propriedade Industrial (RPI)**, v. 2120, PI0905583-5, 2011b.

LOPES, M.; FERREIRA, J.B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v.2, 2005.

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

MANRIQUE, A. J.; SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp.* de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Tropical**, 26, 2, 157-166, 2008.

MARTINS, A. C. L.; RÊGO, M. M. C.; CARREIRA, L. M. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae), **Acta Amazonica**, 41, 2, 183 – 190, 2011.

MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: Vitaminas e aminoácidos. *Revista Brasileira Farmacognia*, v.1, p.12-19, 1986.

MUNIZ, F. H. A vegetação da região de transição entre a Amazônia e o Nordeste, diversidade e estrutura . In: Moura, E. G. (Org.). **Agroambiente de Transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido**: Atributos, Alterações e Uso na Produção Familiar. São Luís: UEMA, 2004, p. 44-60.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

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.

NOGUEIRA-NETO, P. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. São Paulo: Nogueirapes, 445 p.1997.

OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v.25, p.976-984, 2002.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L. F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, L.P.G.; CONTEA, F.L.; CARDOSO, E.O.; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; GOLIM, M.A.; CRUZ, M.T.; SFORCIN, J.M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geoprópolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal Pharm. Pharmacol**, v.68, p.1551-1558, 2016.

ORSOLIĆ, N.; SARANOVIC, A.B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v.72, p. 20–27, 2006.

ORSOLIC, N.; CAR, N.; LISICIC, D.; BENKOVIC, V.; KNEZEVIC, A.H.; DIKIC, D.; PETRIK, J. Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on ehrlich ascites tumor in mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.102, p.4395–4405, 2013.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.2, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.18, p.313-318, 1998.

PEDRO, S.R.M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae) **Sociobiology**, v.61, n.4, p.348-354, 2014.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; ZUMÁRRAGA, A. D. C.; SAURI, E. Volative constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatán. **Journal of Essential Oil Research**, 18, 53-56, 2006.

RÊGO, M.C.; ALBUQUERQUE, P.M.C.; VENTURIERI, G.C. **Menos locais para ninhos.** *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, 50-51, 25 abr. 2008.

ROCHA, L.; DOS SANTOS, L.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A. SHARAPIN, N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira Farmacognia**, v.13, p.71-74, 2003.

SANTOS, I.A. de. A vida de uma abelha solitária. **Ciência Hoje**, v.179, p.42-54, 2002.

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.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. 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.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.C.; MARCUCCI, M.C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v.5, p.1-10, 2011.

SHARMA, M.; AGRAWAL, S.K.; SHARMA, P.R.; CHADHA, B. S.; KHOSLA, M. K. ; SAXENA, A. K. Cytotoxic and apoptotic activity of essential oil from *Ocimum viride* towards COLO 205 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 336 - 344, 2010.

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

SILVEIRA, F. A; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002, 253p.

SMITH, J.A.; NGO, H.; MARTIN, M.C.; WOLF, J.K. Evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. **Gynecologic Oncology**.v.98, p.141-145, 2005.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognia**,v.17, p.85-93, 2007.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.; ALVES, R.M.O.; DIAS, C.S.; CLARTON, L. **Mundurí (*Melipona asilvai*): a abelha sestroza**. Série Meliponicultura, Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, v.46, 2009.

SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 1-5, 2013.

SUGGIT, M.; BIBBY, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to targetdriven approaches. **Clinical Cancer Research**. v.11, p.971-981, 2005.

SUTANDYO, N. Nutritional Carcinogenesis. **Nutritional Carcinogenesis**, v. 42, n. 1, p. 36-

42, 2010.

TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v.5, p.203-209, 2013.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F. TOMAS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical from Venezuela. **Phytochemistry**, 34, 191-196, 1993.

TORRES-GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ-RIVERA, P.; DUARTE-LISCI, G.; LÓPEZ-RAMÍREZ, Á.; CORREA-BENÍTEZ, A.; RIVERO-CRUZ, J. F. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. **Natural product research**, 30, 2, 237-240, 2016.

UMTHONG, S.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.37, n.5, p.855–865, 2009.

UMTHONG, S.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; CHANCHAO, C. *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, 37, 2011.

