



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA REDE
BIONORTE**



**BIOPROSPECÇÃO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith
PARA DESCOBERTA DE NOVOS PRODUTOS BIOATIVOS**

JOSIANNE ROCHA BARBOZA

**São Luís-MA
2021**

JOSIANNE ROCHA BARBOZA

**BIOPROSPECÇÃO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith
PARA DESCOBERTA DE NOVOS PRODUTOS BIOATIVOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

São Luís-MA

Dezembro/2021

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

Barboza, Josianne Rocha.

Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith para descoberta de novos produtos bioativos /
Josianne Rocha Barboza. - 2021.

141 f.

Coorientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Orientador(a): Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís -
Ma, 2021.

1. Anti-inflamatória. 2. Antitumoral. 3. Composição
química. 4. Estudos in silico. 5. Geoprópolis. I.
Ribeiro, Maria Nilce de Sousa. II. Rocha, Cláudia
Quintino da. III. Título.

JOSIANNE ROCHA BARBOZA

**BIOPROSPECÇÃO DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith
PARA DESCOBERTA DE NOVOS PRODUTOS BIOATIVOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

Aprovada em / / 2021.

Banca examinadora

Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Flavia Maria Mendonça do Amaral
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Rayanne Rocha Pereira
Universidade da Amazônia

Prof. Dr. Wellyson da Cunha Araújo Firmo
Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho a minha mãe Rita Rocha Barboza (*in memoriam*), grande inspiração da minha vida, que com seu exemplo de mulher e amor incondicional de mãe me ensinou a sonhar e acreditar que todos os nossos desejos podem ser alcançados quando se tem fé e força de vontade.

Mãe, obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e coragem diariamente e permitir a conclusão deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro pelo apoio, correções, ensinamentos e dedicação contribuindo para a realização deste trabalho e por ser um exemplo de profissional e pessoa.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha por contribuir no desenvolvimento deste trabalho, orientando e auxiliando na identificação química dos compostos da geoprópolis.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE pela infra-estrutura proporcionada para que esta pesquisa se concretizasse.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE pelos ensinamentos e contribuições para minha vida acadêmica e profissional.

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

Aos Laboratórios de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão que colaboraram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao meu amado esposo José Cleomacio Felix Ferreira pelo apoio, atenção, paciência e compreensão estando junto comigo em todas as etapas deste trabalho e me incentivando diariamente para eu chegar até aqui.

À todos os meus amigos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho: Francisco Assis, Alberto Lopes, Leticia Prince, José Filho, Marisa Aranha e Katherine Noleto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de doutorado e financiamento do projeto "Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith em linhagens tumorais (Processo CADPROD-05183/17) do EDITAL FAPEMA Nº 026/2017 - APOIO À CADEIA PRODUTIVA DA MELIPONICULTURA E APICULTURA.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Maria Tereza de Calcutá

BARBOZA, Josianne Rocha. **Bioprospecção da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith para descoberta de novos produtos bioativos.** 2021. 144f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

RESUMO

A geoprópolis de *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith possui diversas atividades biológicas como antimicrobiana, leishmanicida, imunomoduladora, cicatrizante, antioxidante, anti-helmíntica e citotóxica. No entanto, há escassez de estudos de ação antitumoral da geoprópolis de *M. fasciculata*. Assim, considerando o potencial farmacológico da geoprópolis e a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o câncer, este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação da atividade antioxidante, anti-inflamatória, toxicidade aguda e antitumoral, bem como a identificação da composição química do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. fasciculata* e ensaio *in silico* para determinação de quais compostos estão associados com a bioatividade. As amostras de geoprópolis foram coletadas nos municípios de Viana e Pinheiro no estado do Maranhão, submetidas à extração para obtenção dos extratos hidroetanólicos da geoprópolis e codificados em EHG_V e EHG_P. Foram avaliados a ação antioxidante (DPPH, ABTS^{•+} e FRAP), o potencial de inibição *in vitro* da atividade da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), toxicidade aguda em *Danio rerio* e atividade antitumoral nas linhagens de câncer de ovário (A2780 e ES2) e pulmão (A549 e H460), através dos ensaios: MTT, para proliferação celular; análise por citometria de fluxo para ciclo celular e western blotting para análise de apoptose por expressão de caspase-3 clivada e PARP clivada. A composição química foi identificada através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, sendo estes compostos utilizados em estudos *in silico*, através da docagem molecular. A partir desses resultados foram elaborados três artigos. No primeiro artigo estão os resultados do perfil químico de EHG_V e EHG_P que demonstraram a presença predominante de compostos das classes saponinas, terpenos e esteroides, além do resultado da toxicidade aguda onde os extratos apresentaram baixa toxicidade e concentração letal acima de 450 µg/mL ao *Danio rerio*. No segundo artigo, os resultados demonstraram que o extrato EHG_V apresentou melhor atividade antioxidante com valores de CI₅₀ nos ensaios DPPH (76,16 ± 1,05 µg/mL), FRAP (2,91 ± 0,12 mmol Fe²⁺/g) e ABTS^{•+} (13,28 ± 0,11 µg/mL) e maior capacidade de inibição para COX-2 (61%) com menos de 5% de inibição de COX-1 a 50 µg/mL, indicando uma maior afinidade com a isoforma envolvida em processos inflamatórios e de carcinogênese. O EHG_V também apresentou maior efeito citotóxico para linhagem A280 de câncer de ovário (GI₅₀:16,92 µg/mL), baixa citotoxicidade para células normais (HUVEC) e indução de apoptose através da ativação de caspase-3 e clivagem de PARP. Ensaios *in silico* demonstram que taninos hidrolisáveis, flavonoides glicosilados e triterpenos identificados em EHG_V podem estar associados às atividades anti-inflamatória e antitumoral. No terceiro artigo, foi apresentado uma revisão integrativa das classes metabólicas com ação antitumoral no câncer de ovário a fim de compreender e discutir os mecanismos de ação envolvidos. Portanto, os resultados obtidos demonstram pela primeira vez que a geoprópolis de *M. fasciculata* tem atividade citotóxica nas linhagens celulares de câncer de ovário e pulmão induzindo apoptose por ativação da caspase-3, com baixa toxicidade as linhagens celulares não malignas, evidenciando o potencial biotecnológico da geoprópolis no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: geoprópolis; antitumoral; apoptose; anti-inflamatória; composição química; estudos *in silico*.

BARBOZA, Josianne Rocha. **Bioprospecting the geopolyis of *Melipona fasciculata* Smith for the discovery of new bioactive products.** 2021. 144f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

ABSTRACT

The geopolyis of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith has several biological activities such as antimicrobial, leishmanicidal, immunomodulatory, wound healing, antioxidant, anthelmintic and cytotoxic. However, there is a scarcity of studies on the antitumor action of *M. fasciculata* geopolyis. Thus, considering the pharmacological potential of geopolyis and the need for new therapeutic alternatives for cancer, this work aimed to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, acute toxicity, antitumor activity, identify the chemical composition of the hydroethanolic extract of geopolyis from *M. fasciculata* and perform *in silico* assay to determine which compounds are associated with bioactivity. The geopolyis samples were collected in the municipalities of Viana and Pinheiro in the state of Maranhão, submitted to extraction to obtain the hydroethanolic extracts of geopolyis and coded as EHGv and EHGP. The antioxidant action (DPPH, ABTS^{•+} e FRAP), the *in vitro* inhibition potential of the cyclooxygenase enzyme activity (COX-1 and COX-2), acute toxicity in *Danio rerio* and antitumor activity in ovarian cancer lines (A2780; ES2) and lung (A549; H460), through the assays were evaluated: MTT, for cell proliferation; flow cytometry analysis for cell cycle and western blotting for apoptosis analysis by expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP. The chemical composition was identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, and these compounds were used *in silico* studies by molecular docking. From these results, three articles were prepared. In the first article are the results of the chemical profile of EHGv and EHGP that showed the predominant presence of compounds of the saponins, terpenes and steroids classes, in addition to the result of acute toxicity where the extracts showed low toxicity and lethal concentration above 450 µg/mL to *Danio rerio*. In the second article, the results showed that the extract EHGv showed better antioxidant activity with IC₅₀ values in DPPH (76.16 ± 1.05 µg/mL), FRAP (2.91 ± 0.12 mmol Fe²⁺/g) and ABTS^{•+} (13.28 ± 0, 11 µg/mL) and higher inhibition capacity for COX-2 (61%) with less than 5% inhibition of COX-1 at 50 µg/mL, indicating a higher affinity for the isoform involved in inflammatory processes and carcinogenesis. EHGv also showed higher cytotoxic effect to ovarian cancer strain A280 (GI₅₀:16.92 µg/mL), low cytotoxicity to normal cells (HUVEC) and induction of apoptosis through caspase-3 activation and PARP cleavage. *In silico* assays demonstrate that hydrolysable tannins, glycosylated flavonoids, and triterpenes identified in EHGv may be associated with anti-inflammatory and antitumor activities. In the third article, an integrative review of metabolic classes with antitumor action in ovarian cancer was presented to better understand and discuss the mechanisms of action involved. Therefore, the results derived from the thesis demonstrate for the first time that the geopolyis of *M. fasciculata* has cytotoxic activity in ovarian and lung cancer cell lines inducing apoptosis by activation of caspase 3, with low toxicity to non-malignant cell lines, highlighting the biotechnological potential of geopolyis in the development of new therapeutic agents.

Keywords: geopolyis; antitumor activity; apoptosis; anti-inflammatory; chemical composition; *in silico* studies.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS ^{•+}	-	2,2'-Azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
Ca	-	Cálcio
CG	-	Cromatografia gasosa
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-ESI-EM/EM	-	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com fonte electrospray
CL	-	Cromatografia líquida
COX	-	Ciclo-oxigenase
Cu	-	Cobre
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DAD	-	Detector de arranjo de diodos
EHGV Viana	-	Extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> -
EHGP Pinheiro	-	Extrato hidroetanólico da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> -
EM/EM	-	Espectro de fragmentação de massa-massa (<i>Tandem-MS</i>)
ESI	-	Ionizador de eletropulverização
Fe	-	Ferro
FRAP	-	Ensaio da capacidade redutora de ferro
HHDP	-	Ácido hexa-hidroxidifênico
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana
IL-2	-	Interleucina 2
IT	-	Armadilha de íons
K	-	Potássio
L	-	Litro
MCF-7	-	Linhagem celular de câncer de mama
Mg	-	Magnésio
Mn	-	Manganês
MTT	-	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium
mTOR	-	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
m/v	-	Relação massa/volume
m/z	-	Relação massa/carga
mL	-	Mililitros

NF- κ B	-	Fator nuclear <i>kappa</i> B
nm	-	Nanometros
P	-	Fósforo
PARP	-	Enzima poli (ADP-ribose) polimerase
RAW	-	Linhagem celular de macrófagos murinos
SISGEN	-	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral - alfa
UV-Vis	-	Ultra violeta e visível
UHPLC-Q-TOF/MS-	-	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução por triplo quadrupolo
Zn	-	Zinco
μ g	-	Microgramas
μ L	-	Microlitros
μ m	-	Micrometros

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. <i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i> Smith	20
Figura 2. Caixa rústica com geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith nas bordas da caixa (A). Geoprópolis de <i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i> Smith (B).....	21
Figura 3. Mapa de distribuição por registros da espécie <i>M. fasciculata</i> no Maranhão.....	22
Figura 4. Características fenotípicas das células neoplásicas.....	29
Figura 5. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	30
Figura 6. Atividade dos agentes antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular.....	36

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cromatograma obtido por CCD de amostras de extratos hidroetanólicos de geopropólis, analisadas após aplicação do revelador químico anisaldeído sulfúrico. 1 = EHGV; 2 = EHGP	54
Figura 2. Cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHGV.....	55
Figura 3: Cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHGP.....	55
Figura 4: Sobreposição dos cromatogramas obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHGV (cor lilás) e EHGP (cor preta).....	56

CAPÍTULO 2

Figure 1. Percentual <i>in vitro</i> inhibition of COX-1 and 2 produced by hydroethanolic geopropolis extract produced by <i>M. fasciculata</i> stingless bee obtained in Viana (EHGV) and Pinheiro (EHGP) cities, Maranhão State, Northeast of Brazil.....	68
--	----

Figure 2. Analysis of morphological changes in A2780 tumor cells treated with EHGv.....	69
Figure 3. Effects of EHGv and EHGP in A549 (A), H460 (B), A2780 (C), ES2 (D) and CDDP in four cancer cell lines at 48h and 72h with statistical results.....	70
Figure 4. Effects of EHGv and EHGP (A) and CDDP (B) in non-tumor cells, HUVEC at 48 h and 72h with statistical results	71
Figure 5. Analysis of effect of EHGv on cell cycle phase distribution and western blot analysis of apoptosis-related proteins in A2780 cells treated with EHGv (15.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CDDP (10 μM) for 48 h.	72
Figure 6. Spatial conformations obtained by molecular docking of corilagin (in green), typhaneoside (in yellow) and β -amyrin (in cyan) on COX-2 active site (A) and conformations of taraxerone (in blue), marsformosanone (in magenta) and β -amyrin (in cyan) on NEMO/IKK β structure (B).....	74
Figure 7. Proposed mechanism of action of EHGv in ovarian cancer cells.....	78

CAPÍTULO 3

Figure 1. Chemical structures of phenolic acids with action on ovarian cancer.....	99
Figure 2. Chemical structures of flavonoids with action on ovarian cancer.....	103
Figure 3. Chemical structures of diterpenes with action on ovarian cancer.....	104
Figure 4. Chemical structures of triterpenes with action on ovarian cancer.....	106
Figure 5. Skeleton of steroidal and triterpenic saponins.....	108
Figure 6. Chemical structures of alkaloids with action on ovarian cancer.....	110
Figure 7. Schematic representation in targeting different signaling pathways by phytochemicals in ovarian cancer.....	114

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Composição química e atividade biológica em geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	26
--	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Avaliação qualitativa e semiquantitativa de constituintes químicos dos extratos hidroetanólicos da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	53
Tabela 2. Ensaio de toxicidade dos extratos frente <i>Danio rerio</i>	57

CAPÍTULO 2

Table 1. Antioxidant activity (DPPH•, FRAP, ABTS ⁺) of hydroethanolic extracts of geopropolis produced by <i>Melipona fasciculata</i> Smith.....	67
Table 2. Cell growth inhibition (GI ₅₀) in µg/mL of EHGP and EHGTV for inhibition of cell proliferation in cancer cell lines (A2780, ES2, A549, H460) and normal cells (HUVEC).....	71
Table 3. Compounds identified in the hydroethanolic extract of geopropolis produced by <i>M. fasciculata</i> stingless bee from Viana city, Maranhão State, Brazil by LC–ESI/IT–MS/MS....	73
Table 4. Compounds identified in the hydroethanolic extract of geopropolis produced by <i>M. fasciculata</i> stingless bee from Pinheiro city, Maranhão State, Brazil by LC–ESI/IT–MS/MS.....	73
Table 5. Free-binding energies obtained by molecular docking of the compounds identified in EGHV.....	74

CAPÍTULO 3

Table 1. Literature data concerning phytochemicals with antitumor activity in ovarian cancer cell lines.....	89
---	----

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ABELHAS SEM FERRÃO E O GÊNERO <i>MELIPONA</i>	18
2.1.1 <i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i> Smith	20
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA GEOPRÓPOLIS	22
2.2.1 Composição química e atividade biológica da geopropolis de <i>M. fasciculata</i> ..	25
2.3 CÂNCER	28
2.3.1 Câncer de ovário	31
2.3.2 Câncer de pulmão	33
2.4 TRATAMENTOS USUAIS NO CÂNCER	35
2.5 PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL USADOS NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER	38
2.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GEOPRÓPOLIS DE <i>M. FASCICULATA</i>	40
3. OBJETIVOS	42
3.1 GERAL	42
3.2 ESPECÍFICOS	42
4. JUSTIFICATIVA	43
5. RESULTADOS	45
5.1 CAPÍTULO 1	46
5.2 CAPÍTULO 2	61
5.3 CAPÍTULO 3.....	84
6. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS	140

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença invasiva que representa um grave problema de saúde pública. Estima-se que, nas próximas décadas, o seu impacto na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (BRAY et al., 2019).

Apesar dos notáveis avanços no tratamento observado recentemente, sabe-se que são altas as taxas de morbidade e mortalidade, sendo a segunda maior causa de morte da população em muitos países (SUNG et al., 2021).

A mais recente estimativa mundial, ano 2020, demonstrou a ocorrência de 19,3 milhões de casos novos de câncer e 9,6 milhões de óbitos, sendo o câncer de pulmão o mais incidente no mundo (2,2 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,2 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,4 milhão) (HENLEY et al., 2020; SUNG et al., 2021).

No Brasil, estima-se que no triênio 2020-2022 ocorrerão 625 mil novos casos de câncer, sendo os tipos de câncer mais incidentes os de mama, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago. A distribuição da incidência por região geográfica mostra que a região Sudeste concentra mais de 60%, seguida pelas regiões, Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%) (BRASIL, 2019).

No estado do Maranhão, destaca-se nas mulheres a incidência dos cânceres de mama, colo do útero, tireoide e ovário, sendo este último a quarta neoplasia feminina mais frequente. Nos homens, os tipos de câncer mais incidentes são respectivamente o câncer de próstata, estômago, cólon e reto, traqueia, brônquio e pulmão (BRASIL, 2019).

Desta forma, considerando a relevância epidemiológica do câncer, há necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas, uma vez que os tratamentos existentes apresentam alta toxicidade inibindo o crescimento ou matando no organismo as células malignas, mas também as células saudáveis, além de tornarem-se ineficazes devido ao aumento da resistência às drogas anticâncer clássicas (GOTTESMAN et al, 2016; SUN et al., 2019).

Assim, os produtos naturais têm sido alvos de investigações e são fontes promissoras, contribuindo com 75% dos fármacos anticânceres introduzidos na terapêutica nas últimas décadas, dados que estes podem apresentar múltiplos alvos celulares, perfil de seletividade para células cancerosas e a redução dos efeitos adversos indesejados (MORAES et al, 2017; NEWMAN; GRAGG, 2020).

Neste contexto, o uso de produtos naturais, como os produtos derivados de abelhas sem ferrão podem ser promissores na busca de novas moléculas e/ou alternativas coadjuvantes na terapia do câncer, visto que diversos estudos apresentam atividade

antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral da própolis e geoprópolis demonstrando seu potencial no tratamento do câncer (LAVINAS et al., 2019; AL-HATAMLEH et al., 2020; NAINU et al., 2021; CAMPOS et al., 2021).

A Meliponicultura, cultivo das abelhas sem ferrão e sua exploração racional, vem sendo desenvolvida em diversas regiões do Brasil principalmente nas regiões Norte e Nordeste, pelas populações indígenas e rurais (LAURINO et al. 2006; SFORCIN, 2017). No estado do Maranhão, destaca-se a espécie *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), vulgarmente conhecida como tiúba ou tiúba do Maranhão cujo cultivo para produção de mel é uma das fontes de renda para várias famílias das regiões da Baixada e Cerrado maranhense (ALBUQUERQUE et al., 2013). No entanto, além do mel, a espécie produz cera, pólen e geoprópolis que possuem promissor potencial biotecnológico (POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019).

A geoprópolis produzida a partir da mistura de resinas vegetais, pólen, cera, secreções salivares e terra e/ou barro é usada na colmeia como material asséptico, na defesa contra invasores, para vedar entradas de ventilação excessiva, embalsamar insetos, ou para reforço das paredes naturais do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Estudos realizados pelo grupo de pesquisa em Produtos Naturais da UFMA vêm demonstrando que a geoprópolis de *M. fasciculata* de diferentes localidades do estado do Maranhão apresenta em sua composição química ácidos fenólicos, flavonoides (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2008; BATISTA, 2008), taninos hidrolisáveis (DUTRA et al., 2014), triterpenos, esteroides e saponinas (BATISTA et al, 2016; ARAUJO et al, 2015; CUNHA, 2017), ácidos graxos (CUNHA, 2013; SILVA et al., 2013, BATISTA et al, 2016) e benzofenonas (CUNHA, 2017) os quais estão relacionadas com as atividades biológicas como antimicrobiana (DUAILIBE et al., 2007; LIBÉRIO et al., 2011; BR PI 0905583-5 A2), imunomoduladora (LIBÉRIO et al., 2011; ARAÚJO et al, 2015), anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (BR PI 1102701-0 A2), citotóxica (CANTANHEDE et al., 2007), antioxidante (BATISTA, 2016; SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; DUTRA et al., 2014; BATISTA et al, 2016; CUNHA, 2017), leishmanicida (DUTRA, 2012; BR PI 1103291-0 A2; DUTRA et al, 2019), anti-helmíntica (BATISTA, 2016; BR PI 10 2016 002463 3), além de antitumoral (ASSUNÇÃO, 2011; CUNHA, 2017).

No Brasil e outros países, estudos científicos da geoprópolis de abelhas sem ferrão em células tumorais têm sido intensificados demonstrando seu potencial farmacológico (UMTHONG et al., 2011; BORGES et al, 2011; BONAMIGO et al., 2017). Campos e colaboradores (2014) demonstraram a citotoxicidade do extrato etanólico da geoprópolis de

Melipona orbignyi (Guérin, 1844) (abelha cultivada no Mato Grosso do Sul) sobre células eritroleucêmicas K562, reduzindo 83% da viabilidade celular, através da morte celular por necrose das células neoplásicas.

A citotoxicidade também foi avaliada na fração hexânica do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* Latrelle cultivada no estado da Bahia que demonstrou ser citotóxica em 08 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), sendo as substâncias da classe das benzofenonas possivelmente responsáveis pela bioatividade (CUNHA et al, 2013; DA CUNHA et al, 2016).

Bartolomeu e colaboradores (2016) avaliaram a combinação de extratos da geoprópolis de *M. fasciculata* com as drogas carboplatina, metotrexato e doxorrubicina em células de carcinoma epidermoide da laringe humano (Hep-2) e demonstraram que os extratos da geoprópolis isolados ou em associação com os antineoplásicos inibiram a proliferação e migração celular induzindo apoptose.

Oliveira e colaboradores (2016; 2019) investigaram se o agente quimioterápico doxorrubicina em combinação com extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. fasciculata* poderia afetar células imunes não tumorais, avaliando seus efeitos citotóxico em linhagem monocíticas de leucemia humana e efeito imunomoduladores em monócitos humanos.

Diante do exposto, considerando o crescente número de casos de câncer e a necessidade de novas alternativas terapêuticas, bem como o potencial farmacológico de produtos das abelhas sem ferrão, este estudo tem por objetivo avaliar a atividade antitumoral em linhagem celular de câncer de ovário e pulmão, ação anti-inflamatória, antioxidante, toxicidade aguda e identificar a composição química da geoprópolis de *M. fasciculata* cultivada no estado do Maranhão visando demonstrar o potencial terapêutico deste produto natural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Abelhas sem ferrão e o gênero *Melipona*

As abelhas da subfamília Apinae (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) são insetos sociais nativos que compõem um grupo complexo e diversificado, com grande número de espécies e variados padrões comportamentais (MICHENER, 2007; VENTURIERI et al., 2012; MICHENER, 2013).

A família Apidae divide-se em 20 tribos, dentre as quais destaca-se a tribo Meliponini, que englobam as abelhas sem ferrão ou meliponíneos, com 32 gêneros, incluindo o gênero *Melipona* e centenas de espécies eussociais distribuídas nas regiões de clima tropical, clima temperado e subtropical (CAMARGO; OLIVEIRA; BERTO, 2017). São conhecidas como abelhas sem ferrão e/ou abelhas indígenas, pois possuem ferrão atrofiado, sendo incapazes de ferroar, e são tradicionalmente cultivadas pelos indígenas e populações rurais (NOGUEIRA-NETO, 1997; LOPES et al., 2007; CAMARGO; PEDRO, 2013; CAMARGO; OLIVEIRA; BERTO, 2017).

As espécies da tribo Meliponini apresentam características como nidificar em ocos de árvores, em fendas de pedras, em cavidades subterrâneas, ou pendurados em galhos, favos sobrepostos horizontalmente, deposição de pólen no mel, e expulsão dos machos da colônia após fecundarem a rainha (CAMARGO, 1970; FABICHAK, 1989, VELTHUS et al., 2003; LEVY, 2004; RÊGO et al, 2008). Suas colônias são comumente compostas por uma rainha, responsável pela postura de ovos, e um grande número de operárias distribuídas em tarefas para a manutenção do ninho, como: cuidados da cria, construção de células e potes, limpeza, guarda, termorregulação, coleta e estoque de recursos (MICHENER, 2007, 2013).

As abelhas do gênero *Melipona*, pertencente a tribo Meliponini, são abelhas maiores, com aspecto robusto, de tamanho médio a grande (variando de 7 a 15 mm), popularmente conhecidas como: uruçus, jandaíras, tiúbas e mandaiaias (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2018).

Os meliponíneos, por apresentarem ferrão atrofiado (vestigial) são incapazes de ferroar, apresentando um comportamento mais dócil que facilitou sua domesticação por indígenas e populações rurais. No entanto, não significa serem incapazes de se defender, pois, criaram mecanismos de defesas, como, a ação de enrolarem-se nos cabelos e pelos do agressor, a construção dos ninhos com entrada estreita, para permitir acesso a poucas abelhas e a capacidade de se camuflarem, como disfarce protetivo. Além disso, a presença de abelhas

guardiãs na passagem e a oclusão da entrada com cera e resina em caso de ameaças são outros mecanismos utilizados (FREITAS, 1999; CAMARGO; OLIVEIRA; BERTO, 2017).

As abelhas sem ferrão promovem a polinização, sendo consideradas polinizadores eficientes devido a sua constância e fidelidade à coleta, sua capacidade de reconhecimento de cor e memorização de odor (MICHENER, 2013; GOSTINSKI et al., 2017). Possuem importância ecológica, social e econômica como agentes polinizadores, visando a manutenção de espécies vegetais, o equilíbrio ecológico nos diferentes ecossistemas, além de contribuírem para a agricultura, por aumentarem sensivelmente a produção de frutos e sementes (SOUZA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Além da importância ecológica, os meliponíneos, apresentam importância econômica e social despertando o interesse do seu cultivo conhecido como Meliponicultura. O interesse na Meliponicultura é justificado pelo uso nutricional e terapêutico dos subprodutos meliponícolas e por contribuir no aumento da renda familiar (KERR et al., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997). É uma atividade que pode ser integrada à vegetação natural, a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto e, em muitos casos, pode contribuir para o aumento da produção agrícola, originando frutos maiores e em maior quantidade, através do serviço de polinização prestada pelas abelhas (VENTURIERI, 2003).

A Meliponicultura no Brasil é o resultado da fusão entre o conhecimento tradicional sobre os recursos naturais dos povos indígenas com a predileção europeia de domesticar animais, cuja cultura foi incorporada pelos colonizadores. Gradativamente, a criação das abelhas nativas se difundiu, tornando-se uma tradição popular principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil pelas populações indígenas e rurais, o que tem contribuído para preservação da biodiversidade (VILLAS-BÔAS, 2018).