VILLA-BÓAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem ferrão**, 1 ed. Brasília, DF, 100 p., 2012.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Chemical composition and biological activity of propolis from brazilian meliponinae. **Zeitschrift für Naturforschung**, 55c, 785 – 789, 2000a.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurene from brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, 71, 693 – 696, 2000b.

VELTHUIS, H.H.W.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; PEREBOM, Z.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. The conservative egg of the genus *Melipona* and its consequence for speciation. In: G.A.R. Melo; I. A dos Santos. **Apoidea Neotropical: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma 2003; 171-176

WONG, Y.; CHEN, R.; CHEN, B. Core and specific network marks of carcinogenesis from multiple cancer samples. **Journal of Theoretical Biology**, v.362, p.17-34, 2014.

ANEXO

Submissão de artigo científico

De: "Journal of Agricultural and Food Chemistry"

<onbehalfof+support+services.acs.org@manuscriptcentral.com>

Para: "MARIA NILCE DE SOUSA RIBEIRO" <mnribeiro@ufma.br>, richardutra@oi.com.br

Cc: hofmann-office@jafc.acs.org

Enviadas: Terça-feira, 14 de março de 2017 11:56:02

Assunto: Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2017-01156s

14-Mar-2017

RE: Manuscript Submission Successfully Submitted

Journal:Journal of Agricultural and Food Chemistry

Manuscript ID: jf-2017-01156s

Title: "Antitumor activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith"

Authors: Ribeiro, Maria Nilce; Cunha, Mayara; Assunção, Anne Karine; Fialho, Eder ; Batista, Marisa; de Mesquita, Ludmilla ; de Mesquita, José Wilson ; Dutra, Richard ; Nascimento, Flavia

Bioactive Constituents, Metabolites, and Functions

Dear Dr. Ribeiro:

Your manuscript has been successfully submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry.

You will be receiving an email shortly informing you of the Assigned Editor for this manuscript, along with contact information for that editor.

Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus at <https://acs.manuscriptcentral.com/acs> and select "Edit Your Account" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <https://acs.manuscriptcentral.com/acs>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Sincerely,

Journal of Agricultural and Food Chemistry Editorial Office

PLEASE NOTE: This email message, including any attachments, contains confidential information related to peer review and is intended solely for the personal use of the recipient(s) named above. No part of this communication or any related attachments may be shared with or disclosed to any third party or organization without the explicit prior written consent of the journal Editor and ACS. If the reader of this message is not the intended recipient or is not responsible for delivering it to the intended recipient, you have received this communication in error. Please notify the sender immediately by e-mail, and delete the original message. Thank you.

Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* SmithRichard Pereira Dutra,^{†,‡} Bruno Vinicius de Barros Abreu,[‡] Mayara Soares Cunha,[‡] Marisa Cristina Aranha Batista,[‡] Luce Maria Brandão Torres,[§] Flavia Raquel Fernandes Nascimento,[†] Maria Nilce Sousa Ribeiro,^{*‡} and Rosane Nassar Meireles Guerra[†][†]Laboratório de Imunofisiologia and [‡]Laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses 1966, 65085-580 São Luís, Maranhão, Brazil[§]Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Botânica de São Paulo, Av. Miguel Estéfano 3687, Água Funda, 04301-012 São Paulo, São Paulo, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: Geopropolis is a mixture of plant resins, waxes, and soil produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. This paper describes the antioxidant activity and chemical composition of geopropolis produced by *M. fasciculata*. The total phenolic content determined with the Folin–Ciocalteu reagent was highest in the ethyl acetate fraction and hydroalcoholic extract. Antioxidant activity was assayed by the in vitro DPPH, ABTS, and FRAP assays. The hydroalcoholic extract and fractions of geopropolis, except for the hexane fraction, exhibited antioxidant activity against DPPH, ABTS, and FRAP. The phenolic compounds were identified by HPLC–DAD–MS on the basis of the evaluation of their UV–vis absorption maxima (λ_{max}) and mass spectral analysis. Eleven compounds belonging to the classes of phenolic acids and hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) were tentatively identified. These compounds are responsible for the antioxidant activity and high phenolic content of geopropolis produced by *M. fasciculata*.

KEYWORDS: *geopropolis*, *Melipona fasciculata*, phenolic compounds, hydrolyzable tannins, antioxidant activity, HPLC–DAD–ESI–MS

INTRODUCTION

The products of stingless bees, such as geopropolis, are important sources of bioactive compounds. Geopropolis is produced by some stingless bee species of the genus *Melipona* from a mixture of vegetable resins, saliva secretions, wax, and soil. Bees store large deposits of this material inside their hives, where it is used to close small cracks, to prevent the entry of air, and as an antimicrobial agent.¹

Geopropolis produced by *Melipona scutellaris* collected in the state of Bahia, northeastern Brazil, has been shown to exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, as well as antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive, and antiproliferative properties.^{2,3} Benzophenones have been identified as the major compounds of this geopropolis, but no flavonoids were detected.³ Such compounds were detected in *Melipona compressipes*.⁴

In recent years, studies investigating the geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in different regions of the Brazilian state of Maranhão have demonstrated high concentrations of polyphenols, flavonoids, triterpenoids, and saponins.^{5–7} This geopropolis exhibits antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* biofilms, as well as immunomodulatory properties.^{8,9}

Phenolic compounds exhibit a wide variety of biological properties such as anticancer, anti-allergic, antiatherogenic, antihepatotoxic, anti-inflammatory, antimicrobial, antithrombotic, cardioprotective, anti-HIV replication, vasodilatory, and antioxidant activities. The beneficial effects of phenolic

compounds have been attributed to their antioxidant activity.^{10,11} In a study on *Apis mellifera*, the polyphenolic composition of propolis was correlated with its antioxidant properties.¹² Phenolic compounds have been the focus of interest because of their antioxidant and chemopreventive properties. Particularly, polyphenols seem to be responsible for human health benefits.¹³

Reactive oxygen species and reactive nitrogen species, including free radicals such as superoxide radical anion, hydroxyl radicals, singlet oxygen, hydrogen peroxide, and nitric oxide, are continuously produced in human cells. Reactive oxygen species and free radical-induced reactions have been associated with degenerative or pathological events such as aging, cancer, heart dysfunction, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, hemorrhagic shock, cardiovascular disorders, cystic fibrosis, metabolic disorders, neurodegenerative diseases, gastric ulcerogenesis, and AIDS.^{14,15}

The objective of the present study was to determine the antioxidant activity and chemical composition of geopropolis produced by *Melipona fasciculata*.

Received: November 6, 2013

Revised: February 26, 2014

Accepted: February 27, 2014

Published: February 27, 2014

Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil

Marisa Cristina Aranha BATISTA¹; Bruno Vinicius de Barros ABREU¹; Richard Pereira DUTRA¹; Mayara Soares CUNHA¹; Flavia Maria Mendonça do AMARAL¹; Luce Maria Brandão TORRES²; Maria Nilce de Sousa RIBEIRO^{1*}

¹ Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Avenida dos Portugueses 1966, Campus Bacanga, 65080-805, São Luís-Maranhão, Brazil.

² Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Fitologia e Biogênica, Av. Miguel Stéfano 3687, Água Funda, 04801-9012, São Paulo, São Paulo, Brazil

* Corresponding author: mnrbeiro@ufma.br

ABSTRACT

Geopropolis, a mixture of plant resin, wax, soil and salivary secretion, is produced by the stingless bee *Melipona fasciculata*. This aim of this study was to investigate the chemical composition and antioxidant activity of geopropolis collected from beehives in two phytogeographical regions, flooded fields and cerrado, in the municipalities of Palmeirândia and Fernando Falcão, Maranhão State, northeastern Brazil. The geopropolis compounds were identified by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). Additionally, total phenolic content was determined with the Folin–Ciocalteu reagent and antioxidant activity was evaluated *in vitro* by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The four geopropolis samples varied in terms of total phenolic content and antioxidant activity and the highest values were observed for geopropolis from Fernando Falcão. Triterpenes such as cycloartane, ursane and oleanane and phenolic acids (protocatechuic acid and gallic acid) were identified in the geopropolis from Palmeirândia, while the phenolic acids, gallic and ellagic acid were the main compounds in geopropolis from Fernando Falcão. The antioxidant property of geopropolis is due to its high total phenolic content and predominance of gallic acid and ellagic acid. The results showed that the plant resources in two phytogeographical regions of Maranhão used by bees for the production of geopropolis contribute to the chemical composition and bioactivity of this product.

KEYWORDS: stingless bee, polyphenols, triterpenes, phytogeographical regions.