No Maranhão, a Meliponicultura vem sendo difundida nos municípios da Baixada e Cerrado Maranhense, não só por ser a abelha social nativa mais comum nessas regiões, mas por também configurar-se como alternativa de renda para várias famílias indígenas e rurais (ALBUQUERQUE et. al., 2013; ROCHA, 2017; GOSTINSKI et al., 2017).

Melipona (Melikerria) fasciculata Smith, conhecida como tíuba, é a principal espécie cultivada no Maranhão, que desperta atenção em razão de ser uma espécie de abelha nativa com maior taxa de produtividade de mel, com cerca de 3,5 L por caixa (KERR et al., 1996), por isso, embora a passos pequenos, tem despertado cada vez mais o interesse da exploração comercial.

É importante destacar que devido o valor econômico da Meliponicultura para o Maranhão foram criadas estratégias visando o melhoramento na qualidade do mel de tíuba

como o projeto Abelhas Nativas que teve início no ano de 2005, proporcionando em 18 municípios da região da Baixada Maranhense o aumento na produção e qualidade do mel, além de incentivar parceria com a Universidade Federal do Maranhão para o desenvolvimento de pesquisas com meliponíneos (ALVES, 2013).

Apesar da qualidade e produtividade do mel de abelhas nativas, a falta de legislação impedia o comércio deste produto. No entanto, com a publicação da Portaria SEMA nº 081 de 20 de setembro de 2017 do estado do Maranhão, que caracterizou as competências do criador, os critérios de licenciamento ambiental para comércio, manejo de colônias e criação de meliponários, permitiu um importante avanço para a regulamentação da criação, manejo e conservação de abelhas do gênero *Apis* e 63 espécies de meliponíneos de ocorrência no Maranhão incentivando a comercialização dos produtos derivados das abelhas sem ferrão.

2.1.1 *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith

A espécie *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith (Figura 1), conhecida popularmente como “tíuba” e “tíuba do Maranhão”, pertence à Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Apinae e Tribo Meliponini. Seu primeiro registro foi feito por Ducke (1910) em Alcântara seguido de registros consecutivos em 1948 com a autoria do Dr. Warwick Estevam Kerr no município de Carolina, ambas cidades situadas no estado do Maranhão (SPECIESLINK, 2020).



Figura 1. *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith
Fonte: Mesquita (2016)

A espécie apresenta dispersão predominante no Nordeste da Região Amazônica, nos estados do Pará e Maranhão, apesar da ocorrência em outros estados como no Mato Grosso, Piauí e Tocantins (VENTURIERI; RAIOL; PEREIRA, 2003; CAMARGO; OLIVEIRA; BERTO, 2017).

No estado do Maranhão, *M. fasciculata* tem uma importante inserção no mercado local, produzindo mel de qualidade e com amplas possibilidades para exploração em escala econômica (HOLANDA, 2012). Outros produtos meliponícolas também se destacam, como a geoprópolis, (Figura 2) sendo formado a partir da mistura de resinas vegetais, pólen, cera, secreções salivares e adição de barro ou terra (KERR, 1987; BARTH, 2006).

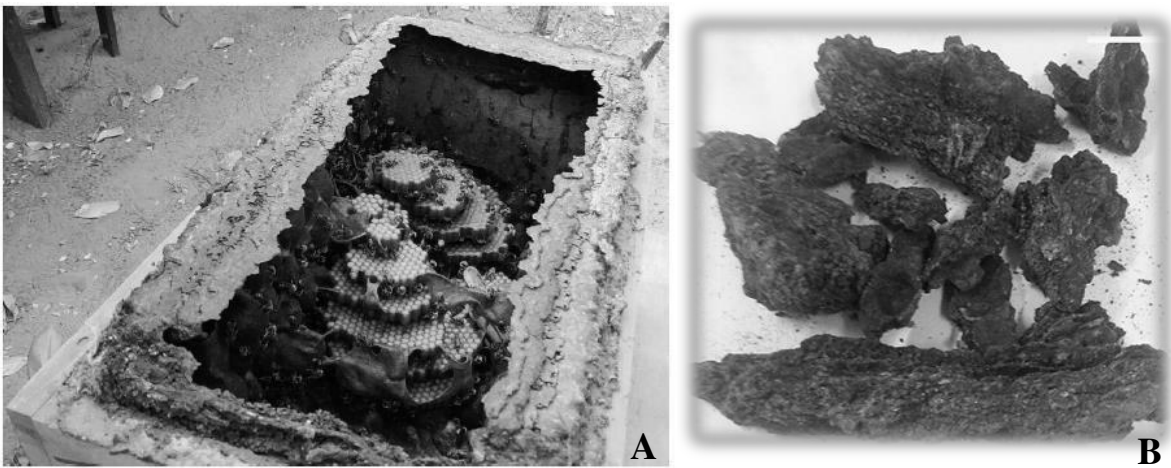


Figura 2. Caixa rústica com geoprópolis de *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith nas bordas da caixa (A). Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (B). Fonte: Cunha (2017); Rocha (2017)

A geoprópolis se diferencia da própolis de abelhas com ferrão como *Apis mellifera* Linnaeus, pois na própolis as abelhas misturam ao material resinoso, coletado nas plantas, cera e secreções salivares sem adicionar barro ou terra. No entanto, tanto a própolis quanto a geoprópolis são usadas com o mesmo objetivo para fechar pequenas frestas, vedar entradas de ventilação excessiva, embalsamar insetos, entre outros (NOGUEIRA-NETO, 1997; TENORIO et al., 2012).

A espécie *M. fasciculata* apresenta maior representatividade e distribuição no Maranhão (Figura 3) em relação as outras espécies de *Melipona*. Estudo realizado por Albuquerque et al. (2013) relataram a ampla distribuição em toda região da Baixada Maranhense, incluindo os municípios de São João Batista, São Bento, Cajari, Viana, Nova Ponta Branca, Matinha e Palmeirândia. A presença desta espécie também já foi demonstrada nos municípios de Peri Mirim (OLIVEIRA, 2004), Cidelândia (FERREIRA, 2006), Brejo

(AGUIAR, 2007), Jenipapo dos Vieiras, Fernando Falcão, Caxias, Grajaú (BATISTA, 2008) e São José de Ribamar (LIMA FILHO, 2011). Tal fato demonstra que o estado do Maranhão por ser uma região de transição entre biomas, possuindo assim grande número de ecossistemas, desde ambientes salinos com presença de manguezais, campos inundáveis, cerrados, babaçuais e floresta amazônica, oferece uma variedade de espécies vegetais e características favoráveis para adaptação da espécie e sua utilização na meliponicultura. Além disso, tal diversidade influencia na composição química e atividades biológicas dos produtos meliponícolas, em especial da geoprópolis (MUNIZ, 2004; MARTINS et al., 2011).

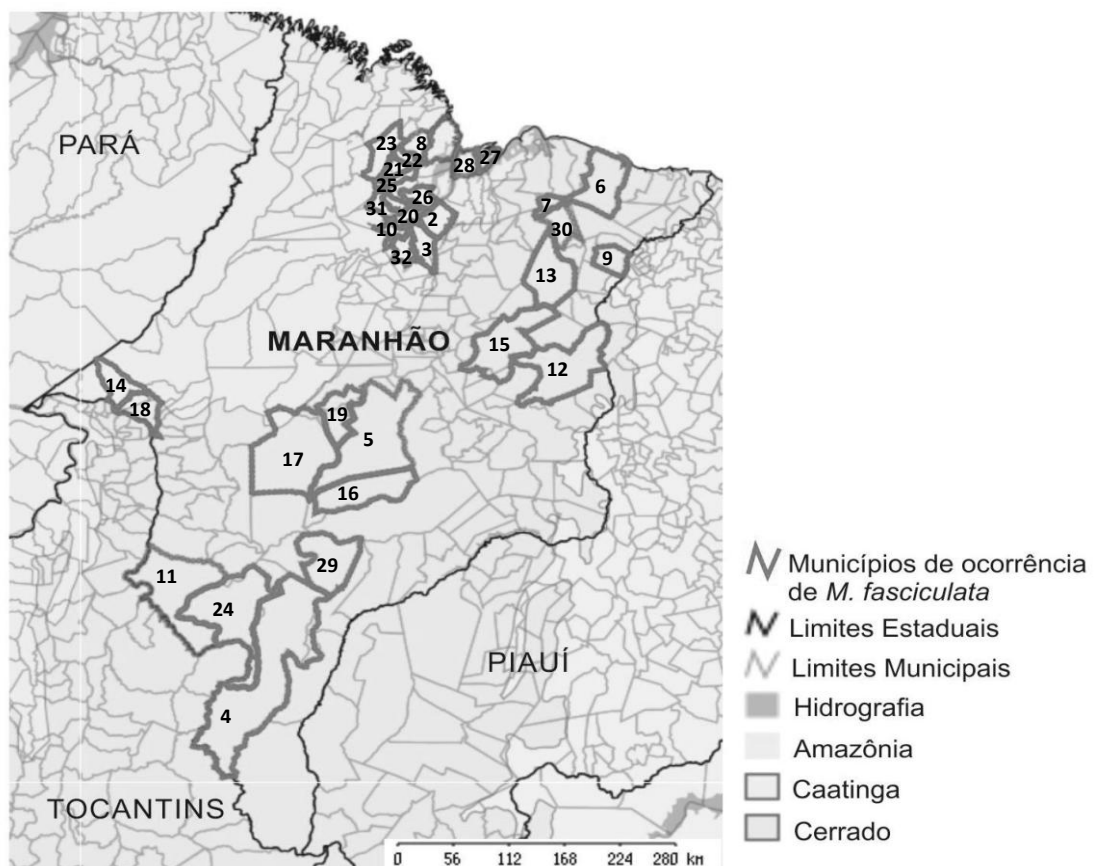


Figura 3. Mapa de distribuição por registros da espécie *M. fasciculata* no Maranhão.

Fonte: Gostinski (2018).

2.2 Composição química e atividade biológica da geoprópolis

As classes de compostos bioativos que predominam em geoprópolis das espécies do gênero *Melipona* são os flavonoides, taninos hidrolisáveis e terpenos, apresentando também ácidos aromáticos, cumarinas, benzofenonas preniladas, esteroides, saponinas, ácidos

graxos e açúcares, sendo as técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (CL/EM/EM) as mais utilizadas para identificação química (DUTRA et al., 2014; 2019, LAVINAS et al., 2019; POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019).

A composição química de geoprópolis é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas, com a época do ano da coleta e com a variabilidade genética das abelhas rainhas (SOUZA et al., 2009; SFORCIN, 2017). O solo utilizado pelas abelhas na produção das geoprópolis também pode influenciar nos constituintes inorgânicos presentes na geoprópolis, porém estudos sobre elementos inorgânicos são escassos. Bonsucesso e colaboradores (2018) determinaram a concentração de metais tóxicos na geoprópolis de *Melipona scutellaris* para avaliar a contaminação ambiental em áreas urbanas no estado da Bahia, localizado no Nordeste do Brasil. Recentemente, Siqueira e colaboradores (2020) demonstraram os elementos químicos inorgânicos das geoprópolis das espécies, *Melipona flavolineata*, *Melipona fasciculata* e *Melipona seminigra* encontrando baixas concentrações dos elementos inorgânicos Cu, Mn e Zn e altos níveis de Ca, Fe, K, Mg e P, onde o elemento Fe foi o mais abundante nas amostras de geoprópolis, apresentando concentrações mínimas de 2358,1 mg kg⁻¹ e máxima de 23128,8 mg kg⁻¹, sendo este estudo de suma importância para o conhecimento da composição mineral do geoprópolis produzido por abelhas do gênero *Melipona*.

Na literatura a primeira descrição sobre a composição química da geoprópolis foi por Greenaway e colaboradores (1990) que demonstraram a presença de ácidos fenólicos, entre eles o ácido 3,5-dihidroxibenzóico, na geoprópolis de *Melipona* sp. do Equador. Tomas-Barberan e colaboradores (1993) identificaram compostos fenólicos do tipo benzofenonas preniladas, por CLAE/EM ao analisar amostras de geoprópolis de *Melipona (Melikerria) compressipes* Fabricius e *Melipona (Melipona) favosa* Fabricius oriundas da Venezuela. Bankova e colaboradores (1998) ao estudar a geoprópolis de espécies de *Melipona compressipes* e *Melipona (Melipona) quadrifasciata* Lepeletier identificaram por CG/EM compostos polifenólicos (benzofenonas, ácidos fenólicos, flavonoides (pinobanksina)) e triterpenos (β -amirina).

Presença de compostos fenólicos e terpenos também foram identificados em amostras de geoprópolis de *M. quadrifasciata*, *M. favosa*, *Melipona (Michmelia) scutellaris* Lepeletier, *Melipona (Eomelipona) marginata* Lepeletier com predominância de derivados do ácido gálico, diterpeno (ácido caurenóico), triterpeno (β -amirina) e açúcares (VELIKOVA et

al., 2000).

Um estudo comparativo entre amostras de própolis de *Apis mellifera*, dos estados de São Paulo, Paraná e Ceará e geoprópolis de abelhas sem ferrão (*M. compressipes* e *M. quadrifasciata*) dos estados do Piauí e Paraná observaram a predominância de compostos aromáticos e terpenos em produtos de abelhas sem ferrão (KUJUMGIEV et al., 1999).

Silva e colaboradores (2013) isolaram e identificaram da geoprópolis de *Melipona (Melikerria) interrupta* Latreille e *Melipona (Michmelia) seminigra* Friese da região amazônica, por métodos espectrométricos, os flavonoides (5,7,4'-tri-hidroxi-flavona, 3,5,6,7,4'-penta-hidroxi-flavonol, naringenina-4'-O-β-D-glucopiranosídeo e miricetina-3-O-*p*-D-glucopiranyl).

Da Cunha e colaboradores (2016), submeteram ao fracionamento biomonitorado o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona scutellaris* isolando e elucidando duas novas cumarinas: 5,7-di-hidroxi-6-(3-metil-2-butenil)-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-propil-cumarina e 5,7-di-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenilcumarina, além de identificar cinco cumarinas (mammeigina, hidroximammeigina, mammeisina, cinamoiloximamisina e mammeína) e uma benzofenona (*ent*-nemorosona) já descritas na literatura anteriormente.

A caracterização por UHPLC-Q-TOF/MS do extrato etanólico da geoprópolis de *Heterotrigona itama* (Cockerell, 1918), abelha sem ferrão da Malásia, demonstrou a presença de 28 compostos das classes dos ácidos fenólicos, flavonas, triterpenos e fitoesteróis, sendo os triterpenos os principais componentes (ZHAO et al., 2017).

Souza e colaboradores (2018) identificaram por CLAE/EM, 51 compostos da geoprópolis de *Melipona (Melipona) subnitida* Ducke sendo quatro glicosídeos de galoil, onze acil-hexosídeos, vinte e três acil-galoil-hexosídeos, doze flavonoides e o ácido elágico.

Desta forma, com base nos estudos anteriormente citados é possível observar que as classes predominantes na geoprópolis de abelhas sem ferrão são os compostos fenólicos e os terpenos estando suas atividades biológicas atribuídas à sua composição química (LAVINAS et al., 2019; POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2019).

Além dos estudos descritos para a caracterização química da geoprópolis, ensaios pré-clínicos demonstraram as seguintes atividades biológicas da geoprópolis de espécies do gênero *Melipona*: antimicrobiana (KUJUMGIEV et al., 1999; VELIKOVA et al., 2000; DUAİLIBE et al., 2007; FARNESI et al., 2009; LIBERIO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2016; SANTOS et al., 2017), antiviral (COELHO et al., 2015), antioxidante (SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2013; DUTRA et al., 2014; SOUSA et al., 2015; BATISTA et al., 2016;

FERREIRA et al., 2017), anti-inflamatória (LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2013; DOS SANTOS, et al., 2017), antinociceptiva (SOUZA et al., 2014; FRANCHIN et al., 2012), imunomoduladora (LIBERIO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2019), gastroprotetora (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2015), anti-helmíntica (BATISTA, 2016), leishmanicida (DUTRA et al., 2019) e antitumoral (CINEGAGLIA et al., 2013; CUNHA et al., 2013; CAMPOS et al., 2014; DA CUNHA et al., 2016; BARTOLOMEU et al., 2016; CUNHA, 2017; OLIVEIRA et al. 2016, 2019).

2.2.1 Composição química e atividade biológica da geoprópolis de *M. fasciculata*

No Maranhão, pesquisadores do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão têm estudado a geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* Smith de diferentes localidades do estado do Maranhão visando identificar suas características químicas, físico-químicas, físicas e ações biológicas (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009; DUTRA et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; BATISTA et al., 2016; CUNHA, 2017; OLIVEIRA et al., 2016, 2019; DUTRA et al., 2019).

É interessante destacar que a geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, quando submetida à prospecção química demonstra a presença de taninos hidrolisáveis, triterpenos, compostos fenólicos e flavonoides (Tabela 1). A presença desses compostos na geoprópolis de *M. fasciculata* é influenciada pelas espécies vegetais presentes nos municípios de ocorrência desta espécie de abelha sem ferrão no estado do Maranhão, que apresenta preferência por plantas das famílias Fabaceae, Arecaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Myrtaceae, Melastomataceae e Lecythydaceae, onde as espécies, *Senna alata* (L.) Roxb, *Attalea speciosa*, *Mouriri acutiflora*, *Mimosa pudica*, *Rhynchospora cephalotes* e *Eschweilera ovata* são as mais visitadas (GOSTINSKI et al., 2017).

Tabela 1. Composição química e atividade biológica da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.

Origem Geográfica	Classe de compostos	Método Analítico	Atividade biológica e farmacológica	Referência
Baixada Maranhense, Brasil	flavonoides	UV	-	Dutra et al., 2008
Baixada Maranhense, Brasil	flavonoides e polifenóis	UV	-	Cunha et al., 2009
Baixada Maranhense, Brasil	flavonoides	CLAE/EM	citotóxica, fungicida, carrapaticida, antioxidante	Dos Santos, 2010
Baixada Maranhense, Brasil	flavonoides, polifenóis	UV	antimicrobiana, imunomoduladora	Liberio et al., 2011
Microrregião Alto mearim e Grajaú, Maranhão, Brasil	taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos), ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido elágico)	CLAE-DAD-ESI-EM/EM	antioxidante	Dutra et al., 2014
Baixada Maranhense, Brasil	triterpenos, alquiltrorsorcinóis, alquiflenóis, ácidos anacárdicos	CG-EM	citotóxica, imunomoduladora	Araújo et al., 2015
Baixada Maranhense, Brasil	triterpenos, ácidos anacárdicos, alquiltrorsorcinóis, açúcares	CG-EM	fungistática	Araújo et al., 2016
Baixada e Cerrado Maranhense, Brasil	polifenóis	UV	antioxidante, anti-helmíntica	Batista, 2016
Baixada e Cerrado Maranhense, Brasil	triterpenos, ácidos fenólicos	CG-EM	antioxidante	Batista et al., 2016
Baixada Maranhense, Brasil	não identificado	-	citotóxica	Oliveira et al., 2016
Tocantins, Brasil	flavonoides, catequina, ácidos fenólicos	CLAE-UV-VIS	antioxidante	Araújo et al., 2016
Baixada e Cerrado Maranhense, Brasil	taninos hidrolisáveis (galotaninos, elagitaninos), triterpenos, benzofenonas e alcalóides	CL-EM-EM	antioxidante citotóxica	Cunha, 2017
Baixada Maranhense, Brasil	ácido gálico, ácido elágico, triterpenos	CG-EM	leshimanhíctica	Dutra et al., 2019
Baixada Maranhense, Brasil	não identificado	-	citotóxica, imunomoduladora	Oliveira et al., 2019

Dutra e colaboradores (2014) estudando amostras de geoprópolis de *M. fasciculata* da microrregião Alto Mearim e Grajaú (Maranhão) identificaram por CLAE/ESI/EM/EM 11 compostos pertencentes as classes dos ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos), como ácido gálico, ácido elágico, galoil-HHDP-glicose, HHDP-glicose, di-HHDP-glicose, trigaloil-glicose, di-HHDP-galoil-glicose, dilactona do ácido valoneico, di-HHDP-galoil-glicose e trigaloil-HHDP-glicose sugerindo que a atividade antioxidante do extrato está relacionada a essas classes de compostos. Ressaltando que os taninos hidrolisáveis foram identificados pela primeira vez em geoprópolis de *M. fasciculata*.

Batista e colaboradores (2016) investigaram a composição química e a atividade antioxidante da geoprópolis de *M. fasciculata* coletada nos municípios de Palmeirândia e Fernando Falcão, no Maranhão identificando por CG/EM na geoprópolis de Palmeirândia triterpenos do tipo cicloartano (cicloartenol), ursano (ácido urs-12-en-24-óico, 3-oxo-cicloursano) e oleanano (β -amirina) e ácidos fenólicos (ácido protocatecuico e ácido gálico), enquanto na geoprópolis de Fernando Falcão os principais constituintes foram ácidos fenólicos, ácido gálico e ácido elágico. A propriedade antioxidante da geoprópolis foi atribuída aos altos teores de fenólicos totais e dos ácidos gálico e elágico, sendo que as fontes vegetais das duas regiões fitogeográficas utilizadas pelas abelhas para a produção da geoprópolis contribuem para a composição química e bioatividade deste produto.

Cunha (2017) avaliou a atividade antioxidante e citotóxica em células tumorais de Ehrlich do extrato hidroetanólico obtido da geoprópolis de *M. fasciculata* coletada nos municípios de Fernando Falcão e Palmeirândia do estado do Maranhão demonstrando que o extrato apresentou atividade antioxidante e citotoxicidade para células tumorais de Ehrlich, identificando 13 substâncias, pertencentes as classes dos triterpenos e dos taninos hidrolisáveis.

A atividade leshimanicida *in vitro*, citotoxicidade e composição química de geoprópolis produzida por *M. fasciculata* coletada na baixada maranhense foram avaliadas por Dutra e colaboradores (2019) sugerindo que a atividade leshimanicida da geoprópolis está relacionada à presença dos altos teores dos ácidos gálico e elágico e seus derivados.

Portanto, é possível observar que mesmo as amostras sendo coletas de diferentes locais do estado do Maranhão e havendo algumas diferenças na composição química, elas apresentam predominância de compostos polifenólicos (taninos hidrolisáveis, ácidos fenólicos, flavonoides e benzofenonas) e triterpenos do tipo cicloartano, ursano e oleanano (DUTRA et al., 2014, 2019; BATISTA et al., 2016; CUNHA, 2017). A presença desses

compostos na geoprópolis produzida por *M. fasciculata* estão relacionados com a fitogeografia local e podem justificar as atividades biológicas descritas na literatura bem como explicar seu uso popular como recursos terapêuticos para tratar processos inflamatórios, tumores, fraquezas, hemorroidas, gastrites, tosses e promover cicatrização (KERR, 1987; BEZERRA et al., 2018).

2.3 Câncer

Câncer é o termo genérico dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (WHO, 2020). O surgimento e estabelecimento de um câncer decorre de mutações em genes que normalmente controlam o crescimento, divisão, reparo de DNA e morte celular resultando em uma célula tumoral (FARES et al., 2020). As células tumorais apresentam proliferação desenfreada e necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese (CAIRNS; MAK, 2016; REID; SANDERSON; LOCASALE, 2020). Além disso, as células tumorais apresentam a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, invadindo tecidos adjacentes podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (HEITZ et al., 2018; FARES et al., 2020).

O desenvolvimento do câncer, geralmente, ocorre de maneira lenta e progressiva, devido à necessidade de várias mutações no DNA das células. Estudos recentes sugerem ser necessário de três a dez eventos genéticos no surgimento e proliferação de células tumorais (MCCREERY; BALMAIN, 2017).

A progressão do câncer é resultado do crescimento e diferenciação celular descontrolada, com perda de funções apoptóticas levando a uma expansão massiva na população de células neoplásicas (LI et al., 2020).

Por se tratar de doença multifatorial, várias são as causas que podem corroborar no desenvolvimento do câncer, sendo que os fatores internos representam de 5-10% de todos os cânceres e são resultantes de predisposições genéticas, fatores hormonais, imunes e epigenéticos (HEITZ et al., 2018; REID; SANDERSON; LOCASALE, 2020; FARES et al., 2020). Os fatores externos são os relacionados com comportamentos individuais, como tabagismo, sedentarismo, alcoolismo, má alimentação, exposição à agente mutagênico, tais

como radiação ionizante ou compostos químicos sendo esses considerados os agentes que mais contribuem na promoção da carcinogênese (GHARIBVAND et al., 2017).

Independentemente se alterações na célula são desencadeadas por fatores internos ou externos, estas alterações podem levar a desordem nos eventos celulares implicando na tumorigênese (PATIERNO, 2020). Dentre esses processos, a falha na apoptose está intimamente envolvida no desenvolvimento do câncer, visto que as células tumorais apresentam capacidade de resistir à morte celular (SHUH et al., 2013; MALUMBRES, 2020).

De forma geral, o conjunto das alterações genéticas levam a formação de novas características fenotípicas às células neoplásicas, desencadeando a autossuficiência em sinais de crescimento, resistência aos sinais antiproliferativos, resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, evasão do sistema imunológico, invasão, metástase, além de estresse metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de dano ao DNA (Figura 4) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LI et al., 2020).



Figura 4: Características fenotípicas das células neoplásicas (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).



Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas e representam, aproximadamente, 90% dos cânceres humanos. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas duas grandes categorias incluem os cânceres

derivados de células do sistema nervoso e as várias leucemias e linfomas derivados de células hematopoiéticas que representam 7% das malignidades em humanos (BRASIL, 2018).

O câncer é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo, segundo estimativas da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer foram contabilizados mais de 19,3 milhões de novos casos de câncer em 2020, com a morte de mais de 9,9 milhões de pessoas devido à doença (SUNG et al., 2021). Até 2040, a carga global deverá crescer para 28,4 milhões de novos casos de câncer e 17,3 milhões de mortes por câncer decorrentes do crescimento e envelhecimento da população humana (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; SUNG et al., 2021).

Além de apresentar alto índice de mortalidade, a incidência do câncer é crescente estando relacionado ao crescimento e ao envelhecimento da população, como também à crescente prevalência de fatores de risco, como tabagismo, excesso de peso, sedentarismo, alimentos industrializados, álcool entre outros (PATIERNO, 2020).

No Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (Figura 5). O perfil epidemiológico atual do país mostra que os cânceres mais incidentes em homens são: próstata, cólon e reto, pulmão, estômago, cavidade oral e esôfago; e em mulheres são: mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (BRASIL, 2019).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%		
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%		
Cólon e reto	20.520	9,1%			Mulheres		Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero		16.590	7,4%	
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão		12.440	5,6%	
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide		11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago		7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário		6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero		6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin		5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central		5.220	2,3%	

*Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 5: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: BRASIL, 2019.

A distribuição da incidência por região geográfica mostra que a região Sudeste concentra 60% da ocorrência de casos novos, seguida pelas regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%). Nas regiões Sul e Sudeste, o padrão da incidência mostra que predominam os cânceres de próstata e de mama feminina, bem como os cânceres de pulmão e de intestino. A

região Centro-Oeste, apesar de semelhante, incorpora em seu perfil os cânceres do colo do útero e de estômago entre os mais incidentes. Nas regiões Norte e Nordeste, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina entre os principais, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago tem impacto importante nessa população. A região Norte é a única do país onde as taxas dos cânceres de mama e do colo do útero se equivalem entre as mulheres (BRASIL, 2019).