Composição química e atividade antioxidante da geoprópolis de *Melipona fasciculata* (Meliponinae) produzida em áreas de campos alagados e de cerrado no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil

RESUMO

Geoprópolis, uma mistura de resinas vegetais, cera, terra e secreção salivar, produzida pela abelha sem ferrão *Melipona fasciculata*. Este estudo investigou a composição química e a atividade antioxidante da geoprópolis coletada em colmeias em duas regiões fitogeográficas de campos alagados e de cerrado, nos municípios de Palmeirândia e Fernando Falcão, no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil. Os compostos da geoprópolis foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Foram determinados os teores de fenólicos totais pelo reagente de Folin–Ciocalteu, e atividade antioxidante utilizando o ensaio *in vitro* com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e capacidade redutora do ferro (FRAP). As quatro amostras de geoprópolis apresentaram variações no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, as geoprópolis de Fernando Falcão, apresentaram maiores teores. Nas geoprópolis do município de Palmeirândia foram identificados, triterpenos do tipo cicloartano, ursano e oleanano e ácidos fenólicos (ácido protocatecuico e ácido gálico), enquanto que na geoprópolis de Fernando Falcão, ácidos fenólicos, ácido gálico e elágico foram os principais constituintes. A propriedade antioxidante da geoprópolis pode ser atribuída aos altos teores de fenólicos totais e de ácido gálico e elágico. Os resultados demonstram que as fontes vegetais das duas regiões fitogeográficas do Maranhão, Brasil, utilizadas pelas abelhas para a produção da geoprópolis contribuem para a composição química e bioatividade deste produto.

PALAVRAS-CHAVE: abelhas sem ferrão, polifenóis, triterpenos, regiões fitogeográficas.

Scope • Policy • Instructions for Authors

(Revised July 2016)

„Contents (click on the topic)

1. Submission of Manuscripts | 2. Journal Scope | 3. Journal Categories | 4. Manuscript Types | 5. Ethics, Conflict of Interest | 6. Author List and ORCID iD | 7. Editorial Peer Review Process | 8. Manuscript Preparation – Title and Authorship – Abstract and Keywords – Introduction – Materials and Methods – Results and Discussion – Abbreviations and Nomenclature – Acknowledgment – References – Tables and Artwork – Table of Contents Graphics – Supporting Information – Currently Acceptable Word-Processing Packages – Word-Processing Details | 9. Revisions and Resubmissions | 10. Journal Publishing Agreement | 11. Proofs and Reprints | 12. Reporting Specific Data

1. IMPORTANT MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS

Manuscripts and revised manuscripts must be submitted via the ACS Paragon Plus Web site (<http://paragonplus.acs.org/login>). E-mailed submissions and hardcopy submissions will not be processed. An overview of and complete instructions for the Web submission process are available at the ACS Paragon Plus Web site.

When submitting, please be aware of the following requirements:

- All manuscripts must be accompanied by a cover letter that includes an **explicit statement on the manuscript's significance** (not a summary of the abstract), including its originality, its contribution to new knowledge in the field, and its relevance to research in agricultural and food chemistry.
- All coauthors listed on the title page of the manuscript must be entered into the Paragon Plus System at step 2 in the manuscript submission process. Only one corresponding author is allowed for each manuscript in Paragon Plus. Additional corresponding authors may be designated on the manuscript title page. Use of the phrase “all authors contributed equally” is discouraged. Instead, statements about author contributions should identify the specific aspect of the author's contribution.

8. MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscript Format. Manuscripts must be prepared using accepted word-processing software, and all parts must be double-spaced. All pages must be numbered consecutively starting with the title page and including tables and figures. Lines in the abstract and text should be numbered consecutively from beginning to end in a separate column at the left. Do not put line numbers on pages with tables or figures. A standard font, in a size of 12 points or greater, must be used. The *Journal* has a 20 typed page limit, not including references, tables, and figures. Authors must request approval from the Editor in Chief to submit manuscripts exceeding 20 typed pages.

Standard American English usage is required. Authors who are not familiar with standard American English are urged to seek assistance; deficiencies in grammar may be a serious hindrance during the review process.

Assistance with Improving Your Manuscript. Authors may want professional assistance with improving the English, figures, or formatting in their manuscript before submission. ACS ChemWorx Authoring Services can save you time and improve the communication of research in your manuscript. You can learn more about the services offered at <http://es.acschemworx.acs.org>.

The ACS Style Guide (3rd ed., 2006; ISBN 0-8412-3999-1), available from Oxford University Press, Order Department, 201 Evans Road, Cary, NC 27513, provides a detailed treatment of the fundamentals of manuscript preparation. Refer to a current issue of the *Journal* for general style.

The style guide is also available at the *Journal's* Web site and through ACS ChemWorx.

The various sections of the manuscript should be assembled in the following sequence:

- Title and authorship (single page)
- Abstract and keywords (single page)
- Introduction
- Materials and Methods (including Safety information)
- Results/Discussion
- Abbreviations Used
- Acknowledgment
- Supporting Information description
- References
- Figure captions
- Tables
- Figure graphics
- Graphic for table of contents

TITLE, AUTHORSHIP, AND KEYWORDS

The title, authorship, and institutional affiliations should be included on a single page.

Title. The title should be specific, informative, and concise. Keywords in the title assist in effective literature retrieval. If a plant is referred to in the title or elsewhere in the text by its common or trivial name, it should be identified by its scientific name in parentheses immediately following its first occurrence. This term should also be provided as one of the keywords. If trade names are mentioned, give generic names in parentheses.

Authorship. Be consistent in authorship designation on the manuscript and on all correspondence. **First name, middle initial, and last name** are generally adequate for correct identification, but omit titles. Give the complete mailing address of all institutions where work was conducted and identify the affiliation of each author. If the current address of an author is different, include it in a footnote on the title page. The name of the author to whom inquiries about the paper should be addressed must be marked with an asterisk; provide the telephone and e-mail address of this correspondent.

Keywords. Provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval. The keywords are published immediately before the text, following the abstract.

ABSTRACT

Authors' abstracts are used directly for *Chemical Abstracts*. The abstract should be a clear, concise (100–150 words), one-paragraph summary, informative rather than descriptive, giving scope and purpose, experimental approach, significant results, and major conclusions. Write for literature searchers as well as journal readers.

INTRODUCTION

Discuss relationships of the study to previously published work, but do not reiterate or attempt to provide a complete literature survey. Use of *Chemical Abstracts/Scifinder* and other appropriate databases is encouraged to ensure that important prior publications or patents are cited and that the manuscript does not duplicate previously published work. **The purpose or reason for the research being reported, and its significance, originality, or contribution to new knowledge in the field, should be clearly and concisely stated. Current findings should not be included or summarized in this section.**

MATERIALS AND METHODS

Authors are required to call special attention in their manuscripts to safety considerations such as explosive tendencies, special precautionary handling procedures, and toxicity.

Apparatus, reagents, and biological materials used in the study should be incorporated into a general section. List devices of a specialized nature or instruments that may vary in performance, such that the model used may affect the quality of the data obtained (e.g., spectroscopic resolution).

List and describe preparation of special reagents only. Reagents normally found in the laboratory and preparations described in standard handbooks or texts should not be listed.

Specify the source, vendor [city and state (or city and country if non-U.S.)], and availability of special equipment, reagents, kits, etc. Do not include catalog numbers.

Biological materials should be identified by scientific name (genus, species, authority, and family) and cultivar, if appropriate, together with the site from which the samples were obtained. Specimens obtained from a natural habitat should be preserved by deposit of samples in a herbarium for plants or in a culture collection for microorganisms, with a corresponding collection or strain number listed.

Manuscripts describing studies in which live animals or human subjects are used must include a statement that such experiments were performed in compliance with the appropriate laws and institutional guidelines and also name the institutional committee that approved the experiments. Authors are encouraged to note the approval code or number or give the

name of the approving office or official. (See Reporting Specific Data: Animal or Human Studies.) Manuscripts reporting data from inhumane treatment of experimental animals will be rejected.

Specific experimental methods should be sufficiently detailed for others to repeat the experiments unequivocally. Omit details of procedures that are common knowledge to those in the field. Brief highlights of published procedures may be included, but details must be left to the References, and verbatim repeat of previously published methods, even if done by the authors, will not be permitted unless a quotation from a published work is included, and placed in quotation marks, with the reference to the source included at the end of the quotation. Describe pertinent and critical factors involved in reactions so the method can be reproduced, but avoid excessive description. For information on the reporting of certain types of data see Reporting Specific Data.

Describe statistical design and methods in this section.