Dentre os tipos de câncer mais incidentes no Brasil destaca-se o câncer de pulmão, que corresponde ao terceiro mais frequente em homens e o câncer de ovário que embora seja o sétimo mais incidente no Brasil é considerado o câncer ginecológico com maior incidência de morte (VARSHOSAZ et al., 2018; BRASIL, 2019). Segundo a estimativa do INCA (2019), o câncer de ovário apresenta uma estimativa para o triênio 2020-2022 de 6.650 novos casos, com um risco estimado de 6,18 casos a cada 100 mil mulheres e para o câncer de pulmão foi estimado 17.760 casos de câncer de pulmão entre homens e de 12.440 nas mulheres para cada ano do triênio 2020-2022.

2.3.1 Câncer de ovário

O câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum, atrás apenas do câncer do colo do útero e aparece como o tipo de câncer ginecológico com maior mortalidade em todo o mundo, sendo sua letalidade mais elevada em comparação aos outros tipos de câncer dos órgãos reprodutores femininos (TORRE et al., 2018; SUNG et al., 2021).

Existem três principais classes de tumores malignos que podem surgir no ovário: os cânceres epiteliais ovarianos, os tumores ovarianos de células germinativas e do estroma do cordão sexual. A quase totalidade das neoplasias ovarianas (95%) é derivada das células epiteliais (que revestem o ovário). O restante provém de células germinativas (que formam os óvulos) e células estromais (que produzem a maior parte dos hormônios femininos) (STEWART et al., 2017).

Os cânceres epiteliais de ovário são classificados de acordo com suas características morfológicas e clínicas em grau histopatológico de 1 a 3. O subtipo mais comum é a histologia serosa, seguida dos subtipos mucinosos e endometrioides. Os subtipos mais raros são os de células claras, transicionais, escamosos, mistos e os indiferenciados (JAYSON et al., 2014; MATZ et al., 2017).

Quando diagnosticadas nos primeiros estágios de cânceres epiteliais de ovário, as

pacientes possuem cerca de 45% de chances de sobreviver enquanto as mulheres diagnosticadas em estágios avançados possuem de 15-25% de chances de sobrevivência. Esse fato é um dos principais agravantes desse tipo de câncer (WEBB; JORDAN, 2017).

As manifestações clínicas do câncer ovariano são inespecíficas e tornam, em geral, o seu diagnóstico tardio, quando já está em estágio avançado, representando pior prognóstico. Entretanto, diagnosticado em fase inicial, aumenta-se à expectativa de vida, sendo a detecção precoce a principal estratégia para melhorar a sobrevida. Para o seu diagnóstico é recomendado a ultrassonografia transvaginal e alguns marcadores bioquímicos, especialmente o CA-125, um marcador tumoral de câncer de ovário (FRANÇA et al., 2011; STEWART et al., 2017).

A incidência e mortalidade do câncer de ovário, no mundo, foram de 313.959 e 207.252 de casos, respectivamente, em 2020 (SUNG et al., 2021). Para o Brasil, estimam-se 6.650 casos novos de câncer do ovário, para o triênio 2020-2022, com um risco estimado de 6,18 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 5). Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer do ovário é o sétimo mais incidente nas regiões Nordeste e Norte, com um risco estimado de 5,67/100 mil e de 3,28/100 mil, respectivamente. Nas demais regiões, Sudeste (7,01/100 mil) e Centro-Oeste (5,09/100 mil), ocupa a oitava posição e, na região Sul (7,06/100 mil), a nona (BRASIL, 2019).

De forma geral, a incidência do câncer ovariano aumenta com a idade, apresentando idade média ao diagnóstico de 63 anos (AZEVEDO et al., 2016). Fatores genéticos como a história familiar de câncer de ovário ou de mama; mutações de alto risco dos genes BRCA1 e BRCA2 (genes “breast cancer 1 e 2” que codificam proteínas supressoras de tumor); menopausa tardia; endometriose; nuliparidade (nunca engravidaram ou nunca tiveram filhos); terapia de reposição hormonal; obesidade; ausência de atividade física e tabagismo estão associados com o desenvolvimento do câncer ovariano. A gravidez e uso de contraceptivos orais (supressão da ovulação) são considerados fatores de proteção, sendo que o uso aumentado e precoce de contraceptivos orais contribuiu para as tendências declinantes observadas na maioria países desenvolvidos (REID et al., 2017).

O tratamento do câncer de ovário pode apresentar potencial curativo ou paliativo, dependendo do estágio da neoplasia e da diferenciação tumoral. Todas as mulheres com suspeita de câncer epitelial invasivo de ovário devem ser avaliadas por um cirurgião ginecologista ou cirurgião oncológico antes do início da terapia para determinar quais as pacientes são candidatas à cirurgia citorrredutora primária (MATZ et al., 2017). A quimioterapia de primeira escolha recomendado pelo Ministerio da Saúde (2019) são

derivados de platina (cisplatina e carboplatina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel).

O tratamento com derivados de platina (cisplatina e carboplatina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel) embora sejam o de primeira escolha, tem como principal obstáculo para sua eficiência o desenvolvimento de resistência aos tratamentos pelas células tumorais (SUN et al., 2019). Desta forma, é necessário desenvolver alternativas terapêuticas capazes de reverter as limitações das cirurgias e diminuir os mecanismos de resistência que surgem em consequência dos tratamentos quimioterápicos não específicos e prolongados.

2.3.2 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é uma doença prevalente, sendo uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (HENLEY et al., 2020; SUNG et al., 2021). Apesar do desenvolvimento de várias drogas anticâncer, o câncer de pulmão apresenta um mau prognóstico, pois as metástases do câncer de pulmão, bem como a quimiorresistência, estão associadas a uma alta taxa de mortalidade de pacientes com câncer de pulmão (DE GROOT et al., 2018; BRAY et al., 2018).

Existem dois tipos principais de câncer de pulmão: o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e o carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Este último é classificado ainda em três subtipos histopatológicos: Adenocarcinoma; Carcinoma epidermoide e Carcinoma de grandes células (MUSTAFA et al., 2016). O CPNPC é responsável por 80% dos casos de câncer de pulmão e, destes, cerca de 10% é carcinoma de grandes células, caracterizado por má diferenciação, crescimento rápido e metástase precoce (CHIU et al., 2018).

Dados epidemiológicos publicados por Benaoudia e colaboradores (2020) demonstraram que o câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por câncer em homens e a segunda causa mais comum em mulheres, após o câncer de mama. As taxas mais altas de mortalidades estão registradas na América do Norte, Europa e Ásia Oriental, enquanto as taxas mais baixas estão registradas na África e no sul da Ásia (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020).

Mundialmente, entre os diversos tipos de câncer, o câncer de pulmão representa 12,8% dos casos e 17,8% das mortes devido essa doença, sendo sua incidência superior em países mais desenvolvidos como o norte da Europa e América, intimamente relacionada ao tabagismo (SIEGEL et al., 2019).

No Brasil, estima-se 17.760 casos novos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,99 casos novos a cada 100 mil homens, sendo o segundo tumor mais frequente; e com um risco estimado de 11,56 para cada 100 mil mulheres, ocupando a quarta posição (BRASIL, 2019).

Segundo o INCA (2019), sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais frequente nas regiões, Sul (31,07/100 mil) e Nordeste (11,01/100 mil). Nas regiões Sudeste (18,10/100 mil), Centro-Oeste (15,11/100 mil) e Norte (9,24/100 mil), corresponde a terceira posição. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente nas regiões Sul (18,66/100 mil) e Sudeste (12,09/100 mil). Nas regiões Centro-Oeste (10,87/100 mil), Nordeste (8,86/100 mil) e Norte (6,47/100 mil), ocupa a quarta posição.

As manifestações clínicas incluem tosse, tosse com sangue, perda de peso, fraqueza, febre, hipercalcemia, síndrome da miastenia (fraqueza muscular) e metástases. A doença metastática inclui perda de peso, dor óssea e sintomas neurológicos. O diagnóstico é realizado principalmente através de radiografias do tórax, tomografia computadorizada e investigação molecular que evidencia as diferentes famílias de genes e o evento mutagênico envolvido, além de caracterizar cada tipo histológico com suas alterações moleculares peculiares (MUSTAFA et al., 2016).

Dentre os fatores de risco o tabagismo é responsável por 90% das mortes de câncer de pulmão em homens e mulheres devido aos compostos carcinogênicos do tabaco (BENAOUDIA et al., 2020). Em segundo lugar está o radônio (DE GROOT et al., 2018) cuja exposição pode ter seu efeito potencializado pelo sinergismo com a inalação do tabaco. Além do radônio, outros produtos químicos como sílica, cromo, cádmio, níquel, arsênico e berílio foram relacionados como fatores de risco (CHIU et al., 2018). Ainda, portadores de HIV e a inalação passiva do tabaco através da convivência com fumantes estão caracterizados como fator de risco da doença (ENGELS et al., 2008). Alguns fatores como inflamação, falhas ao nível molecular e sinalizações intercelulares alteradas, são desencadeadoras na patogênese do câncer (MUSTAFA et al., 2016).

O tratamento do câncer de pulmão consiste em cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Além disso, o tratamento leva em consideração a classificação do câncer de pulmão e estadiamento do tumor, sendo adotado na maioria dos casos a radioterapia e quimioterapia com combinação de quimioterápicos como ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, cisplastina, etoposídeo (MITRA et al., 2015; BRASIL, 2019).

2.4 Tratamentos usuais do câncer

O tratamento do câncer é complexo, multidisciplinar e depende essencialmente do seu estadiamento clínico, das características patológicas do tumor e prognósticos (OLIVEIRA et al., 2019).

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Mais recentemente tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia, sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento (ALMEIDA et al., 2005; WILEY et al., 2017; BAYER et al., 2017).

A aplicação da cirurgia oncológica pode ter a intenção de: diagnóstico, estadiamento da doença e tratamento da doença. Para o diagnóstico é realizado a coleta de amostra tecidual para exame que incluem: biópsia incisional, biópsia excisional, biópsia por agulha ou endoscopia. A escolha da técnica dependerá da localização, do tamanho e das características de crescimento tumoral. Com a finalidade de estadiamento temos a sua aplicabilidade nos casos de tumores inacessíveis de difícil avaliação e que receberam estadiamento incorreto em outros métodos. Para o tratamento a cirurgia pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase (MITRA et al., 2015).

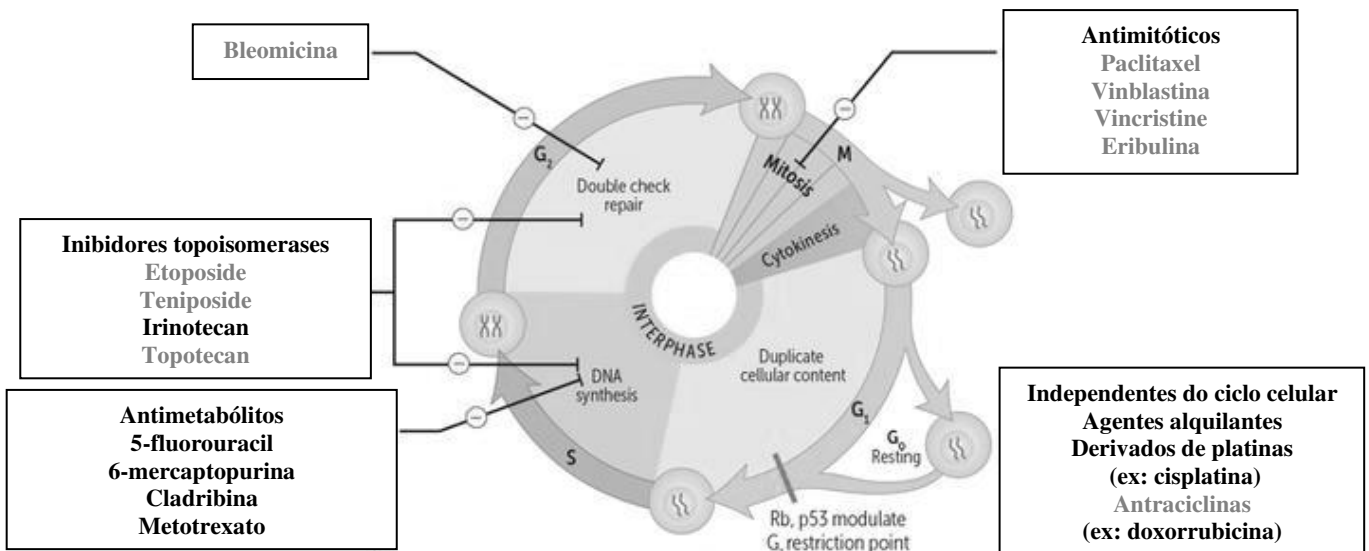
A radioterapia é um tratamento onde se utilizam radiações ionizantes com finalidade de matar células neoplásicas ou impedir sua vasta proliferação, usada comumente em conjunto com a cirurgia, para aumentar a eficiência do tratamento. Existem dois tipos de radioterapia: a externa (Teleterapia) e a interna (Braquiterapia). Na radioterapia externa, o procedimento é realizado fora do corpo com uma máquina que envia radiação para o tumor, enquanto a radioterapia interna usa substâncias radioativas, emitida do aparelho para os aplicadores, colocados próximo ao tumor ou diretamente nele (WILEY et al., 2017).

A quimioterapia antineoplásica, constitui uma das modalidades de maior escolha para o tratamento das neoplasias malignas, podendo ser classificada conforme a sua finalidade em: adjuvante, quando se segue à cirurgia curativa; neoadjuvante, indicada para se obter a redução parcial do tumor; curativa, usada com o objetivo de se conseguir o controle completo do tumor; e paliativa, que visa minimizar os sintomas decorrentes da proliferação tumoral com aumento da sobrevida (OLIVEIRA et al., 2019).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não seletiva, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido

crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, alopecia e susceptibilidade maior às infecções (ABUKHDEIR; PARK, 2008; SAEED et al., 2015; SCHIRRMACHER, 2019).

Os fármacos antineoplásicos têm como principal alvo o ciclo celular (Figura 6), interferindo no processo de divisão das células e desencadeando a morte celular (ALMEIDA et al., 2005; MASOOD et al., 2016; MALUMBRES, 2020). Podem ser agrupados nas seguintes categorias: agentes alquilantes (mostarda nitrogenada, etileniminas, alquilsulfonados, triazenos), que atuam formando ligações covalentes com o DNA impedindo sua replicação; antimitóticos (alcalóides da *Vinca*, taxanos e camptotecina) que afetam, especificamente, a função dos microtúbulos, portanto, a formação do fuso mitótico; antimetabólitos (análogos das purinas, análogos das pirimidinas e análogos do ácido fólico), que bloqueiam ou subvertem uma, ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese de DNA; antibióticos citotóxicos de origem microbiana (antraciclina, mitoxantrona, dactinomicina, bleomicina e mitomicina C), que impedem a divisão de células; agentes diversos (dacarbazina, L-asparaginase, imatinibe, cisplatina) que não se encaixam nas categorias anteriores (BRANDÃO et al., 2010; SCHIRRMACHER, 2019).



*Em vermelho agentes antineoplásicos derivados de produtos naturais.

Figura 6: Atividade dos agentes antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular. (Adaptado de Cancer Drugs, 2019).

A cada exposição do tumor ao quimioterápico, ocorre uma destruição de um percentual das células tumoral (20 a 99%, dependendo da dosagem). A administração de várias doses repetidamente é necessária para erradicação do tumor, onde será diminuído a massa tumoral e as células tumorais restantes serão destruídas pelo sistema imunológico

(MASOOD et al., 2016).

No entanto, apesar de já existirem muitos quimioterápicos efetivos, os efeitos adversos produzidos por estes fármacos, assim como o surgimento de tumores resistentes e/ou a seleção de células resistentes em um tumor sob tratamento, limitam o uso desses fármacos, aumentando a necessidade do desenvolvimento de novas drogas mais eficazes (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Atualmente, busca-se utilizar terapia-alvo que corresponde a um tipo de tratamento do câncer que usa drogas ou outras substâncias para identificar e bloquear o crescimento, progressão e metástase do câncer com pouco dano às células normais (LEE et al., 2018).

Os inibidores de PARP constituem uma terapia alvo para o tratamento do câncer e atuam na via de reparo do DNA através da inibição da enzima PARP, em especial nos tumores com mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 (MATEO et al., 2019). Tais mutações estão comumente associadas ao aumento no risco de ocorrência de cânceres de ovário e mama, além de estudos que correlacionam aos tumores de próstata e pâncreas (BAJRAMI et al., 2014). No Brasil, já temos a aprovação do olaparibe (inibidor de PARP) para o tratamento do câncer de ovário em pacientes com mutação de BRCA, assim como na doença recorrente platino-sensível (POVEDA et al., 2021).

Além dos medicamentos antineoplásicos e a terapia-alvo, os anti-inflamatórios seletivos para COX-2 podem ser uma estratégia adjuvante eficaz para combater o câncer. A COX-2 está relacionada a resistência apoptótica, proliferação, angiogênese, inflamação, invasão e metástase de células cancerígenas, desta forma a administração de inibidores da COX-2 oferece um possível mecanismo de inibição da carcinogênese (LIU et al, 2015).

Alguns alvos que foram explorados em combater a inflamação relacionada ao câncer incluem COX-2, NF-kB, citocinas/quimiocinas e seus receptores, fator de crescimento de fibroblastos e seu receptor, bem como fator de crescimento endotelial vascular (WONG, 2019). Vale ressaltar que a COX-2 é superexpressa em vários cânceres como pancreático, próstata, cervical, câncer de mama, pulmão e cólon (KEHM et al., 2019; WONG, 2019). A superexpressão de COX-2, por sua vez, estimula angiogênese, que é um passo fundamental na invasão e metástase, sendo a associação de inibidores seletivos para COX-2 uma importante estratégia de tratamento (KASHFI, 2009; KUMAR et al., 2018).

Portanto, torna-se necessário desenvolver e introduzir novos fármacos com capacidade anti-inflamatória e antineoplásica para tratamento de células cancerígenas, sendo os produtos naturais uma fonte produtiva de novas moléculas com potencial para tratamento

de diversos tipos de câncer, visto que podem agir por múltiplos alvos celulares e reduzir a toxicidade às células normais (NEWMAN; CRAGG, 2016; 2020; AMARAL et al., 2019).

2.5 Produtos de origem natural usados na terapêutica do câncer

Um levantamento publicado em 2020, cobrindo o período de 1981 a 2019, verificou que dos 185 medicamentos antineoplásicos aprovados pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA), e considerados de baixa massa molecular (< 500u), 9,7% são moléculas naturais que não sofreram modificação, 0,5% são medicamentos botânicos (materiais vegetais, que podem incluir materiais de plantas, algas, fungos macroscópicos ou combinações dos mesmos), 23,2% são derivados de produtos naturais, 19,4% são obtidos por síntese e mimetizam produtos naturais, 24,3% são de origem sintética contendo farmacóforos de origem natural, 22,9% são sintéticos demonstrando desta forma a importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de tratamento para o câncer (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Dentre os quimioterápicos citotóxicos, derivados de produtos naturais, temos os antibióticos citotóxicos originários de microrganismos (as antraciclinas e mitomicina C) (AMARAL et al., 2019), derivados de plantas, representados pelos alcalóides da *Vinca*, taxóis e podofilotoxinas (ALVARENGA et al., 2014; PAIER et al., 2018) e organismos marinhos (mesilato de eribulina) isolado da esponja marinha *Halichondria okadai* (SAWADOGO et al., 2013; TRENDOWSK, 2015).

As principais classes de metabólitos secundários indicados como responsáveis pelo potencial anticancerígeno dos produtos naturais são os compostos fenólicos (como flavonoides), esteroides e alcaloides (EID et al., 2015). Além destas classes, os triterpenos pentacíclicos dos tipos ursano, oleanano, lupano e friedelano, também estão despertando o interesse da indústria farmacêutica, dado que diversos trabalhos demonstram a capacidade desses triterpenos em inibir a formação de tumores por diferentes mecanismos como inibição da polimerase, regulação da apoptose, alteração nas transduções de sinal e atividade antiproliferativa (BRANDÃO et al., 2010; GHANTE; JAMKHANDE, 2019).

Os efeitos terapêuticos dos produtos naturais são evidenciados por suas propriedades antioxidantes, antiproliferativa e efeitos pró-apoptóticos em uma variedade de linhagens tumorais como leucemia, próstata, mama, colorretal, cérebro, melanoma e pâncreas apresentando-se como candidatos no desenvolvimento de novas drogas no tratamento do

câncer ou contribuindo para derivações semissintéticas com melhor utilidade clínica (TRENDOWSK, 2015; AMARAL et al., 2019).

A primeira droga anticancerígena desenvolvida a partir de produto natural foi a podofilotoxina, isolada de *Podophyllum peltatum* em 1947, o qual possibilitou o advento de descobertas de outras drogas de origem natural como seus derivados semissintéticos etoposídeo (Etopophos®), teniposídeo (Vumon®) que apresentam ação pelo bloqueio das células nas fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II promovendo lesão no DNA e morte celular (EID et al., 2015).

Dentre alguns produtos naturais citotóxicos, usados clinicamente no tratamento de neoplasias, têm-se os alcaloides vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®), isolados da *Catharanthus roseus* (*Vinca roseus*) que inibem o fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase (ALMEIDA et al., 2005). Na prática clínica, também é utilizado o Taxol®, um diterpeno taxano isolado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia* Nutt) e do teixo europeu (*Taxus baccata* L.) comercializado como os fármacos Paclitaxel e Taxol®, que interferem na estrutura e função dos microtúbulos, agindo em vias apoptóticas através de mecanismos que envolvem a expressão de proteínas da família BCL-2 (TRENDOWSK, 2015, PAIER et al., 2018).

Trendowsk (2015) publicou uma revisão dos quimioterápicos derivados de produtos naturais aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) destacando os agentes direcionados a microtúbulos, por exemplo, o mesilato de eribulina (análogo sintético, estruturalmente simplificado da halicondrina B, isolado da esponja marinha *Halichondria okadaï*), ixabepilona (semissintético derivado da epotilona B isolado da bactéria *Sorangium cellulosum*) e dolastatina (isolado do molusco gastrópode marinho *Dolabella auricularia*); os inibidores seletivos de mTOR - everolimo e tensirolimo (macrolídeos obtido por modificação química do produto natural rapamicina produzido por *Streptomyces hygroscopicus*); inibidores da síntese de proteínas - mepesuccinato de omacetaxina (alcalóide de *Cephalotaxus harringtonia*); agente alquilante de DNA – trabectedina (alcalóide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*); agente modificador da resposta biológica/interleucina - denileucina diftitox (proteína recombinante composta de seqüências de aminoácidos da toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* e IL-2); e conjugados anticorpo-droga - trastuzumabe entansina (derivado de maitansina extraído de plantas do gênero *Maytenus*).

Desta forma, é possível destacar a importância da biodiversidade no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos demonstrando que as características

estruturais e farmacoterapêuticas dos produtos naturais continuam tendo grande relevância na descoberta de novas drogas (NEWMANN; CRAGG, 2020; BARREIRO, 2019).

2.6 Atividades antitumorais da geoprópolis de *M. fasciculata*

Estudos têm relatado diversas propriedades biológicas de produtos de abelha, principalmente da própolis e geoprópolis, com excelentes potenciais antioxidantes e antitumorais (LAVINAS et al., 2019; AL-HATAMLEH et al., 2020; CAMPOS et al., 2021), fato importante, pois conforme a Organização Mundial da Saúde, o câncer tem se tornado a segunda principal causa de morte em todo o mundo (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020).

Pesquisas científicas vêm demonstrando o potencial antitumoral da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. Segundo Cinegaglia e colaboradores (2013) o extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. fasciculata* apresentou efeito citotóxico em células de osteosarcoma (OSA) encontradas em cães. Araújo e colaboradores (2015) verificaram ação citostática do extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. fasciculata* em células HEP-2 resistentes a carboplatina sugerindo para esse extrato um perfil de ativador de monócitos humanos.

Alguns estudos também são voltados para avaliar se a geoprópolis aumenta a sensibilidade de antineoplásicos, como o desenvolvido por Bartolomeu e colaboradores (2016) que demonstraram que a combinação de extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. fasciculata* com drogas como carboplatina, metotrexato e doxorrubicina contra células de carcinoma epidermoide da laringe humano (Hep-2) levou a uma maior atividade citotóxica induzindo apoptose e inibindo a proliferação e a migração celular de células Hep-2.

Oliveira e colaboradores (2016; 2019) investigaram se o agente quimioterápico doxorrubicina em combinação com extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. fasciculata* poderia afetar células imunes não tumorais, avaliando sua ação citotóxica em células de THP-1, linhagem monocítica de leucemia humana e efeitos imunomoduladores em monócitos humanos. A abordagem quimioterápica usando doxorrubicina simultaneamente com geoprópolis não afetou a viabilidade dos monócitos humanos e exerceu efeitos imunomoduladores, favorecendo funções e atividades biológicas da geoprópolis

Cunha (2017) avaliou a atividade antioxidante e citotóxica em células tumorais de Ehrlich do extrato hidroetanólico e frações obtidas da geoprópolis de *M. fasciculata*

demonstrando a citotoxicidade para células tumorais de Ehrlich, MCF-7 e RAW. Além disso, a administração do respectivo extrato aumentou a sobrevivência dos animais portadores de tumor ascítico, bem como induziu a diminuição do tumor sólido, tanto administrado de forma profilática quanto de forma terapêutica.

Desta forma, é possível evidenciar o potencial da ação antitumoral da geoprópolis de abelhas sem ferrão, em especial de *M. fasciculata* destacando que esta pode apresentar aplicabilidade como quimioterápico bem como a partir de seus constituintes químicos permitirem derivações semissintéticas. Além disso, os estudos apresentados evidenciam que associação de extratos da geoprópolis de *M. fasciculata* com quimioterápicos aumenta a sensibilidade destes demonstrando seu potencial também como adjuvante terapêutico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar toxicidade aguda, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, identificar a composição química e correlacionar quais compostos estão associados à bioatividade através de ensaios *in silico*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a toxicidade aguda de extratos de geoprópolis de *M. fasciculata* frente ao modelo zebrafish (*Danio rerio*);
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de geoprópolis de *M. fasciculata*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* de extratos de geoprópolis de *M. fasciculata*;
- Avaliar a atividade antitumoral de extratos de geoprópolis de *M. fasciculata* em linhagem celular de câncer de ovário (A2780 e ES2) e pulmão (A549 e H460);
- Selecionar a linhagem mais sensível e o extrato mais citotóxico para avaliação do evento de morte celular;
- Identificar os constituintes químicos dos extratos de geoprópolis de *M. fasciculata*;
- Identificar e selecionar através de ensaios *in silico* as substâncias químicas presentes no extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. fasciculata* que podem estar associados às ações anti-inflamatória e antitumoral;
- Realizar uma revisão integrativa sobre os efeitos antitumorais dos principais fitoquímicos e os mecanismos moleculares envolvidos na ação antitumoral do câncer de ovário.