RESULTS AND DISCUSSION

Results and discussion may be presented in separate sections or combined into a single section, whichever format conveys the results in the most lucid fashion without redundancy. Be complete but concise in discussing findings, comparing results with previous work and proposing explanations for the results observed.

All data must be accompanied by appropriate statistical analyses, including complete information on sampling, replication, and how the statistical method employed was chosen.

Avoid comparisons or contrasts that are not pertinent, and avoid speculation unsupported by the data obtained.

A separate summary or conclusion section is not to be used; any **concluding statements** are to be incorporated under Results and Discussion.

ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE

Standard abbreviations, without periods, should be used throughout the manuscript.

Refer to [The ACS Style Guide](#) for the preferred forms of commonly used abbreviations. Specialized abbreviations may be used provided they are placed in parentheses after the word(s) for which they are to substitute at first point of use and are again defined in this section. Avoid trivial names and "code" abbreviations (e.g., NAR for naringenin) unless such codes are in common usage (e.g., MTBE for methyl *tert*-butyl ether).

If trade names are used, define at point of first use. If nomenclature is specialized, include a "Nomenclature" section at the end of the paper, giving definitions and dimensions for all terms. Use SI units insofar as possible. Refer to [The ACS Style Guide](#) for lists of SI units and a discussion of their use.

Write all equations and formulas clearly and number equations consecutively. Place superscripts and subscripts accurately; avoid superscripts that may be confused with exponents. Identify typed letters and numbers that might be misinterpreted, such as "oh" for zero or "ell" for one. Chemistry numbering requiring primes should be identified as such (i.e., 3,3'-dihydroxy-), not by an apostrophe (e.g., 3,3'-dihydroxy-).

It is the authors' responsibility to provide correct nomenclature. Structures should be included for uncommon chemicals, particularly when the systematic or common name is too complex or

unclear to readily denote the structure. Such structures should be included as a figure or table. All nomenclature must be consistent and unambiguous and should conform to current American usage. Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service, the International Union of Pure and Applied Chemistry, and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Chemical Abstracts* (CA) nomenclature rules are described in Appendix IV of the *Chemical Abstracts Index Guide*. For CA nomenclature advice, consult the Manager of Nomenclature Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012. A name generation service is available for a fee through CAS Client Services, 2540 Olentangy River Road, P.O. Box 3343, Columbus, OH 43210-0334 [telephone (614) 447-3870; fax (614) 447-3747; e-mail answers@cas.org]. In addition, the ACS Web site has links to nomenclature recommendations at <http://chemistry.org>.

ACKNOWLEDGMENT

Include essential credits but hold to an absolute minimum. Omit academic and social titles. Meeting presentation data and acknowledgment of financial support of the work should not be included here; give these instead in a note following the References. It is the responsibility of the corresponding author to notify individuals named in the Acknowledgment prior to submission.

FUNDING SOURCES

When submitting a manuscript to the Journal via ACS Paragon Plus, the submitting author is asked to identify the funding sources for the work presented in the manuscript. Identifying funding sources is optional during submission of an original manuscript. Funding source information is required when a revised manuscript is submitted. Funding should be acknowledged in a separate statement (not in the Acknowledgment paragraph).

REFERENCES

Consult [The ACS Style Guide](#) and current issues of the *Journal* for examples of reference format.

Authors should cite all prior published work directly pertinent to the manuscript. To demonstrate that the submitted manuscript meets sufficient interest of the readership of the journal, it is expected that articles recently published on the respective topic in the *Journal of Agricultural and Food Chemistry* be cited to a reasonable extent. As a general guideline, authors should attempt to limit the literature cited to approximately 50 or fewer citations (except for review or perspective manuscripts).

Authors are responsible for the accuracy of their references. References taken from a review or other secondary source should be checked for accuracy with the primary source.

References should be listed on a separate page and numbered in the order in which they are cited in the text.

References should be cited in the text by superscript numbers, for example, ^{1,2-5}, etc.

Give complete information, using the last name and initials of the author, patentee, or equivalent; do not use "Anonymous".

Follow *Chemical Abstracts Service Source Index* for abbreviations of journal titles. Because subscribers to the Web edition of the *Journal* are now able to click on the "Chemport" or other tag following each reference to retrieve the corresponding abstract from various Web resources, reference accuracy is critical.

Typical references follow the styles given below.

For journals:

1. Brown, J.; Jones, M.; Green, D. Article title. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 1–4.
(Issue number must be used if each issue of the periodical begins with page 1.)

For books:

2. Smith, L.; Caldwell, A. Chapter title. In *Book Title*, edition no.; Keys, F., Park, G., Eds.; Publisher: City, State (or Country if non-U.S.), Year; Vol. no., pp.

For Web pages:

3. Black, A.; White, B. Page title. URL (<http://...>) (most recent access date).

Papers should not depend for their usefulness on unpublished material, and excessive reference to material “in press” is discouraged. Reference to the authors’ own unpublished work is permitted if the subject is of secondary importance to the manuscript in question, but any unpublished results of central importance must be described in sufficient detail within the manuscript. **If pertinent references are “in press” or unpublished for any reason, furnish copies to enable reviewers to evaluate the manuscript. An electronic copy of these materials should be uploaded according to the directions for review-only Supporting Information. “In press” references should include the Digital Object Identifier (DOI) assigned by the potential publisher.**

TABLES AND ARTWORK

The tables and graphics (illustrations) should be inserted in the manuscript file after the References section. Do not upload tables and graphics that are to be published with the manuscript as Supporting Information files.

Tables and figures should be carefully designed to maximize presentation and comprehension of the experimental data with superfluous information excluded. Useful information not directly relevant to the discussion may be included under Supporting Information.

Tables. Tables may be created using a word processor’s text mode or table format feature. The table format feature is preferred. Ensure each data entry is in its own table cell. Lower case should be used for all table entries unless a capital letter is required. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a line feed (enter) at the end of each row.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be grouped after the figure captions. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by row rather than by column. Each table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings, should make the table, as nearly as possible, self-explanatory. In setting up tabulations, authors are requested to keep in mind the type area of the journal page (17.8 × 25.4 cm), and the column width (8.5 cm), and to make tables conform to the limitations of these dimensions. **Arrangements that leave many columns partially filled or that contain much blank space should be avoided.** Conversely, arrangements that include >20 columns should be broken into two tables if possible. *If significance of values is to be indicated, use a lower case letter, on line, one space after the value.*

Figures and Artwork. The preferred submission procedure is to embed graphic files in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible. Artwork should be sequentially numbered using Arabic numbers. Schemes and charts may have titles and footnotes; figures should have captions. Insert the captions following the References and the graphics after the Tables.

Additional acceptable file formats are TIFF, PDF, EPS (vector artwork), or CDX (ChemDraw file). If submitting individual graphic files in addition to their being embedded in a Word document, ensure the files are named according to graphic function (i.e., Scheme 1, Figure 2, Chart 3), not the scientific name. Labeling of all figure parts should be present, and the parts should be assembled into a single graphic. For EPX files, ensure that all fonts are converted to outlines or embedded in the graphic file. The document setting should be in RGB mode. Note: Although EPS files are accepted, the vector-based graphics will be rasterized for production. Please see below for TIFF file production resolutions.

TIFF files (either embedded in a Word document or submitted as individual files) should have the following resolution requirements: black and white line art, 1200 dpi; grayscale art (a monochromatic image containing shades of gray), 600 dpi; color art (RGB color mode), 300 dpi.

The RGB and resolution requirements are essential for producing high-quality graphics within the published paper. Graphics submitted in CMYK or at lower resolution may be used; however, the colors may not be consistent. Graphics of poor quality may not be able to be improved.

Most graphic programs provide an option for changing the resolution when images are saved. Best practice is to save the graphic file at the final resolution and size using the program used to create the graphic.

For bar charts, bars with hatching patterns generally reproduce well. Bars that range in shading from light to dark gray to black can usually be reproduced successfully, although we do not recommend any more than two shades of gray. A legend needs to be included within the figure itself rather than the patterns or shades included in the caption.

For manuscripts containing gel patterns, use of a high-resolution digital scanner is recommended. Only high-quality original, unaltered digital reproductions will allow reviewers to correctly verify the experimental results. For an example of gel patterns see *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (18), 4492–4499 (DOI: [10.1021/jf300563n](https://doi.org/10.1021/jf300563n)).

Only readable and accurately represented images are acceptable; the Editors reserve the option to reject images that do not satisfactorily support points made in the manuscript or that are not of satisfactory quality for publication.

The quality of the illustrations published in the *Journal* largely depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. Contrast is important. Each figure or photograph should be properly labeled.