4. JUSTIFICATIVA

Os estudos já realizados pelo nosso grupo de Produtos Naturais da UFMA sobre bioprospecção antitumoral de extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith e de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* demonstraram efeito tumoristático e tumoricida do tumor de Ehrlich na forma sólida conforme a concentração dos extratos testados (ARAÚJO et al., 2010, 2011; CUNHA, 2017) assim como a presença das classes químicas como ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis, triterpenos, flavonoides e benzofenonas (DUTRA et al., 2014, 2019; BATISTA et al., 2016; CUNHA, 2013, 2017), estando os compostos químicos destas classes relacionados a atividade. A continuidade destes estudos com outros tipos de linhagens celulares e da geoprópolis de *M. fasciculata* coletadas em distintos municípios do Maranhão abre perspectivas para a descoberta de novas substâncias antitumorais.

No Maranhão destaca-se o cultivo de *Melipona fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), que ocupa lugar de destaque, pela sua dispersão no estado, sendo a abelha social mais comum, cultivada principalmente para produção de mel, mas há outros produtos meliponícolas que podem ser aproveitados, como a geoprópolis que pode ter valor agregado pelas ações biológicas já demonstradas.

Ressalta-se ainda que a Meliponicultura, no estado do Maranhão reúne características bastante favoráveis, que por ser uma região de transição, possui um grande número de ecossistemas, desde ambientes salinos com presença de manguezais, passando por campos inundáveis, cerrados e babaquais, até vegetação florestal de grande porte de natureza amazônica, que fornece a matéria prima de suporte para o trabalho das abelhas, e consequentemente influenciando na composição química e atividades biológicas dos produtos meliponiculas (ALBUQUERQUE et al., 2013).

A meliponicultura faz parte dos arranjos produtivos do estado, como forma de contribuir o desenvolvimento sustentável do Maranhão. Especialmente nos municípios contemplados pelas políticas públicas do Programa Mais Produção, mapeados pela Agência Estadual de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (AGERP) como parte da Cadeia Produtiva do Mel. Nestes municípios com tradição do cultivo da tiúba para produção de mel, há necessidade de aproveitamento dos outros produtos produzidos pela abelha, como geoprópolis, que não é ainda explorada economicamente, mas demonstra ser um recurso natural que no futuro pode representar uma alternativa como fonte de substâncias bioativas para a prevenção e/ou tratamento dos diferentes tipos de cânceres.

Além disso, no estado do Maranhão, destaca-se, nas mulheres, a incidência dos cânceres de mama, colo do útero, tireoide e ovário, sendo este último a quarta neoplasia feminina mais incidente. Nos homens, os tipos de cancer mais incidentes são respectivamente o câncer de próstata, estômago, cólon e reto, e pulmão, sendo o câncer de pulmão considerado agressivo e com alta taxa de mortalidade (BRASIL, 2019).

Desta forma, nosso estudo objetiva continuar os estudos da bioprospecção antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e de toxicidade, além de identificar composição química e realizar estudos *in silico* da geoprópolis de *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith cultivada nos municípios produtores de mel (Viana e Pinheiro) no estado do Maranhão. Com os resultados esperamos demonstrar o valor terapêutico da geoprópolis e agregar valor aos produtos da cadeia produtiva indicando mais um produto a ser explorado comercialmente, favorecendo o desenvolvimento da Meliponicultura no estado do Maranhão.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em 3 capítulos. O primeiro capítulo refere-se ao artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Health Review* relacionado a investigação da toxicidade aguda dos extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith frente ao modelo zebrafish e o perfil químico desses extratos. O segundo capítulo trata-se do artigo publicado na revista *Biology* que aborda às atividades antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, composição química e estudos *in silico* dos extratos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletadas nos municípios de Viana e Pinheiro do estado do Maranhão. O terceiro capítulo é referente ao artigo de revisão “Molecular mechanisms of action and chemosensitization of tumor cells in ovarian cancer by phytochemicals.” submetido na revista *Pharmacological Research*.

5.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO

Abordagem química e toxicidade em modelo zebrafish de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

Artigo publicado na revista **Brazilian Journal of Health Review**

Qualis: B3

ISSN 2595-6825

Josianne Rocha Barboza¹; Francisco Assis Nascimento Pereira¹; José Antônio Costa Leite²;
Denise Fernandes Coutinho²; Maria Nilce de Sousa Ribeiro¹.

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

² Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, Laboratório Farmacognosia II, Avenida dos Portugueses 1966, Campus Bacanga, 65080-805, São Luís-Maranhão, Brasil.

**Abordagem química e toxicidade em modelo zebrafish de geoprópolis de
Melipona fasciculata Smith**

/

**Chemical approach and toxicity in zebrafish model of geipropolis of
Melipona fasciculata Smith**

DOI:10.34119/bjhrv2n6-059

Recebimento dos originais: 27/10/2019

Aceitação para publicação: 05/12/2019

Josianne Rocha Barboza

Pós-graduando (Doutoranda), Programa BIONORTE, Laboratório Farmacognosia,
Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA.

Instituição: Universidade Federal do Maranhão.

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses,1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA – Brasil.

E-mail: josi.anne.r@hotmail.com

Francisco Assis Nascimento Pereira

Graduando (Farmácia), Laboratório Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA.

Instituição: Universidade Federal do Maranhão.

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses,1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA – Brasil.

E-mail: franciscopho2015@gmail.com

José Antônio Costa Leite

Mestre em Ciências da Saúde, Laboratório Farmacognosia II, Departamento de Farmácia,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA.

Instituição: Universidade Federal do Maranhão.

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses,1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA – Brasil.

Denise Fernandes Coutinho

Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Farmacognosia II,
Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA.

Instituição: Universidade Federal do Maranhão.

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses,1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA – Brasil.

Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Doutora em Química Orgânica, Laboratório Farmacognosia, Departamento de Farmácia,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA.

Instituição: Universidade Federal do Maranhão.

Endereço: Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento Farmácia, Laboratório Farmacognosia, Av. dos Portugueses, 1966, Campus
Dom Delgado, Bacanga CEP: 65080805 - São Luís, MA – Brasil.

E-mail: mnribeiro@ufma.br

RESUMO

Melipona fasciculata Smith, espécie nativa do Maranhão, é uma abelha sem ferrão que produz mel, cera, pólen e geoprópolis, sendo este constituído por material resinoso coletado das plantas, secreções salivares, cera e barro ou terra. A espécie é bastante manejada no estado do Maranhão, principalmente nas regiões da baixada e cerrado, criada comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários, que constituem a meliponicultura. Estudos demonstram que a geoprópolis possui atividades biológicas como antimicrobiana, leishmanicida, antioxidante, anti-helmíntica, antiproliferativa mostrando ser um produto natural promissor para novas pesquisas. Desta forma, o artigo tem como objetivo verificar o perfil químico dos extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith e investigar a toxicidade dos extratos frente ao modelo zebrafish. As amostras foram coletadas diretamente das colmeias dos meliponários no município de Pinheiro e Viana, no estado do Maranhão. Foram secas, separadamente, extraídas por maceração com álcool etílico 70% por 48 horas, obtendo as soluções extrativas, as quais foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo e liofilizadas, obtendo-se o EHGP e EHG. A composição química foi avaliada por abordagem fitoquímica, CCD e HPLC/UV-Vis e a toxicidade aguda dos extratos foram avaliados frente *Danio rerio*. A composição química por CLAE-UV-vis demonstrou a predominância de compostos de baixa polaridade nos tempos de retenção a partir de 40 min. A CCD revelou a presença de saponinas, terpenos e esteroides. Os dois extratos apresentaram baixa toxicidade, sendo o EHGP com menor toxicidade (1222,38 µg/mL) quando comparado ao EHG (476,39 µg/mL). Portanto, os dados sobre toxicidade abrem perspectiva para uma futura exploração biotecnológica, sendo a geoprópolis um produto natural promissor na busca de moléculas bioativas com potencial terapêutico.

Palavras-chave: *Melipona fasciculata*. Geoprópolis. Toxicidade.

ABSTRACT

Melipona fasciculata Smith, native to Maranhão, is a stingless bee that produces honey, wax and geopropolis, which is made up of resinous material collected from plants, salivary secretions, wax and clay or earth. One species is widely cultivated in the state of Maranhão, mainly in the baixada and cerrado regions, commercially created in groups of colonies, called meliponários, that produce a meliponicultura. Studies show that a geopropolis has biological activities such as antimicrobial, leishmanicidal, antioxidant, anthelmintic, antiproliferative, showing to be a promising natural product for further research. Thus, the article aims to verify the chemical profile of the geographic extracts of the *Melipona fasciculata* Smith and to investigate the toxicity of the extracts against the zebrafish model. As samples collected directly from meliponary hives in the municipality of Pinheiro and Viana, in the state of Maranhão. They were dried, selected, extracted by maceration with 70% ethyl alcohol for 48 hours, obtaining as extractive solutions, which were filtered and concentrated in the rotary and lyophilized evaporator, obtaining the EHGP and EHG. The chemical composition was

evaluated by phytochemical approach, CCD and HPLC / UV-Vis and the acute toxicity of the extracts were caused by the front of the radius. A HPLC-UV-Vis chemical composition demonstrated a predominance of low polarity compounds in retention times from 40 min. A CCD revealed a presence of saponins, terpenes and steroids. Both extracts showed low toxicity, being EHGP with lower toxicity ($1222.38\mu\text{g} / \text{mL}$) when compared to EHG (476.39 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Therefore, toxicity data open a perspective for future biotechnological exploration, being a geopropolis a promising natural product in the search for bioactive molecules with therapeutic potential.

Keywords: *Melipona fasciculata*. Geopropolis. Toxicity

1 INTRODUÇÃO

A meliponicultura, criação de abelhas sem ferrão, é uma prática bastante antiga, desenvolvida há muitos séculos, cujos relatos dessa atividade remonta aos primórdios das civilizações antigas, no Egito Antigo (PALAZUELOS BALLIVIAN, 2008). Ainda hoje no Brasil, esta prática ainda é muito comum, sendo especialmente mantida por povos indígenas, mas também por comunidades tradicionais e camponesas, em diversas regiões do Brasil (ALVES et al., 2007).

No estado do Maranhão, a espécie *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) já vem sendo manejada há séculos pela população indígena, para produção de mel. Atualmente são criadas comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários, que constituem a meliponicultura (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997).

A espécie *Melipona fasciculata* Smith coleta material resinoso das plantas e traz para sua colmeia, mistura com cera e barro ou terra formando a geoprópolis, a qual utiliza para fechar pequenas frestas, na defesa contra invasores e vedar entradas de ventilação excessiva (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997).

A geoprópolis de *Melipona fasciculata* é composta por algumas classes de compostos químicos, como ácidos graxos, álcoois, ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis, açúcares, triterpenos e esteroides (DUTRA, 2012; ARAÚJO, 2013; BATISTA et al., 2016). Na espécie são relatadas algumas atividades biológicas: antioxidante, leishmanicida, anti-helmíntica, antimicrobiana e antitumoral (DUTRA et al., 2014; DUTRA et al., 2019; ARAÚJO, 2013; BATISTA et al., 2016; CUNHA, 2017).

O estudo da toxicidade de geoprópolis predomina com estudos de citotoxicidade *in vitro* em células tumorais e normais (DA CUNHA et al., 2013; CUNHA, 2017; SANTOS et al., 2017). Nos últimos anos, o zebrafish, conhecido como paulistinha ou peixe-zebra (*Danio rerio*) vem atraindo a atenção da comunidade científica, por ser excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas

doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos. Tem as seguintes vantagens: são peixes de pequeno porte, de manutenção fácil, econômicos para criação, com alta taxa reprodutiva, com seu genoma sequenciado e por apresentarem importante homologia com os mamíferos (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Sendo assim, o presente artigo tem como objetivo avaliar o perfil químico e investigar a toxicidade dos extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, oriundo do município de Pinheiro e Viana, Maranhão, frente ao modelo zebrafish.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DA AMOSTRA DE GEOPRÓPOLIS

Duas amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foram coletadas diretamente da colmeia do meliponário do município de Viana e Pinheiro, na região da Baixada maranhense, Maranhão. As amostras foram acondicionadas em sacos coletores estéreis e mantidas sob refrigeração até a utilização no Laboratório de Farmacognosia I da Universidade Federal do Maranhão, Campus Dom Delgado, em São Luís – MA.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA GEOPRÓPOLIS

As amostras de geoprópolis foram trituradas em moinho de facas e submetidas à maceração exaustiva com etanol 70% (v/v), hidromódulo 1:5 (p/v), filtradas, concentradas em evaporador rotativo e liofilizadas, obtendo-se o extrato hidroetanólico de geoprópolis de Pinheiro (EHGP) e o extrato hidroetanólico de geoprópolis de Viana (EHGV) (CUNHA, 2009).

2.3 PERFIL QUÍMICO

2.3.1 Abordagem química

O extrato foi submetido à abordagem química para verificação de compostos das classes dos compostos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas e alcaloides. A mudança de coloração, formação de precipitado e/ou formação de espuma foram usados para expressar os resultados das análises fitoquímicas (MATOS, 2009).

2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de ultravioleta (CLAE/UV-Vis)

A análise por CLAE/UV-Vis foi realizada num cromatógrafo líquido Finnigan Surveyor Autosampler (Thermo) (San Jose, CA, EUA), equipado com um injetor com loop de 25µL, e um detector de UV-Vis. A coluna usada foi C-18 (250 x 4,6mm, 5µm, Hypersil BDS) fornecido por Thermo Electron Corporation (Waltham, MA), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 x 3mm, 5µ, Gemini, Phenomenex). A separação dos compostos dos extratos 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 25µL e detecção foi realizada em 280nm.

2.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

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

2.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA PARA PEIXES

Os extratos foram submetidos à avaliação de toxicidade frente a peixes *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), uma espécie tropical, ovípara, onívora, de comprimento variando entre 4 e 5 centímetros vulgarmente conhecida como paulistinha ou zebrafish, usado como indicador de ecotoxicidade. O ensaio de toxicidade foi realizado por método estático, sem reposição de água, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15088, 2011), utilizando peixes adultos (3,0 a 4,0 cm). Grupos de quatro organismos foram colocados em mini-aquários (1,5L) contendo água, obedecendo a proporção de 1 grama de peixe para um litro de solução-teste. Posteriormente calculou-se as CL₅₀ para os peixes. O experimento teve duração de 48h, sendo que a cada 24h foi verificado o número de animais mortos e aferidas variáveis tais como pH, oxigênio dissolvido e temperatura. O controle negativo foi a água desclorada, sendo o controle positivo a solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). Esse ensaio foi desenvolvido conforme aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal do Maranhão.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

As concentrações letais (50%) de cada extrato foram obtidas por análise de regressão linear modelo probit (software SPSS®, versão 13.0), assumindo nível de confiança 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a caracterização do perfil químico foi realizado o ensaio fitoquímico apresentando como resultado para os extratos EHGv e EHGP a presença de taninos condensados, saponinas e esteroides (Tabela 1). Nossos resultados corroboram com os dados publicados por Cunha et al., 2009 e Cunha, 2017.

Tabela 1. Avaliação qualitativa e semiquantitativa de constituintes químicos dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

	EHGV	EHGP
Fenois	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	-
Taninos condensáveis, Antocianidinas, Antocianinas	++	-
Flavonas, Flavononas, Xantonas	-	-
Flavononois	-	-
Saponinas	+	++
Alcalóides	-	-
Eseroides	+	+
Triterpenos	++	+

* Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semiquantitativa de constituintes químicos realizados em triplicata nos extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, sendo EHGv, extrato hidroetanólico de geoprópolis de Viana; EHGP, extrato hidroetanólico de geoprópolis de Pinheiro. Critérios quanto ao grau de intensidade dos constituintes analisados: (+++) resultado fortemente positivo, (++) resultado moderadamente positivo, (+) resultado fracamente positivo e (-) resultado negativo.

Também foi possível verificar o perfil fitoquímico das amostras a partir da análise por cromatografia em camada delgada (CCD) das amostras de EHGv e EHGP (Figura 1). Desta forma, as amostras apresentaram bandas de coloração lilás, após aplicação do revelador químico anisaldeído sulfúrico que quando em contato com as substâncias da amostra, as tornam coloridas e visíveis. O anisaldeído sulfúrico revelou a presença das classes saponinas, terpenose esteroides através das manchas observadas em lilás. Substâncias triterpênicas têm sido detectadas em própolis tropicais de *Apis mellífera* e geoprópolis (DUTRA et al., 2012; DUTRA et al., 2014; CUNHA, 2017). No cromatograma foi observada também presença de compostos majoritários nas amostras de EHGv e EHGP e similaridade do perfil cromatográfico entre as amostras.

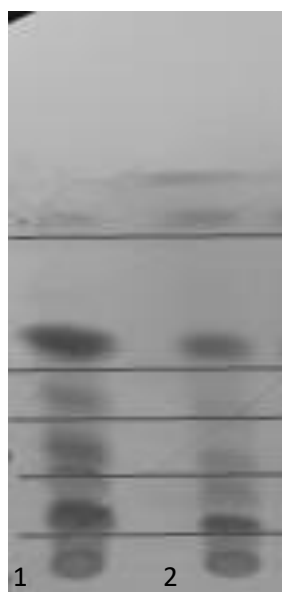


Figura 1. Cromatograma obtido por CCD de amostras de extratos hidroetanólicos de geopropolis, analisadas após aplicação do revelador químico anisaldeído sulfúrico. 1 = EHGv; 2 = EHGP.

O perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV comprovou a predominância de compostos apolares nos tempos de retenção a partir de $T_r \cong 40$ min presente nos extratos EHGv (Figura 2) e EHGP (Figura 3). Também foi possível observar que os extratos embora tenham sido coletados de municípios diferentes (Viana e Pinheiro), por ambos os municípios estarem localizados na região da baixada maranhense, os extratos apresentam perfil cromatográficos semelhantes (Figura 4).

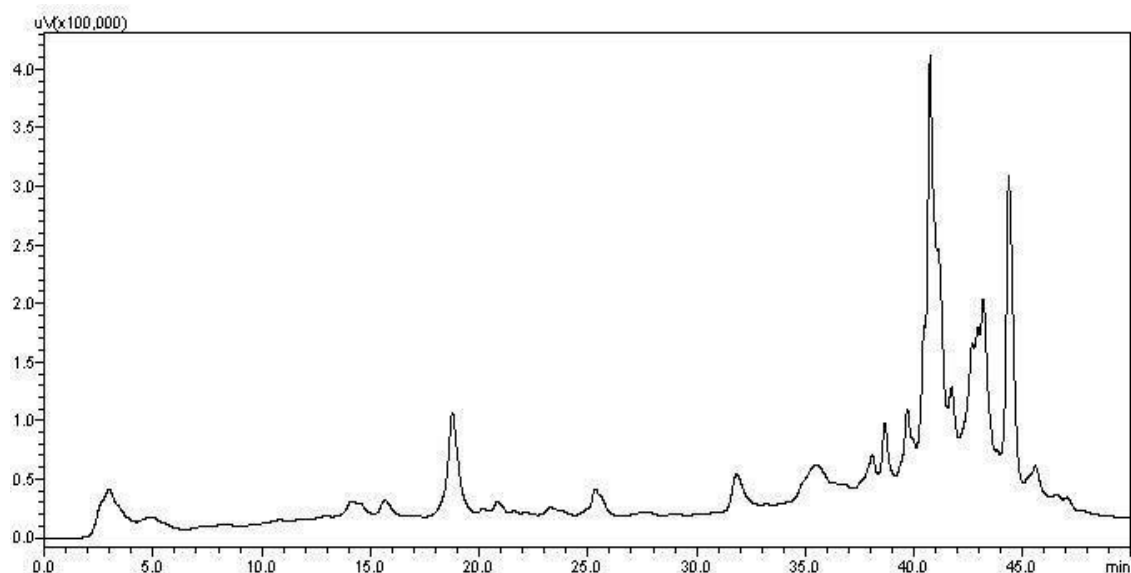


Figura 2. Cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHG.

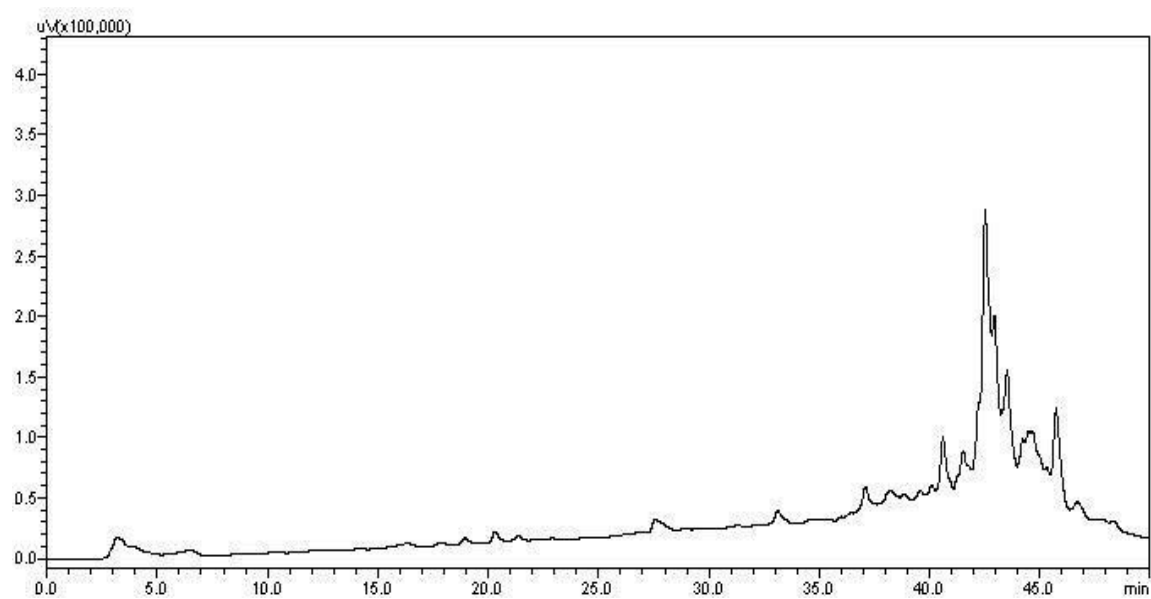


Figura 3. Cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHG.

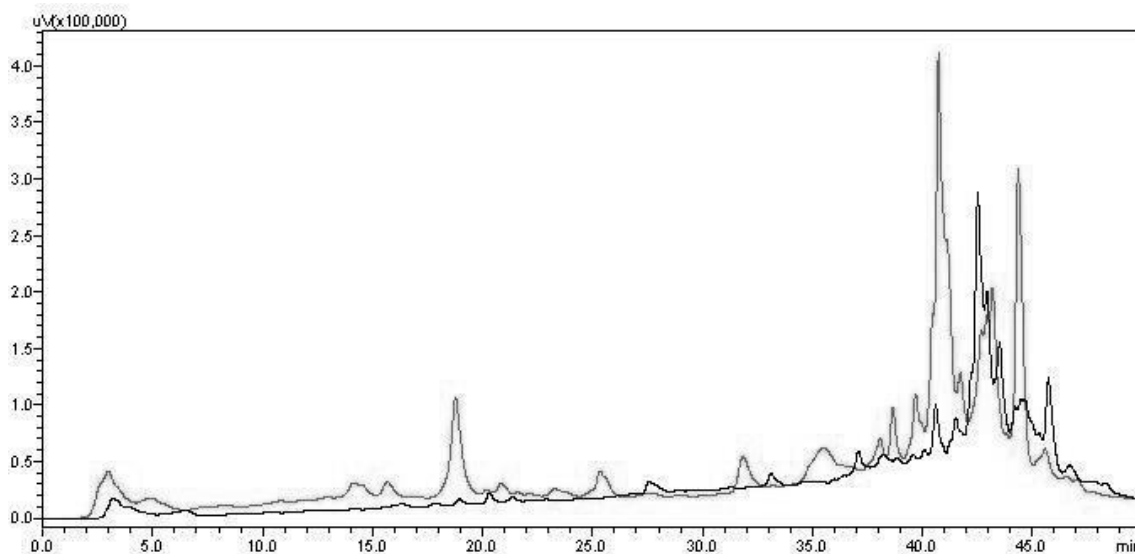


Figura 4. Sobreposição dos cromatogramas obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no comprimento de onda (λ) de 254 nm do extrato EHGV (cor lilás) e EHGP (cor preta).

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 apresenta composição química com presença de compostos polifenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides (ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2012; BATISTA, 2011); taninos hidrolizáveis (DUTRA et al., 2014), triterpenos, esteroides e saponinas (BATISTA et al, 2016; ARAUJO et al, 2015; CUNHA, 2017), ácidos graxos, (CUNHA, 2013; SILVA et al., 2013, BATISTA et al, 2016) e benzofenonas (CUNHA, 2017) . Desta forma, nossos resultados do perfil químico demonstrados a partir da CCD e HPLC dos extratos EHGP e EHGV no qual apresentam a predominância de compostos apolares e as classes saponinas, terpenos e esteroides corroboram com os dados da literatura.

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado através da exposição dos extratos em *Danio rerio* (Tabela 2). Os resultados mostram que o EHGP apresentou menor toxicidade (1222,38 μ g/mL) quando comparado ao EHGV (476,39 μ g/mL).

Tabela 2. Ensaio de toxicidade dos extratos frente *Danio rerio*.

Toxicidade aguda em <i>Danio rerio</i>	
Amostra	CL₅₀ (µg/mL)
EHGP	1222,38*
EHGV	476,39*

* Concentrações letais obtidas após 48 horas de exposição aos extratos.

Não há relatos na literatura da avaliação da toxicidade aguda de geoprópolis em modelo zebrafish. SILVA, MUNIZ & NUNOMURA (2013) estudaram a toxicidade de extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* em *Artemia salina* que apresentou valor médio da CL₅₀ de 1282,61 µg/mL.

O zebrafish é um pequeno teleósteo usado como organismo modelo em diversas áreas das ciências. Por apresentar bases moleculares da neurobiologia e o genoma similar ao dos humanos proporcionam o seu uso em diversos tipos de estudos, que incluem toxicológicos, genéticos e patológicos (BARBAZUK et al., 2000).

O crescimento no número de artigos publicados usando o zebrafish está diretamente ligado ao crescente conhecimento sobre esta espécie. O sequenciamento do genoma, iniciado pelo Instituto Senger em 2001, possibilitou o uso em diversos estudos genéticos (STERN; ZON 2003). Pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo uma vez que o seu genoma apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

4 CONCLUSÃO

Os extratos hidroetanólicos de geoprópolis de Pinheiro e Viana, do estado do Maranhão apresentaram composição química predominante de composto de baixa polaridade. Além disso, os dois extratos apresentaram baixa toxicidade. Sendo assim, são necessários estudos complementares para identificação química dos compostos através de técnicas mais refinadas.