Graphics should be sized at the final production size when possible. Single-column graphics are preferred and can be sized up to 240 points (3.33 in.). Double-column graphics must be sized between 300 and 504 points (4.167 in. and 7 in.). All graphics have a maximum depth of 660 points (9.167 in.) including the caption (please allow 12 points for each line of caption text). Consistently sizing letters and labels in graphics throughout the manuscript will help to ensure consistent graphic presentation for publication. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density. Avoid the use of very large and very small lettering within the same figure.

If artwork that must be reduced will be submitted, use larger lettering and thicker lines so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned parameters.

Avoid using complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect. To show a pattern, choose a simple crosshatch design.

Color illustrations should be submitted **only** if they are essential for clarity of communication. Reproduction of color illustrations will be provided at no cost to the author. Do not submit color prints to be printed in black and white.

Structural Formulas. Structural formulas should be included for all new chemicals and for existing chemicals for which chemical nomenclature and/or trivial names do not convey the structure adequately. Structural formulas are valuable in expressing concisely the precise nature of the compounds under discussion and revealing the essence of the subject to readers unfamiliar with the topic, without their necessary recourse to reference materials. The use of chemical names without accompanying structures may cause readers to overlook the significance of the paper.

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw. Structure drawing preferences (preset in the ACS Stylesheet in ChemDraw) are as follows:

as drawing settings select...	
chain angle	120°
bond spacing	18% of width
fixed length	14.4 points (0.508 cm, 0.2 in.)
bold width	2.0 points (0.071 cm, 0.0278 in.)
line width	0.6 point (0.021 cm, 0.0084 in.)
margin width	1.6 points (0.056 cm, 0.0222 in.)
hash spacing	2.5 points (0.088 cm, 0.0347 in.)
as text settings select...	
Font	Arial or Helvetica
Size	10 points
under preferences choose...	
Units	points
tolerances	3 pixels
under page setup choose...	
Paper	US Letter
Scale	100%

Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two-column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. Also note that a standard sheet of paper is only 21.6 cm wide, so all graphics submitted in two-column format must be prepared and printed in landscape mode.

Use boldface type for compound numbers but not for atom labels or captions.

Authors using other drawing packages should, as far as possible, modify their program's parameters to reflect the above guidelines.

For more information, please visit <http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/index.html>.

TABLE OF CONTENTS GRAPHICS

Authors of research articles, perspectives, and reviews are required to include a suitable graphic for publication in the **table of contents (TOC)** in the Web edition of the *Journal*. Submission of this graphic is mandatory. This graphic should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript's title, give the reader a quick visual impression of the type of chemistry described. Structures should be constructed as specified under Structural Formulas above. The TOC graphic may be up to 3.25 in. (8.5 cm) wide and 1.75 in. (4.75 cm) tall. (See detailed instructions at the Paragon Plus Web site.) Text should be limited to labels for compounds, reaction arrows, and figures. The use of color to enhance the scientific value is encouraged. The TOC graphic should be inserted on a separate page at the end of the manuscript file. A guide to TOC graphics is available here:

http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/toc_abstract_graphics_guidelines.pdf.

SUPPORTING INFORMATION

Extensive tables, graphs, spectra, calculations, and other material beyond a modest content in the published paper may be included in the Web edition of the *Journal*. These will not be part of the published article but can be accessed separately on the Web by readers.

Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript and uploaded separately to the ACS Paragon Plus environment. A [list of acceptable file types](#) is available on the Web. All Supporting Information files of the same type should be prepared as a single file (rather than submitting a series of files containing individual images or structures). For example, all Supporting Information available as PDF files should be contained in one PDF file.

The material should be described in a paragraph inserted between the Acknowledgment and the References sections, using the following format:

Supporting Information. Brief statement in nonsentence format listing the contents of the material supplied as Supporting Information.

Components of the Supporting Information should be clearly labeled with all necessary figure captions and table titles and footnotes.

DO NOT UPLOAD FIGURES AND TABLES THAT ARE TO BE PUBLISHED IN THE ARTICLE INTO THE SUPPORTING INFORMATION FILE. Figures and tables that will appear in the published article are to be inserted in the manuscript directly after the References section.

CONFLICT OF INTEREST

A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see the [Ethical Guidelines](#)). The statement will be published in the final article. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the article: "The authors declare no competing financial interest."