Os resultados obtidos do perfil químico permitem obter parâmetros de controle qualidade para geoprópolis e seus derivados da Baixada maranhense e juntamente com os dados sobre toxicidade abrem perspectiva para uma futura exploração biotecnológica. Considerando que a região é uma grande produtora de mel, produto base do negócio apícola e meliponícula, o conhecimento do perfil químico e a toxicidade da geoprópolis agrega valores a mais um produto deste setor, contribuindo para o desenvolvimento da meliponicultura no estado do Maranhão.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMA pelo suporte financeiro para realização do trabalho e pela bolsa de doutorado de Josianne Rocha Barboza. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica de Francisco Assis Nascimento Pereira.

REFERÊNCIAS

ABNT. Ecotoxicologia aquática: Toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. NBR 15088: 2011. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011.

ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; SODRE, G. S.; FONSECA, A. A. O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. Mensagem Doce, v. 91, p. 2-8, 2007.

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, v.8, n.1, p.18-24, 2006.

ARAÚJO, M. J. A. M. Geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith: ações citotóxicas, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu/SP, 2013.

ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO, M.C.; CONTI, B.J.; 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, n.1, p.12-20, 2015.

BARBAZUK, W.B., KORF, I., KADAVI, C., HEYEN, J., TATE, S., WUN, E., BEDELL, J.A., MCPHERSON, J.D., JOHNSON, S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. Genome Res., v.10, n.1, p.1351-1358, 2000.

Brazilian Journal of health Review

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 Amazônica*. v.46, n.3, p.315-322, 2016.

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

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

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

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 Agriculture Food Chemical*, v. 26, n.1, p. 2549-2557, 2014.

DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; SILVA, M. C. P.; BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial activity

Brazilian Journal of health Review

and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.29, n.1, p.287-293, 2019.

KARI, G.; RODECK, U; DICKER, A.P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v.82, n.1, p.70-80, 2007.

KERR, W. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. *Informe Agropecuário*. v.13, n.1, p.15-27, 1987.

LIESCHKE, J.G.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews-Genetics*, v.8, n.5, p.353-367, 2007.

MATOS, F.J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

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

PALAZUELOS BALLIVIAN, J. M. P. Abelhas nativas sem ferrão – Mÿg. São Leopoldo, Oikos, 2008.

SANTOS, C. M., CAMPOS, J. F., SANTOS, H. F., BALESTIERI, J. B. P., SILVA, D. B., PICOLI SOUZA, K., CAROLLO, C. A., ESTEVINHO, L. M., & SANTOS, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2017, n.1, p.1-14, 2017.

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

STERN, H.M.; ZON, L.I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev. Cancer*, v. 3, n.7, p.533-539, 2003.

5.2 CAPÍTULO 2 – ARTIGO

Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith

Artigo publicado na revista **Biology**

Qualis: A1

Fator de Impacto: 5.079

ISSN 2079-7737

Josianne Rocha Barboza^{1*}, Francisco Assis Nascimento Pereira¹, Renan Amphilophio Fernandes², Cleydlenne Costa Vasconcelos³, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes³, Alberto Jorge Oliveira Lopes^{1,3}, Andréia Cristina de Melo⁴, Isabella dos Santos Guimarães⁴, Cláudia Quintino da Rocha^{5*} and Maria Nilce de Sousa Ribeiro¹

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

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, Av. dos Portugueses, 1966, 65080-805, São Luís, Maranhão, Brazil.

⁴Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, 20231-050, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, Av. dos Portugueses, 1966, 65080-805, São Luís, Maranhão, Brazil



Article

Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith

Josianne Rocha Barboza ^{1,*}, Francisco Assis Nascimento Pereira ¹, Renan Amphiphio Fernandes ², Cleydlenne Costa Vasconcelos ³, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes ³, Alberto Jorge Oliveira Lopes ^{1,3}, Andreia Cristina de Melo ⁴, Isabella dos Santos Guimarães ⁴, Cláudia Quintino da Rocha ^{5,*} and Maria Nilce de Sousa Ribeiro ¹

- ¹ Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Campus Bacanga, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís 65080-805, Maranhão, Brazil; franciscopho2015@gmail.com (F.A.N.P.); lopesajo@gmail.com (A.J.O.L.); mnsousaribeiro@gmail.com (M.N.d.S.R.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21041-250, Rio de Janeiro, Brazil; renan_yako@hotmail.com
- ³ Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Campus Bacanga, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís 65080-805, Maranhão, Brazil; cleydlenne@yahoo.com.br (C.C.V.); scartagenes@gmail.com (M.d.S.d.S.C.)
- ⁴ Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico, Instituto Nacional de Câncer, Rua André Cavalcanti, 37, Rio de Janeiro 20231-050, Rio de Janeiro, Brazil; andreia.melo@inca.gov.br (A.C.d.M.); isasguimaraes@hotmail.com (I.d.S.G.)
- ⁵ Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química, Campus Bacanga, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís 65080-805, Maranhão, Brazil.

*Correspondence: josi.anne.r@hotmail.com (J.R.B.); claudiarochoa3@yahoo.com.br (C.Q.d.R.); Tel.: +55-98-3272-9243 (C.Q.d.R.)



check for updates

Received: 3 August 2020; Accepted: 9 September 2020; Published: 15 September 2020

Abstract: Geopropolis is produced by some stingless bee species, such as *Melipona fasciculata* Smith, a native species from Brazil. This study aims to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activities and cytotoxicity effects of geopropolis hydroethanolic extracts against lung (H460 and A549) and ovarian (A2780 and ES2) cancer cell lines and non-tumor (HUVEC) cell lines using chemical identification by LC/MS/MS analysis and in silico assays to determine which compounds are associated with bioactivity. The antioxidant activity of extracts and inhibitory activity against COX enzymes were assessed by in vitro assays; cytotoxicity effect was evaluated by the MTT assay; cell cycle was assessed by flow cytometry and apoptosis by Western blotting. The geopropolis extracts showed great radical scavenging potential, preferential inhibition of COX-2, decreased cancer cell viability, non-cytotoxic effects against the non-tumoral cell line, besides modulating the cell cycle and inducing cancer cell apoptosis through the activation of caspase-3 and PARP protein cleavage. The in silico study suggests that corilagin, typhaneoside, taraxerone and marsformosanone, identified by LC/MS/MS, can be associated with anti-inflammatory activity and cytotoxic effects. Thus, the current study suggests the potential of geopropolis concerning the research field of new pharmacological alternatives regarding cancer therapy.

Keywords: natural products; antitumor activity; new anticancer agents; apoptosis pathway; molecular docking; drug discovery

1. Introduction

Cancer arises from the gradual accumulation of genetic alterations that increase cell proliferation [1]. It is the second main cause of death and has been recognized as one of the major public health problems worldwide. In 2018 alone, over 18 million new cancer cases were reported and over 9.5 million deaths by cancer were recorded worldwide, according to GLOBOCAN [2].

The gold standard treatment consists of the use of chemical neoplastic agents such as alkylating agents, antimetabolites, topoisomerase inhibitors and mitotic inhibitors which, in many cases, no longer present encouraging results and result in severe side effects [3]. Therefore, the development of new alternative drugs exhibiting low toxicity, high efficiency and the ability to prevent cell proliferation and/or promote apoptosis has become the major focus of cancer therapy in recent years [4,5].

In addition to apoptosis-inducing drugs, anti-inflammatory agents selective for cyclooxygenase 2 enzyme (COX-2) are traditionally reported to be an effective adjuvant strategy for cancer therapy. COX-2 is involved in several malignant neoplasm processes, such as in the promotion of apoptotic resistance and in the proliferation, angiogenesis, inflammation, invasion and metastasis of cancer cells. Therefore, the use of COX-2 inhibitors is significant in managing metastasis risk reduction attempts in cancer patients while also resulting in higher susceptibility of cancer cells to gold standard treatments, such as radio and chemotherapy, resulting in better treatment efficiency [6].

Currently, the search for natural products exhibiting potential in cancer therapy has become prominent [7,8]. Geopropolis, a natural product derived from stingless bees, is noteworthy among natural products, displaying the highest potential in this regard.

Geopropolis is produced by stingless bees, formed by resinous material from plants collected by the bees, salivary bee secretions, wax, and clay or soil [9]. *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith 1858 (*Apidae, Meliponini*) is a stingless bee species cultivated for centuries by the indigenous population and small producers of Baixada (flooded fields) and Cerrado (Brazilian savannah) areas in Maranhão, a northeastern Brazilian state, to produce honey, geopropolis, wax and pollen [10,11].

Several geopropolis biological properties have been reported, including antinociceptive and anti-inflammatory [12–14], immunomodulatory [15,16], antimicrobial [14,17,18], antileishmanial [19] and antioxidant activities [19–23].

The antitumoral activity of *M. fasciculata* geopropolis has been previously evaluated against canine osteosarcoma (OSA) cells and cytotoxic effects have been reported in human leukemia monocytic cell lines [24,25]. However, the cytotoxic action of *M. fasciculata* geopropolis in other tumor cell lines has not yet been investigated.

In this context, this research aimed to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of hydroethanolic geopropolis extracts produced by *M. fasciculata*, identifying its chemical composition and correlating the identified compounds with detected biological activities through *in silico* assays and, finally, to contribute to the bioprospecting of new products exhibiting antitumor activity.

2. Materials and Methods

2.1. Geopropolis Samples

Two geopropolis samples of *M. fasciculata* Smith were collected in April 2018 being taken directly from the internal parts of a beehives located in meliponary in Viana (03°13'13" S and 45°00'13" W) and Pinheiro (02°31'17" S and 45°04'57" W) municipalities in the "Baixada" (flooded fields area, Brazil) from Maranhão State, northeast Brazil. After collection, the geopropolis samples were separated, identified, stored in a sterile recipient and kept at 4 °C until preparation of extract and further analysis. As determined by Brazilian legislation for research that uses the Brazil's genetic heritage, this research is registered on National System of Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under code ABCEA59.

2.2. Extraction of Samples

The in natura geopropolis samples were processed as described by our research group in Dutra et al. [21]. The geopropolis was triturated until powder (200 g) and were individually extracted by maceration with 70% ethanol/water (70:30, *v/v*) for 6 days at a solid:solvent ratio of 1 to 5 (*w/v*), with solvent renewal after 72 h. The resulting product from extractions was combined, filtered, concentrated in a rotary evaporator under vacuum at 40 °C, and lyophilized, obtaining the hydroethanolic geopropolis extract (EHGV) (Viana sample) and EHGP (Pinheiro sample) and kept refrigerated until their use.

2.3. Determination of Antioxidant Activity

2.3.1. DPPH• Radical Scavenging Activity

The antioxidant activity of hydroethanolic geopropolis extracts was evaluated by using the DPPH• free radical scavenging assay as described by Brand–Willians [26] with modifications as described by our research group in Dutra et al. [21]. The samples of geopropolis extracts were solubilized on methanol at concentrations (30–480 µg/mL) and added to a methanol solution of DPPH• (40.0 µg/mL). After 30 min of reaction at room temperature in the dark, the absorbance of each solution was read at 517 nm in a Lambda 35 UV–Vis spectrophotometer (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Methanol ACS was used as blank, and DPPH• solution was used as negative control. Trolox® (positive control) standards were treated under the same conditions as the samples. The percent inhibition was calculated using the formula

$$\text{DPPH}\bullet \text{ scavenging activity (\%)} = 100 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times 100/A_{\text{control}}$$

where A_{sample} = absorbance of the sample after 30 min of reaction, A_{blank} = absorbance of the blank, and A_{control} = absorbance of the control.

The results were expressed as inhibitory concentration at 50% (IC_{50}). All experiments were performed in triplicate.

2.3.2. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay (FRAP)

The method described by Benzie et al. [27] with some modifications as described by our research group in Dutra et al. [21] was used to assessment the antioxidant activity based on iron reduction using the FRAP assay, measuring the ferric-reducing ability of a sample in acid medium (pH 3.6) through the formation of an intense blue color as the ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex due reduction to the ferrous (Fe^{2+}) form. The samples of hydroethanolic geopropolis extracts were solubilized in methanol at different concentrations (12.5–200 µg/mL). The absorbance of the reaction mixture was read at 593 nm in a Lambda 35 UV–Vis spectrophotometer (PerkinElmer, Inc., USA) using FRAP solution as a blank. The calibration curve was constructed using different concentrations of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0–2000 µM) ($R^2 = 0.9892$), and the results are expressed as millimoles of Fe^{2+} per gram of sample. Trolox® standard was set as positive control. The results were expressed as millimoles of Fe^{2+} per gram of sample. All experiments were done in triplicate.

2.3.3. ABTS•⁺ Assay

The ABTS•⁺ method (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) was carried out as described by Re et al. [28] with modifications by our research group in Lopes et al. [11]. For formation of the ABTS radical, the 7 mM ABTS•⁺ solution was mixed with 2.45 mM of potassium persulfate solution. This mixture was maintained in a dark room for 16 h for the complete oxidation of ABTS and the generation of the highly stable chromophore cation radical 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•⁺). The radical was diluted in 70% ethanol/water (70:30, *v/v*) to an absorbance of 0.700 ± 0.020 as read at 734 nm. Readings were performed

by reacting 20–1000 $\mu\text{g/mL}$ of hydroethanolic geopropolis extracts with the ABTS \bullet^+ solution. All studies were performed at least in triplicate, monitoring the decrease in absorbance for 6 min; reported results correspond to the % of remaining chromophores compared to conditions in the absence of antioxidants. The IC_{50} values were determined to each sample, using the formula

$$\text{Scavenging ability (\%)} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}}) \times 100.$$

2.4. *In Vitro* COX Inhibition

The assay was performed according to the manufacturer's recommendations (COX Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit—Item No. 701050—Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, USA), as previously described by our research group in Lopes et al. [11]. Using 96-well microplates, the geopropolis extracts were evaluated at three different concentrations (2, 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$) against COX-1 and COX-2 isoforms. After reagents and plates preparations following the manufacturer's kit data sheet, the colorimetric analysis was performed, using arachidonic acid as the substrate of the COX-catalyzed enzyme reaction, and the plates were read at 590 nm.

2.5. Cell Culture and Morphological Analysis

A panel of four cancer cell lines (H460, A549, ES2 and A2780) and non-cancer cell (HUVEC) were selected for this study. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines A549 and H460, and ovarian cancer cell lines ES2 and A2780 were maintained in RPMI-1640 (Gibco, New York, NY, USA) supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS) (Gibco, New York, NY, USA), 1% (*v/v*) stabilized with penicillin solution (100 units/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) (Gibco, New York, NY, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, New York, NY, USA) supplemented with 10% (*v/v*) FBS (Gibco, New York, NY, USA), 1% (*v/v*) stabilized penicillin solution (100 units/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) (Gibco, New York, NY, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Short tandem repeat (STR) analysis was performed in all four cell lines to confirm cell line identity. The cell morphology was examined using an inverted Zeiss Observer Z1 microscope and images were captured using Axio-Vision Rel. 4.8 software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

2.6. Cytotoxicity Activity

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays were used to measure the cytotoxic effects of (EHGV and EHGP) and cisplatin (CDDP) (LIBBS, SP, Brazil) on human cancer cell lines and non-tumoral cells. Stock solutions of 1000 mg/mL of EHGV and EHGP were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Desired concentrations of each drug were prepared by dilution with culture medium before use. The cell lines were seeded (1×10^4 cells/well) at 96-well plates and after 24 h, were treated with EHGV and EHGP for 48 h and 72 h. Cells were subsequently incubated with 20 μL of MTT solution (5 mg/mL) for 4 h. The plates were then centrifuged at $450 \times g$ and to allow solubilization of the formazan crystals. Then, 100 μL of DMSO was added to each well and spectrophotometric absorbance reading at a wavelength of 538 nm was performed using Flex-Station 3 (Molecular Devices Corporation, San Jose, CA, USA). As negative control for the experiments, we used the cells without treatment. We also treated cells with vehicle control (10% DMSO *v/v*). All experiments were performed in quadruplicates. The half maximal cell growth inhibitory concentrations (GI_{50}) values were estimated using GraphPad Prism version 8 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

2.7. Cell Cycle and DNA Content Analysis by Flow Cytometry

The DNA content and cell cycle distribution of tumor cells treated with EHGV were determined by flow cytometry after propidium iodide staining. Cells were seeded onto 6-well plates, and after 24 h, were treated with EHGV. The cells were subsequently collected and washed in phosphate-buffered saline (PBS) followed by incubation with Nicoletti buffer (0.1% NP-40 (*w/v*), 0.1% sodium citrate (*w/v*), 200 $\mu\text{g/mL}$ RNase and propidium iodide 50 $\mu\text{g/mL}$) at 4 °C for 30 min in the dark [29].

Doublets and debris were identified and excluded. The samples were acquired at the low flow rate and at least 20,000 cells were counted for each analysis. The distribution of cells in each phase of the cell cycle was displayed as histograms. The stained samples were analyzed with FACSCalibur flow cytometry (BD, San Jose, CA, USA) and the results were analyzed using FlowJo software (FlowJo, LLC, Glendale, CA, USA).

2.8. Western Blotting

To analyze apoptosis, cells were trypsinized and plated into a six-well plate, and after 24 h, treated with EHG (15.62 and 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CDDP (10 μM) for 48 h. Then, cells were lysed in 2 \times radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was determined using the DC Protein Assay kit (BioRad, Hercules, CA, USA). Equivalent amounts of protein (50 μg) were separated by SDS-PAGE. The gels were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes and blocked with 5% skim milk. Membranes were then incubated with primary antibodies against cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Before blocking, the membranes were incubated with 1% glutaraldehyde for 30 min for the analysis of cleaved caspase-3 expression [30]. Detection was visualized with the ECL prime reagent (GE Healthcare, Sao Paulo, Brazil) and the images were then captured on a ChemiDoc Imaging system (Biorad, Hercules, CA, USA) using Image Lab software (Biorad, Hercules, CA, USA).

2.9. LC-ESI/IT-MS/MS Analysis

The EHG and EHP were analyzed by LC-ESI/IT-MS/MS (LC-20AD Shimadzu, Kyoto, Japan) and a Phenomenex Luna C-18 (250 \times 4.6 mm, 5 μm) column at 25 $^{\circ}\text{C}$ was used. The mobile phase used was Milli-Q water (Millipore) with 0.1% formic acid (eluent A) and methanol (eluent B). Elution was performed on a linear gradient of 0 min–10% B; 1–40 min–100% B; 40–60 min–100% B. EHG and EHP were diluted in methanol and 0.1% Milli-Q water of formic acid at the final concentration of 30 mg/mL and filtered through a nylon filter (0.22 μm , Allcrom Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil). The samples volume injected into the system was 10 μL , with a flow rate of 1 mL/min and UV-Vis detection at 254 nm. The LC was coupled to a mass spectrometer (Amazon Speed ETD, Bruker, MA, USA) equipped with electrospray ionization (ESI) and an ion trap (IT) type analyzer in negative mode under the following conditions: 4.5 kV capillary voltage, capillary temperature of 325 $^{\circ}\text{C}$ entrainment gas (N_2) flow 12 L/min , nitrogen nebulizer at a pressure of 27 psi. The acquisition range was m/z 100–1000, with two or more events. The compounds were identified on the basis of the molecular ion mass fragmentation.

2.10. In Silico Assay

2.10.1. Predictive Models and Theoretical Calculations

The metabolites identified in EHG were schematically designed in 3D models on GaussView 5.0.8 [31] and had their geometric, electronic and vibrational properties optimized with Gaussian 09 [32] using the density functional theory (DFT) method, combining the hybrid functional B3LYP and the basis set 6-31 ++ G (d, p).

2.10.2. Molecular Docking (MD)

All MD protocol utilized Autodock Vina [33]. The structure of the human cyclo-oxygenase 2 (COX-2) (PDB ID 5F19) and nuclear factor kappa-B (NF- κB) NEMO/IKK β association (PDB ID 3BRV) and ligands were prepared for MD with AutoDock Tools, version 1.5.7 [34]. Docking methodology described in literature were used [35] with some modifications [36,37]. Gasteiger partial charges

were calculated after addition of all hydrogens both in ligands, COX-2 and NEMO/IKK β association structures. Non-polar hydrogens from COX-2, NEMO/IKK IKK β and EHG ν metabolites were subsequently merged. The dimensions of cubic box in the x -, y - and z -axes were $30 \times 30 \times 30$. Grid box was centered on oxygen atom from residues Arg120 from COX-2 and Glu89 of NEMO domain. In addition to visual inspection, the initial coordinates of interaction complexes were chosen based on the criterion of better docking conformation of the lowest energy score.

2.11. Statistical Analysis

Statistical analyzes between groups were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. The results that presented probability of occurrence of null hypothesis lower than 5% ($p < 0.05$) were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPadPrism 8 software.

3. Results

3.1. Antioxidant Activity

The results show that EHG ν had the highest antioxidant activity with DPPH IC₅₀ ($76.16 \pm 1.05 \mu\text{g/mL}$). In the FRAP assay, EHG ν also showed a higher ferric reduction ($2.91 \pm 0.12 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$) compared to EHGP ($1.10 \pm 0.25 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$). Regarding the ABTS \bullet^+ IC₅₀, EHG ν was also the sample with high antioxidant activity ($13.28 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) (Table 1). All differences found were statically significant ($p < 0.05$).

Table 1. Antioxidant activity (DPPH \bullet , FRAP, ABTS \bullet^+) of hydroethanolic geopropolis extract produced by *Melipona fasciculata* Smith.

	DPPH \bullet IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /g)	ABTS \bullet^+ IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
EHG ν	76.16 ± 1.05^a	2.91 ± 0.12^a	13.28 ± 0.11^a
EHGP	265.91 ± 0.29^b	1.10 ± 0.25^b	58.94 ± 0.09^b
Trolox ¹	3.05 ± 0.61	8.41 ± 0.28	3.69 ± 0.63

Values represent the mean of triplicate measurements standard deviation. Different letters in the same column indicate a significant difference (Tukey $p < 0.05$). EHG ν —hydroethanolic geopropolis extract of *M. fasciculata* from Viana city, Maranhão State, Brazil; EHGP—hydroethanolic geopropolis extract of *M. fasciculata* from Pinheiro city, Maranhão State, Brazil; DPPH \bullet : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; FRAP: ferric reducing antioxidant power; ABTS \bullet^+ : 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid.

3.2. COX Inhibition Assay

Both EHG ν and EHGP were tested for their ability to inhibit COX-1 and COX-2 enzymes. EHG ν showed high COX-2 inhibitory activity (44% and 61% at 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively) with less than 5% inhibition of COX-1 at 50 $\mu\text{g/mL}$. EHGP shown a minor potential for COX-2 inhibition at the same concentrations and had COX-1 inhibition next to 10% (Figure 1).

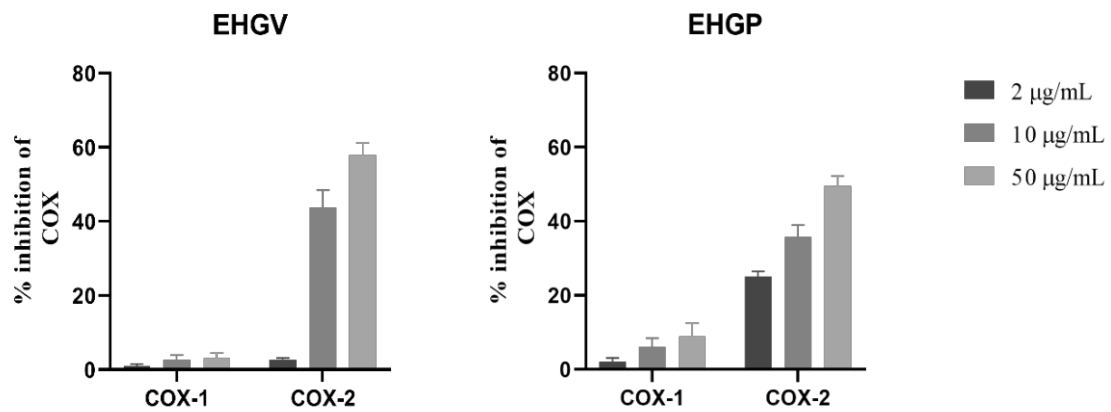


Figure 1. Percental *in vitro* inhibition of COX-1 and 2 produced by hydroethanolic geopropolis extracts produced by *M. fasciculata* stingless bee obtained in Viana (EHGV) and Pinheiro (EHGP) cities, Maranhão State, Northeast of Brazil.

3.3. Cell Culture and Morphological Analysis

To assess the antitumoral activity of EHGV, we firstly treated A2780 ovarian cancer cells with 15.62, 31.25 and 62.5 µg/mL EHGV for 48 h. Morphological differences were observed between the EHGV-treated, control cells and cells treated with 10% DMSO (*v/v*) (vehicle) (Figure 2A,B vs. Figure 2D–F). It is possible to observe that after treatment with EHGV, the cells become rounded and shrunken and detached themselves from the substrate. These morphological changes were absent in control cells and cells treated with vehicle (Figure 2). Morphological changes are valuable for determining the preliminary potential of anticancer activity of EHGV. As positive control, we used CDDP (10 µM) at a clinically relevant concentration [38] (Figure 2C).

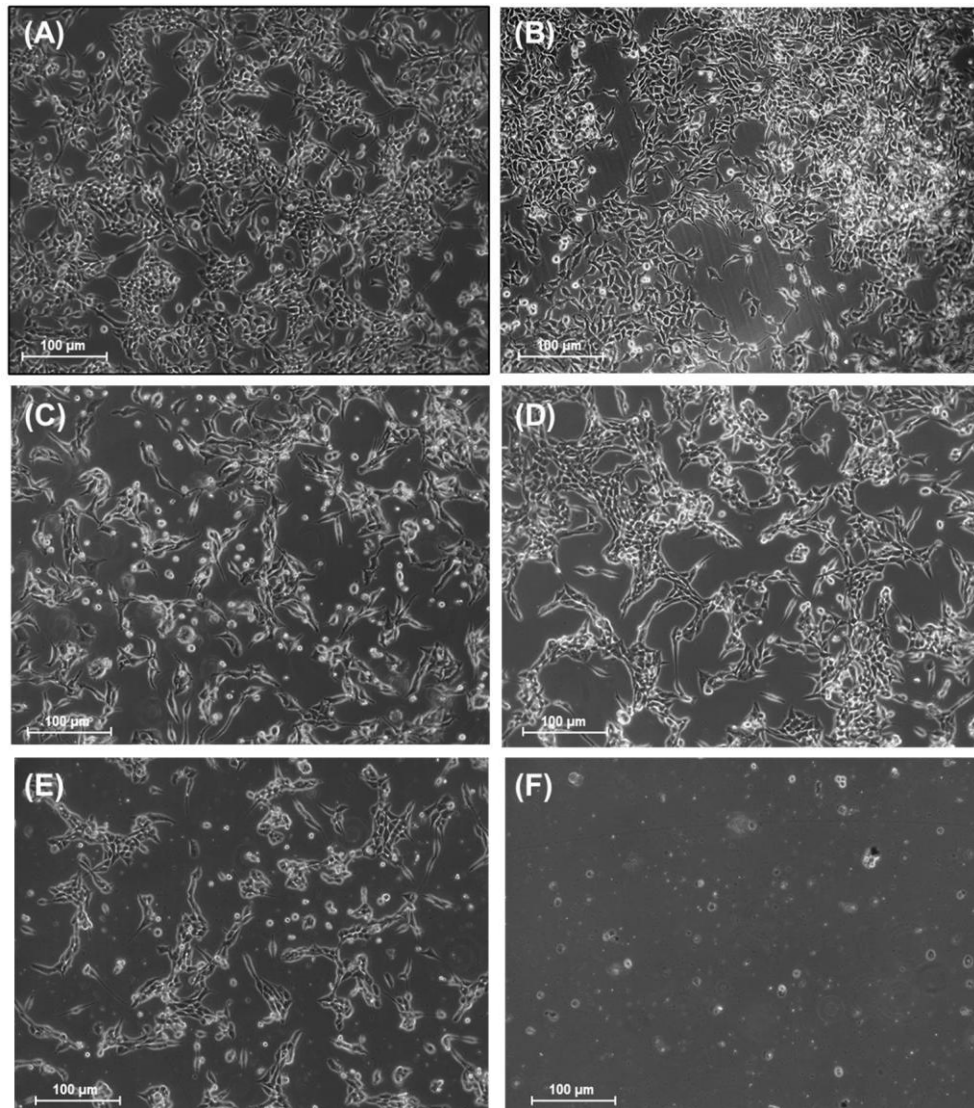


Figure 2. Analysis of morphological changes in A2780 tumor cells treated with EHG. (A) Untreated A2780 control cells; (B) A2780 cells treated with vehicle (10% (*v/v*) DMSO); (C) A2780 cells treated with CDDP 10 μM ; (D-F) A2780 cells treated with 15.62, 31.25 and 62.5 $\mu\text{g/mL}$ EHG, respectively. Cells were exposed to various concentrations of EHG, CDDP and DMSO vehicle control and morphological changes were observed following 48 h of treatment. The cells were photographed (magnification 10 \times) with Axio-Vision Rel. 4.8 software. Scale bar = 100 μm .

3.4. Cytotoxic Activity

Then, we assessed the cytotoxic activity of EHG and EHGP in lung cancer (A549 and H460), ovarian cancer (ES2 and A2780) and non-tumoral (HUVEC) cell lines treated with increasing concentrations of EHG and EHGP for 48 and 72 h. The results obtained through the MTT assay revealed that the extracts decreased the percentage of cell viability for ovarian (A2780 and ES2) and lung (A549 and H460) cancer cells in a dose- and time-dependent manner. The EHG and EHGP extracts showed greater cytotoxicity in the highest concentrations evaluated and in the longer incubation time with the extract. EHG extract demonstrated high cytotoxic effect in the 48 and 72 h time compared to EHGP. Among the seven concentrations used, it was observed that from 31.25

$\mu\text{g/mL}$, the EHG extract already demonstrated the capacity to inhibit percentage growth (Figure 3).

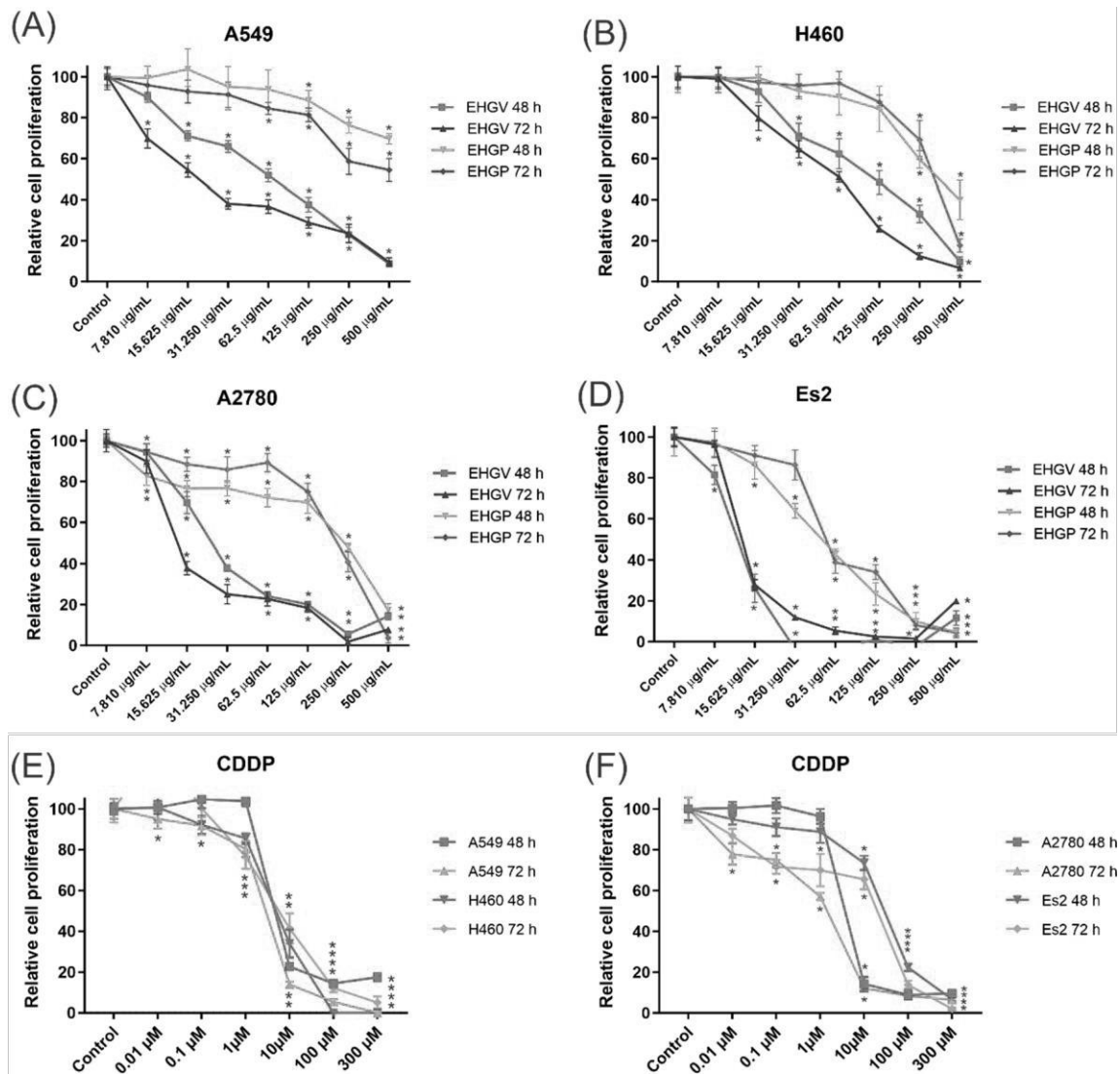


Figure 3. Effects of EHG and EHGP in A549 (A), H460 (B), A2780 (C), Es2 (D) and CDDP (E,F) in four cancer cell lines at 48 and 72 h with statistical results. 2-way ANOVA with Tukey post-test. (* indicates $p \leq 0.05$; vs. control).

Due to the high cytotoxicity for normal cells and numerous side effects caused by most of the traditional chemotherapy drugs used nowadays, we evaluated the cytotoxicity effects of EHG and EHGP extracts against non-malignant HUVEC cells. As observed in Figure 4A, treatments with EHG and EHGP for 48 and 72 h showed a non-significant influence on the cell viability of HUVEC cells. EHG and EHGP at the most elevated concentration (500 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h barely maintained cell viability in more than 80% ($80.85 \pm 5.90\%$ and $89.54 \pm 6.49\%$, respectively) of HUVEC cells. Importantly, when HUVEC cells were treated with CDDP, an extensively used chemotherapeutic drug for lung and ovarian cancer, we observed a decrease in cell viability in 48 and 72 h. We highlight the treatment with 10 μM , considered a clinically relevant concentration of CDDP, that markedly reduced cell viability close to 80% (only $17.61 \pm 6.20\%$ and $13.87 \pm 4.01\%$ of cell viability) in 48 and 72 h, respectively (Figure 4B). Collectively, these findings show that the present extracts exerted significant cytotoxic effects on cancer cells while showing low toxicity against non-malignant HUVEC cell lines.

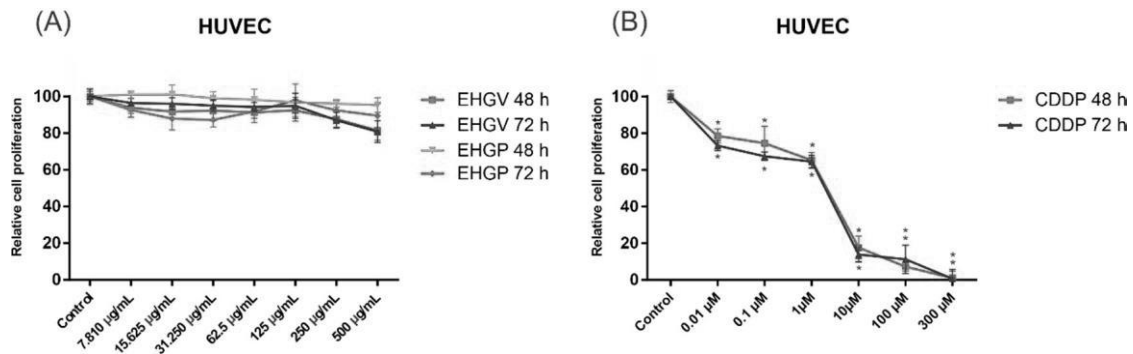


Figure 4. Effects of EHGV and EHGP (A) and CDDP (B) in non-tumor cells, HUVEC at 48 and 72 h with statistical results. 2-way ANOVA with Tukey post-test (* indicates $p \leq 0.05$; vs. control).

The values for cell growth inhibition (GI_{50}) of the EHGP and EHGV extracts were determined individually by the MTT assay over 48 and 72 h in the A2780, Es2, A549, H460 and HUVEC cell lines and are shown in Table 2. The results show that the EHGV extract significantly inhibited A2780 and A549 and was the most potent extract with an GI_{50} value of 16.92 $\mu\text{g/mL}$ for A2780 and 22.64 $\mu\text{g/mL}$ for A549 (Table 2).

Table 2. Cell growth inhibition (GI_{50}) in $\mu\text{g/mL}$ of EHGP and EHGV for inhibition of cell proliferation in cancer cell lines (A2780, ES2, A549, H460) and normal cells (HUVEC).

Time	Sample	Cell Line				
		A2780	ES2	H460	A549	HUVEC
48 h	EHGV	313.6 $\mu\text{g/mL}$	133.1 $\mu\text{g/mL}$	105.4 $\mu\text{g/mL}$	105.4 $\mu\text{g/mL}$	113300 $\mu\text{g/mL}$
	EHGP	177.4 $\mu\text{g/mL}$	51.4 $\mu\text{g/mL}$	360.6 $\mu\text{g/mL}$	1122 $\mu\text{g/mL}$	40650 $\mu\text{g/mL}$
72 h	EHGV	16.92 $\mu\text{g/mL}$	137.7 $\mu\text{g/mL}$	56.51 $\mu\text{g/mL}$	22.64 $\mu\text{g/mL}$	5537 $\mu\text{g/mL}$
	EHGP	196 $\mu\text{g/mL}$	64.83 $\mu\text{g/mL}$	311.9 $\mu\text{g/mL}$	551.1 $\mu\text{g/mL}$	Indeterminate

EHGV = hydroethanolic geopropolis extract of *M. fasciculata* from Viana city, Maranhão State, Brazil; EHGP = hydroethanolic geopropolis extract of *M. fasciculata* from Pinheiro city, Maranhão State, Brazil; GI_{50} values calculated by non-linear regression equation $\log(\text{inhibitor})$ versus response—variable slope by the MTT assay. Concentration required to inhibit cell growth by 50% as determined by the dose response curve. Values are expressed as mean \pm standard deviation of cytotoxicity assays ($n = 4$).

3.5. Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry and Analysis of Apoptosis by Western Blot

To explore the possible mechanisms underlying EHGV cytotoxicity in cancer cells, we analyzed cell cycle distribution and induction of apoptosis through cleaved caspase-3 and cleaved PARP in A2780 cells. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry after a 48 h exposure to EHGV (15.65 and 31.25 $\mu\text{g/mL}$). EHGV treatment increased cells in S-phase compared with control cells treated with vehicle (Figure 5A). Additionally, treatment with EHGV at 31.25 $\mu\text{g/mL}$ led to the accumulation of small DNA fragments in the sub-G1 phase (hypodiploid peak) in A2780 cells compared to control cells (5% vs. 9.79%). Interestingly, the treatment with CDDP, a drug currently employed in the treatment of ovarian cancer, showed the equivalent results in A2780 cells (8%) (Figure 5A).

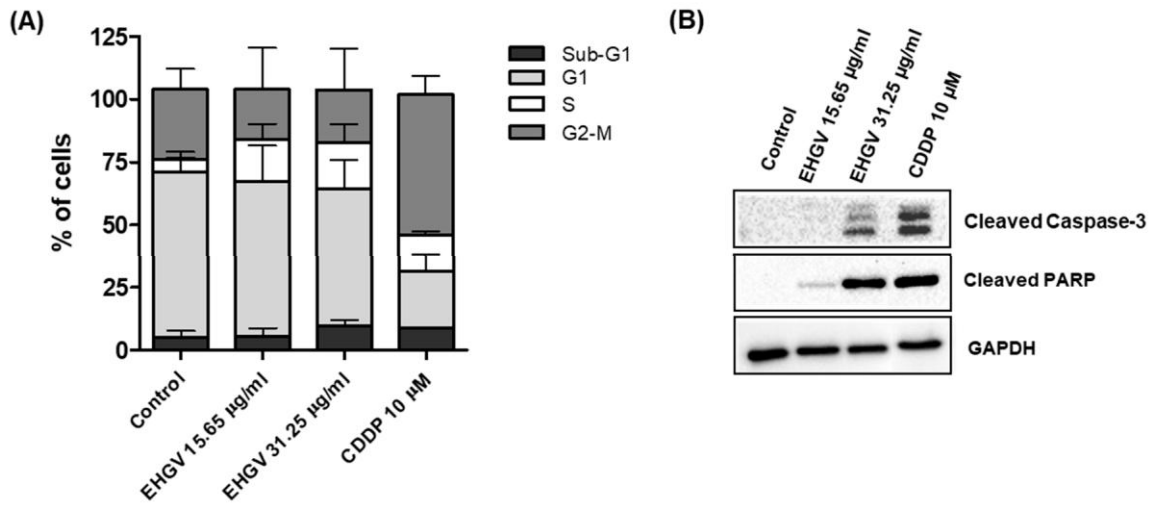


Figure 5. Analysis of effect of EHGv on cell cycle phase distribution and Western blot analysis of apoptosis-related proteins in A2780 cells treated with EHGv (15.65 and 31.25 µg/mL) and CDDP (10 µM) for 48 h. (A) Distribution of cells in sub-G1, G1, S or G2/M phases of cell cycle in A2780 cells treated with EHGv (15.65 and 31.25 µg/mL), CDDP (10 µM) and vehicle (control) for 48 h. (B) Western blot analysis of cleaved caspase-3 and cleaved PARP in A2780 cells treated with EHGv (15.65 and 31.25 µg/mL), CDDP (10 µM) and vehicle (control) for 48 h. GAPDH was used as loading control.

Intrigued with the low proportion of cells in the sub-G1 phase (considered as apoptotic cells) and the impressive results in decreasing the percentage of cell viability in ovarian cancer cells (Figure 3), we next verified apoptosis-related proteins by Western blot. Cleavage of caspase-3 (17 kDa subunit) and PARP (89 kDa subunit) to their active forms is an important event in cancer cell apoptosis. As shown in Figure 5B, treatment with EHGv for 48 h increased the expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP in a dose-dependent manner. Additionally, A2780 cells treated with CDDP 10 µM for 48 h also showed an increase in these apoptosis-related proteins.

3.6. LC-ESI/IT-MS/MS Analysis

Tables 3 and 4 summarize the list of identified compounds in the classes of glycosylated flavonoids, triterpenes, triterpenoid saponins, hydrolyzable tannins, anthraquinones and catechins, their retention time, molecular weight, molecular ions $[M - H]^-$ and main ions of the products obtained by LC-ESI/IT-MS/MS for the 23 peaks of fragmentation of EHGv and EHGP.

Table 3. Compounds identified in the hydroethanolic geopropolis extract produced by *M. fasciculata* stingless bee from Viana city, Maranhão State, Brazil, by LC-ESI/IT-MS/MS.

Compound	RT(min)	Identification	MW	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS fragments (m/z)
1	2.8	gluconic acid	196	195	128; 177
2	3.1	Corilagin	634	633	615; 484
3	15.9	Taraxerone	424	423	304; 334; 406
4	18.2	myricetin-3- <i>O</i> - α -arabinopyranoside	450	449	430; 359; 329
5	19.1	Prunin	434	433	313
6	20.5	Dipterocarpol	443	442	209; 165
7	24	taxifolin 7- <i>O</i> -rhamnoside	450	449	405
8	24.7	Isoschaftoside	564	563	548; 298
9	25.3	Marsformosanone	422	421	377; 333; 297; 214; 179; 157
10	32	β -amyrin	427	426	232
11	40	Typhaneoside	770	769	375; 331
12	44.5	3-[xyl]-28-glc-phytolaccagenin	826	825	403; 360

RT, retention time; MW, molecular weight; [M - H]⁻ molecular ion

Table 4. Compounds identified in the hydroethanolic geopropolis extract produced by *M. fasciculata* stingless bee from Pinheiro city, Maranhão State, Brazil, by LC-ESI/IT-MS/MS.

Compound	RT(min)	Identification	MW	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS fragments (m/z)
1	2.8	gluconic acid	196	195	128; 177
2	16	Taraxerone	424	423	304; 334; 364; 406
3	17.8	dihydroquercetin - <i>C</i> -glycoside	450	449	431; 359; 329; 287; 303
4	18.2	dihydroquercetin- <i>C</i> -glycoside isomer	450	449	430; 359; 329
5	19.1	narigenin- <i>C</i> -glycoside	434	433	313
6	20.2	narigenin- <i>C</i> -glycoside isomer	434	433	415; 313
7	21	vitexin- <i>O</i> -galate	584	583	169; 313; 932; 537
8	22.5	pinobanksin glycosylated	436	435	270; 151; 341; 391
9	22,9	dihydroquercetin 3- <i>O</i> -ramnoside	450	449	303; 405
10	33.8	xantholaccaic acid A	521	520	262; 357; 419; 458; 502; 542
11	42.5	galocatequin-xylose	438	437	305; 357; 393; 437

RT, retention time; MW, molecular weight; [M-H]⁻ molecular ion

3.7. In Silico Study

In the molecular docking study, all metabolites identified in EHG were used. All compounds showed very satisfactory affinity parameters to both COX-2 and NF- κ B structures. On COX-2, high parameter values were found for corilagin, typhaneoside and β -amyrin, with values for free binding energies of -9.3, -8.8 and -8.7 kcal/mol, respectively. Regarding NF- κ B, taraxerone, marsformosanone and β -amyrin had parameters indicating high interaction, with free binding energies of -8.4, -7.7, -7.4 kcal/mol, respectively. The results of the free binding energy parameters of EHG metabolites are shown in Table 5.

Table 5. Free binding energies obtained by molecular docking of the compounds identified in EHG. V.

COX-2		NF- κ B	
Ligand	ΔG_{bind} (kcal/mol)	Ligand	ΔG_{bind} (kcal/mol)
corilagin	-9.3	Taraxerone	-8.4
typhaneoside	-8.8	marsformosanone	-7.7
β -amyrin	-8.7	β -amyrin	-7.4
isoschaftoside	-8.6	dipterocarpol	-6.9
3-[xyl]-28-glc-phytolaccagenin	-8.5	3-[xyl]-28-glc-phytolaccagenin	-6.9
marsformosanone	-8.5	Prunin	-6.8
taraxerone	-8.3	Corilagin	-6.6
prunin	-8.0	Typhaneoside	-6.5
myricetin-3- <i>O</i> - α -arabinopyranoside	-7.9	Isoschaftoside	-6.4
dipterocarpol	-7.7	myricetin-3- <i>O</i> - α -arabinopyranoside	-6.3
taxifolin 7- <i>O</i> -rhamnoside	-7.6	taxifolin 7- <i>O</i> -rhamnoside	-6.0

The docking results showed that corilagin, typhaneoside and β -amyrin have hydrogen bonds and van der Waals interactions with residues from COX's catalytic site triad (Arg120, Thr385 and Glu524) and neighboring residues. It is also shown that the taraxerone, marsformosanone and β -amyrin performs van der Waals interactions with residues Glu89, Lys90, Leu93, Met94 and Phe97 (NEMO domain) and Glu729, Gln730, Ser733 and Phe734 (IKK β domain). The spatial conformation from ligands obtained by the molecular docking study is shown on Figure 6.

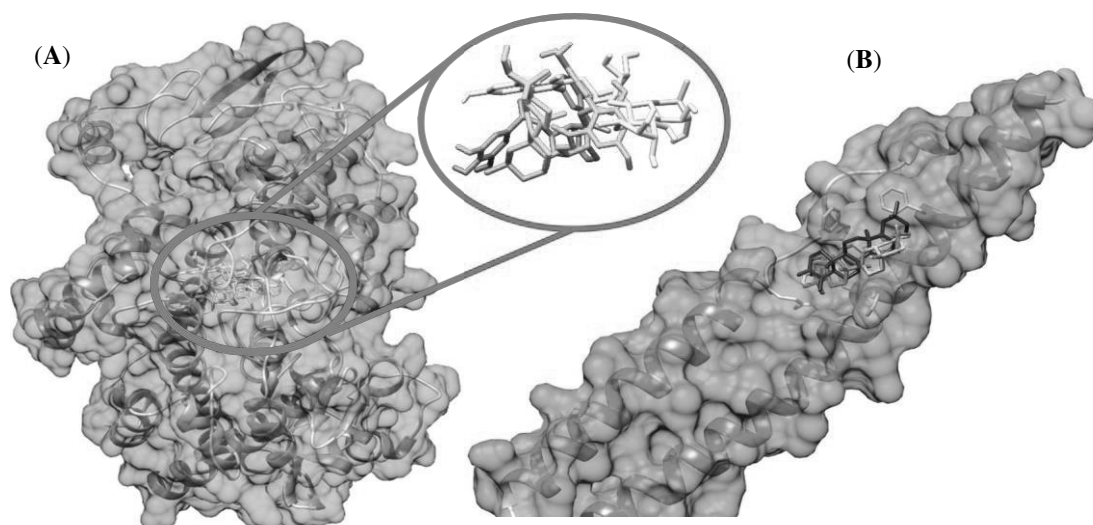


Figure 6. Spatial conformations obtained by molecular docking of corilagin (in green), typhaneoside (in yellow) and β -amyrin (in cyan) on COX-2 active site (A) and conformations of taraxerone (in blue), marsformosanone (in magenta) and β -amyrin (in cyan) on NEMO/IKK β structure (B).

4. Discussion

The findings reported herein indicate that EHG. V. and EHGP exhibit the ability to reduce ferric ions to ferrous ions (FRAP) and free radical scavenging activity (DPPH \cdot and ABTS \cdot^+), suggesting significant antioxidant activity (Table 1). These results are in agreement with previously reported findings from stingless bee geopropolis [21,39,40].

Several types of oxidative damage at the cellular level are avoided in biomolecules such as lipoproteins and/or DNA, due to the presence of antioxidants. In the absence of these compounds, the oxidative stress produced by an increased production of reactive oxygen species (ROS) is responsible for triggering a complex and wide cascade of biochemical events harmful to organisms and associated to several pathological and disease processes, including cancer [41,42]. In addition, the interactions of antioxidant compounds with ROS through the elimination of free radicals are implicated in reducing conditions triggered by oxidative stress, such as cancer and other inflammatory processes [43].

Considering the antioxidant activity of *M. fasciculata* geopropolis extracts, COX inhibition potential and antitumor activity were evaluated by an in vitro cytotoxicity assay, where anti-inflammatory and antioxidant activities can be associated to antitumor activity [43,44]. Due to its higher antioxidant activity, EHGv also exhibited major inhibitory activity, inhibiting 61% of COX-2 and only 5% of COX-1 at 50 µg/mL (Figure 1). EHGv also demonstrated higher cytotoxic effect, decreasing cell viability in ovarian (A2780 and ES2) and lung (A549 and H460) cancer cells (Figure 3).

Extracts exhibiting antioxidant properties commonly act as enzyme inhibitors, i.e., COX, xanthine oxidase, lipoxygenase, phospholipase A₂ and others. The prostaglandin metabolism mediated by COX plays a fundamental role in inflammatory processes and is important in carcinogenesis, tumor differentiation, tumor growth and in suppressing tumor immunity, contributing to cancer immunotherapy resistance to several types of tumors [6,45,46]. In addition, a possible carcinogenesis inhibition mechanism has been reported for COX-2 inhibition since this enzyme plays an important role in the activation of local growth factors that lead to neovascularization, inflammation and carcinogenesis [47]. Thus, products that inhibit COX-2, such as *M. fasciculata* geopropolis, exhibit the potential to integrate future preventive and therapeutic anticancer strategies.

Considering the importance of lung and ovarian cancers, both resulting in high mortality rates, usually detected in advanced stages and exhibiting significant chemoresistance [2,48], two lung cancer cell lines (A549 and H460) and two ovarian cancer cell lines (ES2 and A2780) with different genetic backgrounds were selected for antitumoral activity evaluation of *M. fasciculata* hydroethanolic geopropolis extracts.

Several morphological changes in A2780 ovarian cancer cells treated with EHGv were observed, especially at the highest exposed concentration (62.5 µg/mL) (Figure 2). EHGv-treated cells became rounded and shrunken, exhibiting decreased density and detaching themselves from the substrate. These features are suggestive of EHGv-induced cell death mediated through apoptosis. Changes in cell morphology were less prominent when treated with clinically relevant concentrations of CDDP, routinely used in lung and ovarian cancer treatment [48].

Furthermore, the MTT assay was used to measure the cytotoxic effects of the extracts in lung and ovarian cancer cell lines. Our findings indicate that EHGv demonstrated higher cytotoxic effects at 48 and 72 h compared to EHGP in all cancer cell lines (Figure 3).

Drug discovery of new cytotoxic agents that explores differences between cancerous and normal cells continues to be a public health demand. Therefore, anticancer agents are expected to exhibit minimum effects on non-tumor cells. For this reason, we also evaluated extract cytotoxicity in non-malignant HUVEC cell lines. No significant toxic effects were observed, reinforcing the safety of the geopropolis extract and emphasizing its ability to inhibit cell proliferation, promoting its antitumor activity (Figure 4). Our investigations regarding the toxic effects of the extract corroborate Barboza et al. [49], who evaluated acute EHGv and EHGP toxicity in a zebrafish toxicity model and reported very low toxicity.

Previous studies have reported that *M. fasciculata* geopropolis exerts cytotoxic effects in a human leukemia monocytic cell line with significant decreases in cell viability at high concentrations (50 and 100 µg/mL) [25]. Additionally, Cinegaglia et al. [24] reported that *M. fasciculata* geopropolis also exhibits cytotoxic activity against canine osteosarcoma (OSA) cells. In another study, geopropolis produced by *Melipona mondury* Smith exhibited significant antiproliferative activities against various tumor cell lines (mouse melanoma, B16-F10, human hepatocellular carcinoma, HepG2, human promyelocytic leukemia, HL-60 and human chronic myelocytic leukemia K562) and no cytotoxic

effects against non-tumor cells [14].

According to the USA's National Cancer Institute (NCI), crude extracts with $GI_{50} < 30$ $\mu\text{g/mL}$ in the preliminary assay are considered promising cytotoxic agents against neoplastic cells [50,51]. Therefore, EHGv is a promising product due to a GI_{50} value of 16.92 $\mu\text{g/mL}$ in A2780 cancer cell lines and 22.64 $\mu\text{g/mL}$ in A549 cancer cell lines (Table 2). Regarding the four-human cancer-derived cell lines, the A2780 ovarian cancer cell line was selected to screen EHGv's ability to induce apoptosis (programmed cell death) and its impact on the cell cycle due to a higher GI_{50} value of 16.92 $\mu\text{g/mL}$ for A2780. The A2780 cell line was treated with EHGv at two concentrations (15.65 and 31.25 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h and then analyzed by flow cytometry. EHGv-treated A2780 cells displayed an increased percentage of cells in the S-phase compared with control cells treated with the vehicle. As mentioned previously, CDDP is routinely employed in the treatment of ovarian cancer and exhibited similar effects concerning an increased number of cells in the sub-G1 phase compared to the EHGv (31.25 $\mu\text{g/mL}$) treatment in A2780 cells (Figure 5A). It is important to emphasize that no studies have characterized cell cycle modulation after geopropolis extract exposure in cancer cells.

Apoptosis, a form of programmed cell death, involves the activation, expression, and regulation of various proteins [52]. Clinically, the main goal in cancer therapy is cancer cell death. Caspase-3 is a central apoptosis effector, catalyzing the specific cleavage of many key cellular proteins, like nuclear protein poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) [53,54]. The results of the present study also indicate that EHGv dose-dependently enhances A2780 cell apoptosis after 48 h of treatment by increasing the expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP (Figure 5B).

PARP plays an essential role in several cellular processes, such as maintenance of genomic stability, DNA repair and apoptosis [55], and is a target of caspase-3 protease activity. Caspase-3 cleaves PARP into two fragments (89 and 24 kDa) during apoptosis. This cleavage is considered a useful hallmark of cell apoptosis [56]. As shown in Figure 5B, EHGv activates caspase-3 cleavage and, consequently, reduces protein levels throughout the total PARP length in EHGv-treated cells. This can be accompanied by increased PARP expression, an apoptosis characteristic [57].

Following the positive results of decreased cell viability in lung and ovarian cancer cells, chemical composition characterization was performed. The LC-ESI/IT-MS/MS analysis indicates a chemical composition similarity between the two extracts related to glycosylated flavonoids and triterpenes (taraxerone). Triterpenes ursane (marsformosanone), oleanane (β -amyrin) and dammaren (dipterocarpol) skeleton and glycosylated triterpene saponin (3-[Xyl]-28-Glc-phytolaccagenin) were identified in EHGv, which were not detected in EHGp (Tables 3 and 4). These findings corroborate studies concerning the chemical composition of *M. fasciculata* geopropolis from different areas, due to the predominance of substances of the polyphenolic classes (hydrolysable tannins and flavonoids) and triterpenes [19,21,40,58].

Yam-Puc et al. [59] identified thirteen pentacyclic triterpenes in a chloroform-methanol-propolis extract from *Melipona beecheii* including marsformosanone, taraxerone and β -amyrin, which were also identified in EHGv. Besides taraxerone, two other pentacyclic triterpenoid (marsformosanone and β -amyrin) and one dammaren triterpene (dipterocarpol) and one glycosylated triterpene saponin (3-[Xyl]-28-Glc-phytolaccagenin) were also identified in EHGv. The triterpenes marsformosanone and dipterocarpol and 3-[Xyl]-28-Glc-phytolaccagenin, a triterpene saponin, were identified for the first time in *Melipona fasciculata* geopropolis. Triterpenoids, in general, are commonly attributed to inhibition of NF- κ B activation and signal transduction, cell proliferation, apoptosis, angiogenesis and mitochondrial dysfunction [8].

According to the EHGv anti-inflammatory and antitumor activity results, which suggest that COX-2 receptor and NF- κ B play a role in these effects, molecular docking of the compounds identified in the EHGv against these targets was also performed (Figure 6).

The molecular docking results suggest that corilagin, a hydrolysable tannin, typhaneoside, glycosylated flavonol, and the triterpene β -amyrin exhibit the best affinity parameters to COX-2 structure (Table 5). Corilagin exhibited greater interaction and its antitumor and anti-inflammatory potential is described in the literature, which may act in suppressing COX-2 expression at the gene

and protein levels, demonstrating that this molecule may inhibit the inflammatory process [60–62]. No records concerning typhaneoside COX inhibitor potential are available, but is recognized that this molecule can regulate IL-6 and TNF- α [63] and promote cell proliferation and decrease NO levels in HUVEC cells [64], suggesting anti-inflammatory activity and no cytotoxic effects. β -Amyrin also displays antitumor effects against HepG2 liver carcinoma cells, causing apoptosis, cell cycle disruption and activation of the JNK and p38 signaling pathways [65]. β -Amyrin reduces the expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂, COX-2 [66] and exhibits high inhibition of PGE₂ and IL-6 secretion and NF- κ B activation in a concentration-dependent manner, being a promising molecule for the treatment of various inflammatory disorders [67].

COX-2 is the main enzyme acting in prostaglandin H₂ (PGH₂) production through the conversion of arachidonic acid. This prostaglandin can later be converted into different prostaglandins such as PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , and also into thromboxane A₂. These inflammatory prostanoids are closely associated to rapid and disordered tumor growth, characteristic of malignant neoplasms, since they promote cell division, metastasis and angiogenesis, in addition to inhibiting cell apoptosis [68,69]. Thus, the fact that EHG_V displays a preference for COX-2 inhibition is directly correlated to the antitumor capacity reported herein.

Regarding the NF- κ B receptor, taraxerone, marsformosanone and β -amyrin exhibited the best affinity parameters in the molecular docking study, with their conformations as the best free binding energy in the same region (Table 5), interacting with important catalytic residues such as the Glu89 NEMO and Ser733 IKK β domains [70]. Taraxerone, identified in both EHG_P and EHG_V, has been described in the literature as displaying antitumor potential, inhibiting cancer cell proliferation and colony formation in A549 lung cancer cells, revealing potent cytotoxic effects in a dose-dependent manner and characteristic of apoptosis [71]. Taraxerone has also been reported as an antioxidant and iNOS inhibitor [72]. No records regarding marsformosanone's potential as an NF- κ B inhibitor agent are available, so this is the first study to suggest this activity. Pentacyclic triterpenes have been described as potential NF- κ B signaling pathway inhibitors [73–75]. Laszczyk [76] described that triterpenes with a lupano, oleanan or ursano skeleton, including β -amyrin, display antitumor activity against different modes of action. β -Amyrin shows anti-inflammatory and anti-apoptotic effects on hepatic fibrosis in male rats [77]. Additionally, Ghante and Jamkhande [8] reported that triterpenoids display the ability to inhibit NF- κ B activation.

NF- κ B regulates the transcription of anti-apoptotic genes, contributing to cancer cell escape from apoptosis [78]. NF- κ B inhibition in experimental studies has shown promising results in enhancing apoptosis and potentiating antitumor agent effects [79]. In addition, NF- κ B is pivotal in inflammatory responses. Therefore, inhibition of the NF- κ B signaling pathway exhibits potential therapeutic application in cancer and inflammatory diseases [80,81]. Thus, based on our EHG_V result, an EHG_V mechanism of action in ovarian cancer cells is suggested (Figure 7).

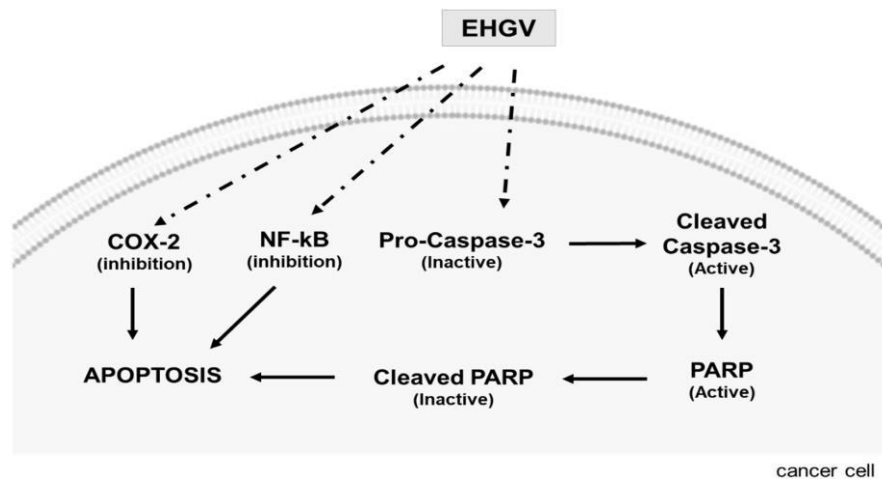


Figure 7. Proposed EHGv mechanism of action in ovarian cancer cells.

These findings reinforce our hypothesis that these molecules have the potential to become research targets for new drugs exhibiting anti-inflammatory and antitumor activities. Therefore, geopropolis may be a less toxic therapeutic alternative to be tested in the future in combination with monotherapy or polytherapy cancer treatment regimens.

5. Conclusions

The hydroethanolic geopropolis extract produced by *Melipona fasciculata* is composed of hydrolysable tannin, glycosylated flavonoids, anthraquinone, catechin, and triterpene substances which can be related to the antioxidant and anti-inflammatory activities and cytotoxic effects against A2780, ES2, A549, H460 cell lines. The extracts also have high preference for COX-2 inhibition, contributing effectively to antitumor activity. The *in silico* results, in concordance with our results from anti-inflammatory and antitumor activities, suggests that this activity can be due to COX-2 inhibition and NF-κB activation. Thus, we demonstrated for the first time that geopropolis produced by *M. fasciculata* has cytotoxic effects thought mediating apoptosis and cleaved caspase-3 activation in cancer cells, showing low toxicity against non-malignant HUVEC cell lines. We conclude that geopropolis is a natural product that exhibits anticancer properties that should be further evaluated in monotherapy or polytherapy schemes to improve chemotherapy–antitumor responses and long-term benefits in cancer patients.

Author Contributions: Conceptualization, J.R.B., A.J.O.L., F.A.N.P., I.d.S.G., C.Q.d.R., M.N.d.S.R.; methodology, J.R.B., A.J.O.L., F.A.N.P., C.C.V., I.d.S.G., C.Q.d.R. and R.A.F.; writing—original draft preparation, J.R.B., A.J.O.L., C.C.V., M.d.S.d.S.C., A.C.d.M. and I.d.S.G.; writing—review and editing, J.R.B., A.J.O.L., I.d.S.G., A.C.d.M., M.N.d.S.R.; supervision, M.N.d.S.R., and C.Q.d.R.; project administration, J.R.B. and M.N.d.S.R.; funding acquisition, M.N.d.S.R. and C.Q.d.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), grant number 026/2017.

Acknowledgments: We would like thanks to Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) for financial support. Thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the bachelor scholarship to FANP and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) to J.R.B. Ph.D. scholarship and to the National Center of High Performance Processing (CENAPAD-UFC) of the Federal University of Ceará for the availability of the computational resources used in the *in silico* tests.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in

the decision to publish the results.

References

1. Sadeghi, S.; Davoodvandi, A.; Pourhanifeh, M.H.; Sharifi, N.; Nezhad, R.A.; Sahebnaasagh, R.; Moghadam, S.A.; Sahebkar, A.; Mirzaei, H. Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 131–140. [CrossRef]
2. Bray, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Zanetti, R.; Ferlay, J. *Cancer Incidence in Five Continents; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2019; Volume XI.*
3. Pokhriyal, R.; Hariprasad, R.; Kumar, L.; Hariprasad, G. Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients. *Biomark. Cancer* **2019**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
4. Abbaszadeh, H.; Keikhaei, B.; Mottaghi, S. A review of molecular mechanisms involved in anticancer and antiangiogenic effects of natural polyphenolic compounds. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 2002–2014. [CrossRef] [PubMed]
5. Bailly, C. Anticancer properties and mechanism of action of the quassinoid ailanthone. *Phytother. Res.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
6. Goradel, N.H.; Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 5683–5699. [CrossRef]
7. Man, S.; Wei, C.; Liu, C.; Gao, W. Anticancer Drugs from Traditional Toxic Chinese Medicines. *Phytother. Res.* **2012**, *26*. [CrossRef]
8. Ghante, M.H.; Jamkhande, P.G. Role of Pentacyclic Triterpenoids in Chemoprevention and Anticancer Treatment: An Overview on Targets and Underling Mechanisms. *J. Pharmacopunct.* **2019**, *22*, 55–67.
9. Nogueira, P.N. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão*; Editora Parma: São Paulo, Brazil, 1997.
10. Kerr, W.E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na poplinização e na produção de mel, pólen, geopropolis e cera. *Inf. Agropecuário* **1987**, *13*, 15–22.
11. Lopes, A.J.O.; Vasconcelos, C.C.; Pereira, F.A.N.; Silva, R.H.M.; Queiroz, P.F.D.S.; Fernandes, C.V.; Garcia, J.B.S.; Ramos, R.M.; Da Rocha, C.Q.; Lima, S.T.; et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee *Melipona fasciculata*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4512. [CrossRef]
12. Franchin, M.; Da Cunha, M.G.; Denny, C.; Napimoga, M.H.; Cunha, F.Q.; Koo, H.; De Alencar, S.M.; Ikegaki, M.; Rosalen, P.L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 709–715. [CrossRef]
13. Franchin, M.; Da Cunha, M.G.; Denny, C.; Napimoga, M.H.; Cunha, F.Q.; Bueno-Silva, B.; De 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. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 907041. [CrossRef] [PubMed]
14. Dos Santos, C.M.; Campos, J.F.; Dos Santos, H.F.; Balestieri, J.B.P.; Silva, D.B.; Souza, K.D.P.; Carollo, C.A.; Estevinho, L.M.; Dos Santos, E.L. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
15. Liberio, S.A.; Pereira, A.L.A.; Dutra, R.P.; Reis, A.S.; Araújo, M.J.A.; Mattar, N.S.; Silva, L.A.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.F.; Guerra, R.N.M.; et al. 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*, 108. [CrossRef] [PubMed]
16. Oliveira, L.P.G.; Conte, F.L.; Cardoso, E.D.O.; Conti, B.J.; Santiago, K.B.; Golim, M.D.A.; Feltran, G.; Zambuzzi, W.F.; Sforcin, J.M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. *Life Sci.* **2019**, *217*, 81–90. [CrossRef]
17. De Sousa, D.M.N.; Olinda, R.G.; Martins, C.G.; Abrantes, M.R.; Coelho, W.A.C.; da Silva, J.B.A.; de Moraes, S.M.; Batista, J.S. Phytochemical screening, in vitro toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bee's geopropolis. *Acta Veter. Bras.* **2015**, *9*, 134–140. [CrossRef]
18. Sousa, J.P.L.D.M.; Pires, L.D.O.; Dos Santos, R.F.; Prudêncio, E.R.; Sant'Ana, L.D.; Ferreira, D.A.D.S.; Castro, R.N. Chemical and Antimicrobial Potential Study of Brazilian Propolis Produced by Different Species of Bees. *Rev. Virtual Química* **2019**, *11*, 1480–1497. [CrossRef]
19. Dutra, R.P.; Bezerra, J.L.; Da Silva, M.C.P.; Batista, M.C.A.; Patrício, F.J.B.; Nascimento, F.F.; Ribeiro,

- M.N.S.;Guerra, R.N.M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Rev. Bras. Farm.* **2019**, *29*, 287–293. [CrossRef]
20. Da Silva, E.C.C.; Muniz, M.P.; Nunomura, R.D.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* **2013**, *36*, 628–633. [CrossRef]
 21. Dutra, R.P.; Abreu, B.V.D.B.; Cunha, M.S.; Batista, M.C.A.; Torres, L.M.B.; Nascimento, F.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. [CrossRef]
 22. Ferreira, J.M.; Fernandes-Silva, C.C.; Salatino, A.; Message, D.; Negri, G. Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*, 1–6. [CrossRef]
 23. Torres, A.; Sandjo, L.; Friedemann, M.; Tomazzoli, M.; Maraschin, M.; Mello, C.F.; Santos, A.R. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Braz. J. Med. Boil. Res.* **2018**, *51*. [CrossRef] [PubMed]
 24. 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. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 737386. [CrossRef] [PubMed]
 25. Oliveira, L.P.G.; Conte, F.L.; Cardoso, E.D.O.; Conti, B.J.; Santiago, K.B.; Golim, M.D.A.; Cruz, M.T.; Sforcin, J.M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *68*, 1551–1558. [CrossRef]
 26. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [CrossRef]
 27. Benzie, I.F.; Strain, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [CrossRef]
 28. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Boil. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef]
 29. Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M.; Grignani, F.; Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **1991**, *139*, 271–279. [CrossRef]
 30. De Moraes, G.N.; Carvalho, E.; Maia, R.C.; Sternberg, C. Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde. *Anal. Biochem.* **2011**, *415*, 203–205. [CrossRef]
 31. Dennington, R.; Keith, T.A.; Millam, J.M. *GaussView5*; Semichem. Inc.: Shawnee Mission, UK, 2016.
 32. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 09, Revision d. 01*; Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.
 33. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31*, 455–461. [CrossRef]
 34. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [CrossRef]
 35. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662. [CrossRef]
 36. Lopes, A.J.O.; Vasconcelos, C.C.; Garcia, J.B.S.; Pinheiro, M.S.D.; Pereira, F.A.N.; Camelo, D.S.; De Moraes, S.V.; Freitas, J.R.B.; Da Rocha, C.Q.; Ribeiro, M.N.D.S.; et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: In silico, in vitro, and in vivo Studies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 103. [CrossRef] [PubMed]
 37. Vasconcelos, C.C.; Lopes, A.J.O.; Sousa, E.L.F.; Camelo, D.S.; Lima, F.C.V.M.; Da Rocha, C.Q.; Silva, G.E.B.; Garcia, J.B.S.; Cartágenes, M.D.S.D.S. Effects of Extract of *Arrabidaea chica* Verlot on an Experimental Model of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4717. [CrossRef] [PubMed]
 38. Liston, D.R.; Davis, M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 3489–3498. [CrossRef]
 39. De Souza, S.A.; Camara, C.A.; Da Silva, E.M.S.; Silva, T.M.S. Composition and Antioxidant Activity of

- Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 1–5. [CrossRef]
40. Batista, M.C.A.; Abreu, B.V.d.B.; Dutra, R.P.; Cunha, M.S.; do Amaral, F.M.M.; Torres, L.M.B.; Ribeiro, M.N.d.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*, 315–322. [CrossRef]
 41. Al, M.L.; Daniel, D.; Moise, A.R.; Bobis, O.; Laslo, L.; Bogdanov, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem.* **2009**, *112*, 863–867. [CrossRef]
 42. Pauliuc, D.; Dranca, F.; Oroian, M. Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, Individual Phenolics and Physicochemical Parameters Suitability for Romanian Honey Authentication. *Foods* **2020**, *9*, 306. [CrossRef]
 43. Arulselvan, P.; Fard, M.T.; Tan, W.S.; Gothai, S.; Fakurazi, S.; Esa, N.M.; Kumar, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–15. [CrossRef]
 44. Ninfali, P.; Antonini, E.; Frati, A.; Scarpa, E.S. C-Glycosyl Flavonoids from *Beta vulgaris* Cicla and Betalains from *Beta vulgaris* rubra: Antioxidant, Anticancer and Antiinflammatory Activities—A Review. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 871–884. [CrossRef]
 45. Liu, B.; Qu, L.; Yan, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* **2015**, *15*, 106. [CrossRef] [PubMed]
 46. Hoellen, F.; Kelling, K.; Dittmer, C.; Diedrich, K.; Friedrich, M.; Thill, M. Impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 4359–4367. [PubMed]
 47. Divvela, A.K.C.; Challa, S.R.; Tagaram, I.K. Pathogenic Role of Cyclooxygenase-2 in Cancer. *J. Health Sci.* **2010**, *56*, 502–516. [CrossRef]
 48. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J.M.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; El-Deiry, W.S.; Fulda, S.; et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **2011**, *19*, 107–120. [CrossRef]
 49. Barboza, J.R.; Pereira, F.A.N.; Leite, J.A.C.; Coutinho, D.F.; Ribeiro, M.N.D.S. Abordagem química e toxicidade em modelo zebrafish de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. *Braz. J. Health Rev.* **2019**, *2*, 5582–5594. [CrossRef]
 50. Suffness, M.; Pezzuto, J. Assays Related to Cancer Drug Discovery. In *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*; Hostettmann, K., Ed.; Academic Press: London, UK, 1990; pp. 71–133.
 51. Trendowski, M. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. *Drugs* **2015**, *75*, 1993–2016. [CrossRef]
 52. Ghorab, M.M.; Al-Said, M.S.; Samir, N.; Abdel-Latif, G.A.; Soliman, A.M.; Ragab, F.A.; El Ella, D.A.A. Aromatase inhibitors and apoptotic inducers: Design, synthesis, anticancer activity and molecular modeling studies of novel phenothiazine derivatives carrying sulfonamide moiety as hybrid molecules. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *134*, 304–315. [CrossRef]
 53. Cohen, G.M. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 1–16. [CrossRef]
 54. Xu, D.C.; Arthurton, L.; Baena-Lopez, L.A. Learning on the Fly: The Interplay between Caspases and Cancer. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1–18. [CrossRef]
 55. Satoh, M.S.; Lindahl, T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **1992**, *356*, 356–358. [CrossRef]
 56. Oliver, F.J.; De La Rubia, G.; Rolli, V.; Ruiz-Ruiz, M.C.; De Murcia, G.; Murcia, J.M.-D. Importance of Poly(ADP-ribose) Polymerase and Its Cleavage in Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33533–33539. [CrossRef] [PubMed]
 57. Charoensinphon, N.; Qiu, P.; Dong, P.; Zheng, J.; Ngauv, P.; Cao, Y.; Li, S.; Ho, C.-T.; Xiao, H. 5-Demethyltangeretin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 2103–2111. [CrossRef] [PubMed]
 58. Araújo, M.; Bufalo, M.; Conti, B.; Fernandes, A.R.Y., Jr.; Trusheva, B.; Bankova, V.; Sforcin, J. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. *J. Mol. Pathophysiol.* **2015**, *4*, 12. [CrossRef]
 59. Yam-Puc, A.; Santana-Hernández, A.A.; Nahuat, P.N.Y.; Ramón-Sierra, J.M.; Farfán, M.R.C.; Borges-Argáez, R.; Ortiz-Vázquez, E. Pentacyclic triterpenes and other constituents in propolis extract from *Melipona* beechei collected in Yucatan, México. *Rev. Bras. Farm.* **2019**, *29*, 358–363. [CrossRef]

60. Li, X.; Deng, Y.; Zheng, Z.; Huang, W.; Chen, L.; Tong, Q.; Ming, Y. Corilagin, a promising medicinal herbal agent. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 43–50. [CrossRef] [PubMed]
61. Zhao, L.; Zhang, S.-L.; Tao, J.-Y.; Pang, R.; Jin, F.; Guo, Y.-J.; Dong, J.-H.; Ye, P.; Zhao, H.-Y.; Zheng, G.-H. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-d-glucose) in vitro. *Int. Immunopharmacol.* **2008**, *8*, 1059–1064. [CrossRef]
62. Gupta, A.; Singh, A.K.; Kumar, R.; Ganguly, R.; Rana, H.K.; Pandey, P.K.; Sethi, G.; Bishayee, A.; Pandey, A. Corilagin in Cancer: A Critical Evaluation of Anticancer Activities and Molecular Mechanisms. *Mol.* **2019**, *24*, 3399. [CrossRef]
63. Zhang, X.; Yang, K.; Zhang, H.; Dong, W.; Peng, W.; Zhao, Y. Effect of typhaneoside on ventricular remodeling and regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Herz* **2019**, 1–10. [CrossRef]
64. Chen, P.-D.; Cao, Y.; Bao, B.; Zhang, L.; Ding, A. Antioxidant capacity of Typha angustifolia extracts and two active flavonoids. *Pharm. Boil.* **2017**, *55*, 1283–1288. [CrossRef]
65. Wen, S.; Gu, D.; Zeng, H. Antitumor effects of beta-amyrin in Hep-G2 liver carcinoma cells are mediated via apoptosis induction, cell cycle disruption and activation of JNK and P38 signalling pathways. *J. BUON* **2018**, *23*, 965–970.
66. Askari, V.R.; Fereydouni, N.; Rahimi, V.B.; Askari, N.; Sahebkar, A.H.; Rahmanian-Devin, P.; Kermani, A.S. β -Amyrin, the cannabinoid receptors agonist, abrogates mice brain microglial cells inflammation induced by lipopolysaccharide/interferon- γ and regulates M ϕ 1/M ϕ 2 balances. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *101*, 438–446. [CrossRef] [PubMed]
67. Krishnan, K.; Mathew, L.E.; Vijayalakshmi, N.R.; Helen, A. Anti-inflammatory potential of β -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacology* **2014**, *22*, 373–385. [CrossRef] [PubMed]
68. Grösch, S.; Maier, T.J.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)–Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 736–747. [CrossRef] [PubMed]
69. Mortazavi, H.; Nikfar, B.; Esmaeili, S.-A.; Rafieenia, F.; Saburi, E.; Chaichian, S.; Gorji, A.M.H.; Momtazi-Borojeni, A.A. Potential cytotoxic and anti-metastatic effects of berberine on gynaecological cancers with drug-associated resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *187*, 111951. [CrossRef]
70. Rushe, M.; Silvian, L.F.; Bixler, S.; Chen, L.L.; Cheung, A.; Bowes, S.; Cuervo, H.; Berkowitz, S.; Zheng, T.; Guckian, K.; et al. Structure of a NEMO/IKK-Associating Domain Reveals Architecture of the Interaction Site. *Structure* **2008**, *16*, 798–808. [CrossRef]
71. Ma, X.-C.; Dong, S.; Zhang, S.-Y.; Jia, N.; Ou, S.-L. Taraxerone triterpene inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2016**, *11*, 342. [CrossRef]
72. Mo, E.K.; Han, B.H.; Kim, S.M.; Yang, S.A.; Kang, S.K.; Oh, C.J.; Kim, R.; Kim, C.G.; Kang, H.J.; Sung, C.K. Identification of d-friedoolean-13-en-3-one (Taraxerone) as an antioxidant compound from sedom (Sedumsarmentosum). *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 485–489. [CrossRef]
73. Patil, K.R.; Mohapatra, P.; Patel, H.M.; Goyal, S.N.; Ojha, S.; Kundu, C.N.; Patil, C.R. Pentacyclic Triterpenoids Inhibit IKK β Mediated Activation of NF- κ B Pathway: In Silico and In Vitro Evidences. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125709. [CrossRef]
74. Salminen, A.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K.; Huuskonen, J. Terpenoids: Natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2979–2999. [CrossRef]
75. Hodon, J.; Borkova, L.; Pokorny, J.; Kazakova, A.; Urban, M. Design and synthesis of pentacyclic triterpeneconjugates and their use in medicinal research. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111653. [CrossRef]
76. Laszczyk, M.N. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1549–1560. [CrossRef] [PubMed]
77. Thirupathi, A.; Silveira, P.; Nesi, R.; Pinho, R.A. Amyrin, a pentacyclic triterpene, exhibits anti-fibrotic, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects on dimethyl nitrosamine–induced hepatic fibrosis in male rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **2016**, *36*, 113–122. [CrossRef] [PubMed]
78. Xia, L.; Tan, S.; Zhou, Y.; Lin, J.; Wang, H.; Oyang, L.; Tian, Y.; Liu, L.; Su, M.; Wang, H.; et al. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther.* **2018**, *11*, 2063–2073. [CrossRef]
79. Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I.M. NF-B, An Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 823–830. [CrossRef]

80. Prescott, J.A.; Cook, S.J. Targeting IKK β in Cancer: Challenges and Opportunities for the Therapeutic Utilisation of IKK β Inhibitors. *Cells* **2018**, *7*, 115. [CrossRef]
81. Paul, A.; Edwards, J.; Pepper, C.; Mackay, S.P. Inhibitory- κ B Kinase (IKK) α and Nuclear Factor- κ B (NF κ B)-Inducing Kinase (NIK) as Anti-Cancer Drug Targets. *Cells* **2018**, *7*, 176. [CrossRef]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



5.3 – CAPÍTULO 3 – ARTIGO

Molecular mechanisms of action and chemosensitization of tumor cells in ovarian cancer by phytochemicals - A Literature Review of Preclinical Studies

Artigo submetido na revista **Pharmacological Research**

Qualis: A1

Fator de Impacto: 7,658

ISSN 1043-6618

Josianne Rocha Barboza¹, Francisco Assis Nascimento Pereira¹, Alberto Jorge Oliveira Lopes¹, and Maria Nilce de Sousa Ribeiro.¹

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

Molecular mechanisms of action and chemosensitization of tumor cells in ovarian cancer by phytochemicals - A Literature Review of Preclinical Studies

Josianne Rocha Barboza^{1*}, Francisco Assis Nascimento Pereira¹, Alberto Jorge Oliveira Lopes¹ and Maria Nilce de Sousa Ribeiro^{1*}

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Campus Bacanga, Universidade Federal do Maranhão, PPG BIONORTE. Av. dos Portugueses, 1966, São Luís 65080-805, Maranhão, Brasil;

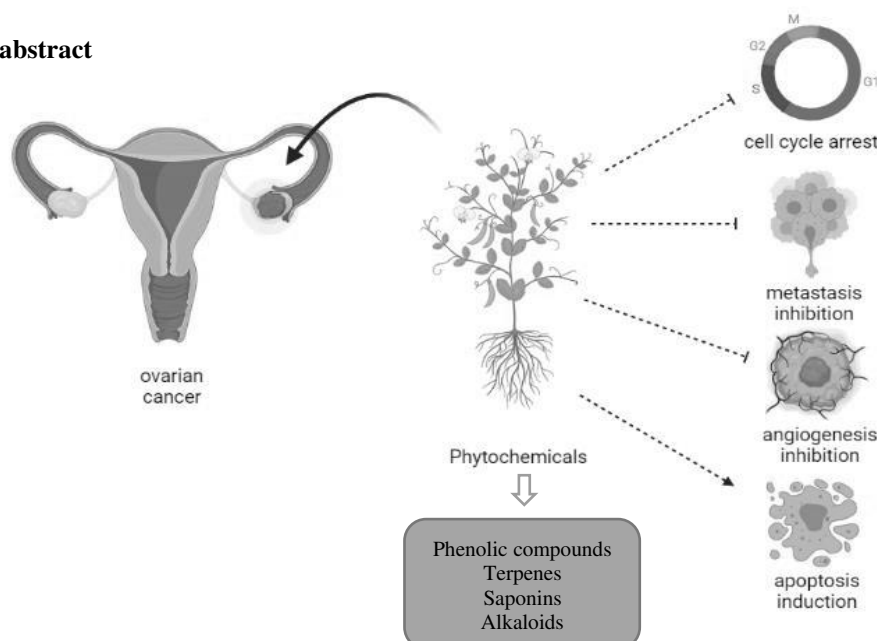
*Correspondência: josi.anne.r@hotmail.com (J.R.B); maria.nilce@ufma.br (M.N.d.S.R.).

Abstract

Ovarian cancer is the second leading cause of mortality among women with cancer of the genital tract. Currently, platinum-derived drugs and taxanes are the standard treatments for ovarian cancer. However, patients receiving this chemotherapy often develop cumulative toxic effects and are prone to chemotherapy resistance. Therefore, it is necessary to determine treatment options that are more effective and better tolerated by patients. In this context, phytochemicals are chemicals naturally produced in plants in their secondary metabolism with antitumor activity that can represent therapeutic or adjuvant alternatives in the treatment of ovarian cancer. The present review focused on the antitumor effects of the main phytochemicals, including phenolic acids, flavonoids, diterpenes, triterpenes, saponins and alkaloids that are being increasingly investigated as therapeutic options in ovarian cancer. Moreover, the molecular mechanisms involved in inhibition of cell proliferation and metastasis, in induction of apoptosis and increase of the chemosensitivity to platinum and taxanes derivatives in combination with these phytochemicals were presented.

Keywords: ovarian cancer; phytochemicals; molecular mechanisms; chemosensitivity; chemoresistance.

Graphical abstract



1 INTRODUCTION

Ovarian cancer is the second most common gynaecological neoplasm, losing only to cervical cancer, being the type of gynaecological cancer with the highest mortality rate worldwide, since its diagnosis is usually late, which hinders its treatment [1].

In 2020, 313,959 new cases and 207,252 deaths of ovarian cancer were reported worldwide [2]. Its incidence is associated with several risk factors like genetic mutations of BRCA1 and BRCA2 genes ("breast cancer 1 and 2" genes that encode tumor suppressor proteins), family history of ovarian or breast cancer, late menopause, endometriosis, nulliparity, hormone replacement therapy, obesity, lack of physical activity and smoking [3].

Histologically, there are three main classes of malignant tumors that can arise in the ovary: epithelial ovarian cancers (histological subtypes: serous, endometrioid, mucinous and clear cell), germ cells and sex-cord-stromal, being almost all ovarian neoplasms (95%) derived from epithelial cells, expanding its incidence in women over 40 years of age [4].

Despite advances in available therapies for ovarian carcinoma, its treatment is limited to cytoreductive surgery and chemotherapy with platinum derivatives (cisplatin and carboplatin) and taxanes (paclitaxel and docetaxel) that, although they are the first choice, have as the main obstacle to its efficiency the development of resistance after the long-term chemotherapy [5]. This resistance to chemotherapy is due to molecular changes such as increased oxidative stress and reduced apoptosis, and genetic changes such as mutations in tumor suppressor genes BRCA1, BRCA2 and p53 gene in the cancer ovarian cell that contribute to lower therapeutic response of platinum derivatives and taxanes leading to a challenge in the treatment strategy to improve the prognosis of patients with ovarian cancer [6].

In addition, tumor growth in ovarian cancer is influenced by the tumor microenvironment that is consisted of immune cells, fibroblasts, extracellular matrix, some proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinase, vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor [5]. This microenvironment promotes tumor cell proliferation, migration and invasion, and therapeutic alternatives seek to inhibit these factors to find an effective treatment for ovarian carcinoma [7].

In this context, *in vitro* and *in vivo* experimental studies have demonstrated that phytochemicals of the classes of phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids),

terpenes (diterpenes, triterpenes, saponins) and alkaloids can be a therapeutic alternative alone or in association with chemotherapies, since they exert antitumor properties against ovarian cancer in different types of pathways, mainly through inhibition of apoptosis, oxidative stress and inflammation; improve the effectiveness of conventional chemotherapy by acting as chemosensitizing agents; decrease chemoresistance; and reduce the toxicity induced by conventional chemotherapy [8–14].

Phytochemicals are chemicals naturally produced in plants in their secondary metabolism, presenting several biological activities including anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor effects with less toxic effects to normal cells [15]. Specifically, the effectiveness of phytochemicals to induce cell growth regulation, apoptosis, oxidative stress reduction, anti-angiogenesis and sensitization are associated to their antitumor effect in ovarian cancer [16].

Thus, in this review, we discussed the antitumor effects of phytochemicals in ovarian cancer, how their can be useful as alternative or adjuvant treatments and summarized the possible molecular mechanisms of action by which these compounds inhibit this type of cancer. Our focus was on preclinical studies (*in vitro* and *in vivo*) to demonstrate to readers how these models can contribute to the achievement of alternative strategies for ovarian cancer therapy.

2 METHODS

The information in this review article was searched in databases PubMed, Scopus and Science Direct in the period from 2010 to 2020 using keywords such as "ovarian cancer", "phytochemicals", "phenolic compounds", "terpenes" and "alkaloids". The selection of articles was based on the following inclusion criteria: original articles with pre-clinical trials, articles with keywords in the title, abstract or full text, articles with chemical substance isolated or identified in the extract or identified the class of secondary metabolites, articles that described the mechanism of action in ovarian cancer and articles published in English.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The selection of articles by primary search identified 2096 articles, of which 1752

were in ScienceDirect, 210 were in PubMed, and 310 were in Scopus. Articles indexed in two or more databases were considered only once. After the initial screening of titles, abstracts, and keywords, 60 articles were selected, as the others did not meet the inclusion criteria. We observed that the chemical constituents with activity to ovarian cancer belonged mainly to the classes of phenolic compounds (43%), terpenes (22%), saponins (14%) and alkaloids (17%). The literature showed higher proportions of *in vitro* experimental studies using most frequently the cell lines A2780 (human ovarian cancer cells obtained from tumor tissue of an untreated patient), SKOV3 (ovarian adenocarcinoma, resistant to a variety of substances such as tumor necrosis factors, adriamycin and cisplatin presenting high proliferation and invasion potential) and OVCAR3 (high-grade serous ovarian adenocarcinoma established from a patient refractory to cisplatin). *In vivo* studies have been performed to a lesser extent and conducted primarily with xenograft tumor models. Table 1 summarizes the selected articles, the phytochemicals, the classes of secondary metabolites and the mechanism of action regarding antitumor activity in ovarian cancer. The selected articles, most were published in the years 2015 to 2020 (49 articles; 83%), suggesting that the use of phytochemicals and elucidation of their molecular targets in ovarian cancer is a recent issue.

Table 1. Literature data concerning phytochemicals with antitumor activity in ovarian cancer cell lines.

Chemical substance(s)	Class of compounds	Natural Occurrence	Ovarian cancer cell lines*	Assay <i>In vitro</i>/ <i>In vivo</i>	Main effects and mechanism of action	Reference
Ellagic acid	Phenolic compounds	blackberries, grape seed, pomegranate, raspberries, tea, vanilla	ES-2 PA-1	<i>In vitro</i>	Inhibition of Bcl-2 level; Activation of caspase 3; Cell cycle arrest in G1 phase; Elevation of p53 and Cip1/ p2 levels; Suppression of cyclin D1 and E levels	[17]
Protocatechuic acid	Phenolic compounds	grapes, rice, olives	SKOV3 OVCAR3 A2780	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis, autophagy, and cell cycle arrest in G2/M phase. Activation of cleaved PARP, caspase 3 and Bax; Inhibition of Bcl-2.	[18]
10-Gingerol	Phenolic compounds	Ginger	HEY OVCAR3 SKOV3	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest in the G2 phase and decreased expression of cyclins A, B1, and D3.	[19]
Gallic acid	Phenolic compounds	blackberries, grape seed, pomegranate, raspberries, tea, vanilla	OVCAR3 A2780/CP-70	<i>In vitro</i>	Inhibition of VEGF and regulation of the PTEN / AKT / HIF-1 α pathway is responsible for the suppression of angiogenesis.	[20]
		isolated from <i>Caesalpinia mimosoides</i> Lamk	A2780 A2780AD	<i>In vitro</i>	Association of gallic acid with paclitaxel (PTX) decreased proliferation and cycle arrest G2/M; Sensitization of PTX-resistant ovarian carcinoma cells by ROS-mediated ERK inactivation.	[21]
Gallic acid, Myricetin	Phenolic compounds	black tea, green tea, or wine	SKOV3 OVCAR3	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> <i>In silico</i>	Induction of apoptosis; Cell cycle arrest; Inhibition the carbonic anhydrase IX and PI3K protein.	[8]

Apigenin, Luteolin, Myrecetin	Phenolic compounds	clery, herbs, parsley, chamomile, rooibos tea, <i>Capsicum</i> pepper, black tea, green tea, or wine	A2780 OVCAR3 SKOV3	<i>In vitro</i>	Activation of the extrinsic apoptotic pathway by caspase 3 and 9.	[22]
Flavonoides from chinese bayberry leaves: Miricetin 3-O-ramnoside, Quercetin 3-rhamnoside	Phenolic compounds	chinese bayberry leaves flavonoids	A2780/CP70	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis with increased expression of cleaved caspase 3 and 7; Positive regulation of Bad and Bax and negative regulation of Bcl-xL and Bcl-2; Reduced expression of cyclin D1 and CDK4 and p-Erk leading to G1 cell cycle arrest.	[23]
Flavonoides from <i>Scutellaria barbata</i> D. Don Quercetin-3-O-β-D-glycopyranoside, Luteolin-7-O-β-D-glycopyranoside, Rutin, Apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside, Hispidulin-7-O-β-D-glycuronide, Baicalin, Scutelarein, Luteolin, Quercetin, Apigenin, Naringenin, Baicalein, Wogonin	Phenolic compounds	<i>Scutellaria barbata</i> D. Don	A2780 SKOV3	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis by inhibition of Bcl-2 and induction of Caspase 3 and 9; Cell migration inhibitory effect by negative regulation of MMP-2/9 expression.	[24]
Curcumin, Epigallocatechin-3-gallate, Genistein, Resveratrol	Phenolic compounds	turmeric, tea, chocolate, grapes, soya, beans, chickpeas, alfalfa,	A2780 A2780 ^{cisR} A2780 ^{ZD0473R}	<i>In vitro</i>	Inhibition of NF-KB activation increasing apoptosis. Combined synergistic effect with platinum drugs.	[25]

		blueberries, peanuts, raspberries, wine				
Quercetin	Phenolic compounds	onion, kale, leek, broccoli, buckwheat, red grapes, tea, apples	PA-1 cells from human metastatic ovarian cancer	<i>In vitro</i>	Regulates the intrinsic apoptotic pathway by inhibiting Bcl-2, Bcl-xL and increasing expression of caspase-3, caspase-9, cytochrome c, Bid, Bad and Bax.	[26]
Baicalin Baicalein	Phenolic compounds	isolated from <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	OVCAR3/CP-70	<i>In vitro</i>	Decreased expression of VEGF, cMyc, NF- κ B and HIF-1 α .	[27]
Catechin, Ellagic acid, Epicatechin, Gallic acid, Nobiletin, Tangeretin, Baicalein, Baicalin	Phenolic compounds	black tea, green tea, wine, chocolate, grapes, <i>Citrus</i> fruits, and plants of the genus <i>Scutellaria</i>	OVCAR3 A2780/CP70	<i>In vitro</i>	VEGF inhibition exhibiting an anti-angiogenic effect in ovarian cancer cells.	[28]
Nobiletin	Phenolic compounds	fruits <i>Citrus</i>	A2780 OVCAR3	<i>In vitro</i>	Inhibition of cell proliferation and apoptosis by increasing the level of PARP cleavage. Decreased mitochondrial membrane potential and induction of reactive oxygen species generation and autophagy contributing to gasdermin D/gasdermin E mediated pyroptosis.	[29]
Curcumin	Phenolic compounds	Turmeric	SKOV3	<i>In vitro</i>	Increased MIR-9 expression and subsequent modulation of the Akt / FOXO1 axis preventing cell proliferation and stimulating apoptosis	[30]
			SKOV3 OVCAR3	<i>In vitro</i>	Increased sensitivity to cisplatin. Inhibition of Akt /mTOR/ERK and inhibition of NF κ B signaling activation inducing apoptosis.	[20]
			A2780/ADM	<i>In vitro</i>	Combined synergistic effect with paclitaxel drugs, raising the concentration of paclitaxel in tumor cells.	[31]

Resveratrol	Phenolic compounds	blueberries, grapes, peanuts, raspberries, wine	OVCAR3	<i>In vitro</i> <i>In silico</i>	Epigenetic modulation of miRNAs or lncRNAs.	[32]
Geraniin	Phenolic compounds	isolated from <i>Phyllanthus amarus</i> Schum & Thonn.	OVCAR3 SKOV3	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis with increased cytochrome c release and caspase-3 activity; Downregulation of Mcl-1 and NF- κ B p65 to the mcl-1 promoter.	[33]
Prodelphinidins from <i>Morella rubra</i> Lour	Phenolic compounds	isolated from <i>Morella rubra</i> Lour	OVCAR3	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis by activation of caspase, Bcl-2 and up-regulation of death receptor 5 (DR5) and Fas expression; Inhibition of the protein kinase B signaling pathway.	[34]
Corilagin	Phenolic compounds	isolated from <i>Phyllanthus niruri</i> L.	SKOV3ip Hey HO-8910PM	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Cell cycle arrest at the G2 /M; Negative regulation of Cyclin B1, Myt1, Phospho-cdc2 and Phospho-Weel; Blockade of the activation of the Smad and ERK/ AKT pathways;	[35]
Hirsutenone	Phenolic compounds	bark of <i>Alnus hirsuta</i> var. <i>sibirica</i>	CDDP-sensitive: OV2008 (wt-p53), A2780s (wt-p53), OVCAR-432 (p53-mutant). CDDP -resistant: OVCAR-433 (wt-p53), A2780cp, Occ-1 (p53-mutant), and SKOV3 (p53-null).	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis in CDDP-resistant strains through negative regulation of PI3K / Akt function, leading to XIAP degradation via proteasome-ubiquitin, and AIF-dependent apoptosis.	[36]
Theaflavin-3, 3'-digallate	Phenolic compounds	black tea	A2780/CP70 OVCAR3	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis by regulation of caspase-3 and -7 expression; Acting on the Wnt / β -catenin pathway.	[37]

Mangiferin	Phenolic compounds	plants of Anacardiaceae, Celastraceae and Gentianaceae	A2780 ES-2	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Negative regulation of the expression of metastasis- associated proteins MMP2 and MMP9.	[38]
Osthole	Phenolic compounds	isolated from <i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cusson	A2780 OV2008	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest in the G2 / M phase. Regulation of relative apoptotic protein Bcl-2, Bax and Caspase 3/9. Inhibition of the expression of metastasis-associated proteins MMP2 and MMP9.	[39]
Ethyl caffeate	Phenolic compounds	isolated from <i>Ligularia fischeri</i> (Ledeb.) Turcz	SKOV3	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest of G1 phase. Inactivation of mitogenic signaling pathways, such as Akt, ERK, and p38 (MAPK), and negative regulation of cell surface signaling molecules, including receptor tyrosine kinases, integrin $\alpha 3\beta 1$, and N- cadherin.	[40]
Oridonin	Terpenes	isolated from <i>Rabdosia rubescens</i> (Hemsl.) H.Hara	SKOV3 A2780	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest in G1/S phase and induction of apoptosis; Suppression of the mTOR signaling pathway and increased FOXP3 expression; - Reduced expression of MMP- 2 and MMP-9.	[41]
			SKOV3 OVCAR3 A2780	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Inhibition of the mTOR signaling pathway; Inhibitory effects on solid ovarian tumor growth.	[42]
Cryptotanshinone	Terpenes	isolated from <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge	A2780	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis by caspase pathway and inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression.	[43]
Triptolide	Terpenes	isolated from <i>Tripterygium wilfordii</i> Hook	carcinoma-derived COC1/ CDDP	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Induction of apoptosis via inhibition of PI3K / Akt-related proteins with reduced Akt and GSK3 β phosphorylation.	[44]
Cyparissins A and B	Terpenes	isolated from <i>Euphorbia cyparissias</i> L.	A2780, A2780 ADR	<i>In vitro</i>	P-glycoprotein-mediated inhibition of multidrug resistance.	[45]

Tanshinone IIA	Terpenes	Isolated from <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	A2780	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Apoptosis by PI3K/AKT /JNK signaling pathways and caspases 3, 8, 9.	[46]
			SKOV3	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest in the G2/M phase; Decrease of Bcl-2 and increase of Bax promoting apoptosis.	[47]
Betulinic acid	Terpenes	isolated from <i>Cornus walteri</i> Wagner	A2780	<i>In vitro</i>	Induction of caspase -8, -3, -9 and cleaved Bax and decrease of Bcl-2.	[48]
Ursolic acid	Terpenes	apple peels, cranberry juices, grape skins, holy basil, rosemary, thyme, oregano, sage, and other herbs	SKOV3	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest in the G2/M phase; Apoptosis by increase in Bax and decrease in Bcl-2 levels; Downregulation of PI3K/AKT signaling pathways.	[49]
Artemisinin, Oleanolic acid	Terpenes	isolated from <i>Artemisia annua</i> L.	A2780 A2780 ^{ZD0473R} A2780 ^{cisR}	<i>In vitro</i>	Modulation of platinum resistance mechanisms.	[9]
Betulinic acid, Ursolic acid	Terpenes	apples, cranberries, peppermint, prunes, oregano, thyme	A2780 A2780 ^{cisR} A2780 ^{ZD0473R}	<i>In vitro</i>	Combined synergistic effect with platinum drugs; Inhibition of NF-KB activation increasing apoptosis.	[25]
Kudsuphilactone B	Terpenes	isolated from <i>Schisandra chinensis</i> Baillon	A2780	<i>In vitro</i>	Activation of caspase -3, -8 and -9 and cleavages of PARP; Regulation of Bcl-2 and MAPK .	[50]
Cucurbitacin B	Terpenes	plants of Cucurbitaceae	A2780 paclitaxel resistant	<i>In vitro</i>	Cell cycle arrest in G2/M phase; Activation of caspase-3; Increased expression of p53 and p21; Decreased expression of P-glycoprotein.	[51]
Eclalbasaponin II	Saponins	isolated from <i>Eclipta prostrata</i> (L.) L.	SKOV3 A2780	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis through JNK signaling, p38 and mTOR inhibition.	[52]
Saponins of <i>Allium affine</i> Ledeb (unidentified)	Saponins	<i>Allium affine</i> Ledeb	OVCAR3	<i>In vitro</i>	Dose-dependent decrease in succinate dehydrogenase activity.	[53]
Saponins de <i>Tupistra chinensis</i> Baker	Saponins	<i>Tupistra chinensis</i> Baker	SKOV3	<i>In vitro</i>	G0 - G1 phase arrest of ovarian cancer cells by inhibition of Wnt / β -catenin signaling pathway, inhibition of cell	[54]

(unidentified)					proliferation and induction of apoptosis.	
Saponins from <i>Camellia sinensis</i>			OVCAR3	<i>In vitro</i>	Induced autophagy in ovarian cancer cells was accompanied by ERK activation and ROS generation.	[55]
Foliatheasaponin I Teaseedsaponin D Chakasaponin V Chakasaponin II Chakasaponin V	Saponins	<i>Camellia sinensis</i>	A2780/CP70	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis through the AKT-MDM2-p53 signaling pathway; Cell cycle arrest in S phase through regulation of ATM- Chk2 signaling pathway-related proteins.	[56]
Floratheasaponin A Floratheasaponin B Floratheasaponin C Floratheasaponin D Floratheasaponin E Floratheasaponin G Floratheasaponin J			A2780/CP70 OVCAR3 cells	<i>In vitro</i>	Activation of Caspase-3, 7, 8 and 9 activities; Inhibition of Cdc25A, Cdk2, Cyclin D1, E and A; Cell cycle arrest in S phase.	[57]
Dioscin	Saponins	present at high levels in leguminosae and Dioscoreaceae plants.	SKOV3	<i>In vitro</i>	Suppression of cell viability in ovarian cancer cells through regulation of VEGFR2 and PI3K / AKT / MAPK signaling pathways.	[58]
Ginsenoside 20(S)-Rg3	Saponins	red ginseng	SKOV3	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (<i>xenograft</i>)	Induction of autophagy by positive regulation of LC3 II, ATG5 and ATG7 which are associated with the autophagic process.	[59]
Withaferin A	Esteroid	isolated from <i>Withania somnifera</i> L.	CaOV3 SKOV3	<i>In vitro</i>	Negative regulation of Notch1, Notch3, cdc25C, total and phosphorylated Akt and bcl-2 proteins inducing apoptosis and cell cycle arrest.	[60]
Emetine	Alkaloids	<i>Ipecacuanha</i> species	A2780 A2780 ^{CisR}	<i>In vitro</i>	Synergistic effect of emetin with cisplatin leading to negative regulation of proteins (VIME, ENPL, GRP78, CARL, NACA and COF1) and positive regulation of PPIA and RSSA proteins.	[61]

			SKOV3	<i>In vitro</i>	Synergistic effect of emetine with cisplatin activating caspases -3, -7 and -8; Negative regulation of bcl-xL increasing sensitivity to cisplatin.	[13]
Palmatine	Alkaloids	isolated from <i>Rutidea parviflora</i> DC	A2780 OVCAR4	<i>In vitro</i>	Increased activity of caspase 3,7, and PARP cleavage.	[62]
Piperlongumine	Alkaloids	isolated from <i>Piper longum</i> L.	A2780 OVCAR3	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Induction of depletion of survivin protein levels through the proteasome-dependent pathway mediated by reactive oxygen species.	[63]
Piperine	Alkaloids	black peppers	SKOV3	<i>In vitro</i>	Synergistic effect with paclitaxel; Cell cycle arrest in sub-G1 phase; Increased Bax / Bcl-2 ratio and positive regulation of cyt-c, Bax, caspase-3 genes leading to modulation of pro- and anti-apoptotic genes.	[64]
			A2780	<i>In vitro</i>	Induction of apoptosis by intrinsic pathway mediated by JNK / p38 MAPK	[65]
Neferine	Alkaloids	isolated from the green seed embryos of <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	SKOV3 A2780	<i>In vitro</i>	Autophagy through activation of p38 MAPK / JNK.	[66]
Songorine	Alkaloids	<i>Aconitum soongaricum</i> Stap	SKOV3 A2780	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Antitumor effect through GSK3 β / β -catenin and Bcl-2 / Bax signaling pathways.	[67]
Harmine	Alkaloids	isolated from the seeds of <i>Peganum harmala</i> L. and <i>Banisteriopsis caapi</i> Morton	SKOV3	<i>In vitro</i>	Inhibition of proliferation and migration mediated by the ERK / CREB pathway; Suppression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 expression.	[68]
Berbamine	Alkaloids	isolated from <i>Berberis amurensis</i> Ruprecht	SKOV3 ES2	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Cell cycle arrest in the G0 / G1 phase; Inhibition of the Wnt / β -catenin pathway; Increased cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, Bax and decreased Bcl-2.	[69]

Thymoquinone	Quinones	derived from the seeds of the plant <i>Nigella Sativa</i> L.	OVCA429, SKOV3, HeyA8, OVCAR3, OVCAR8 cells	<i>In vitro</i>	Inhibition of oncogenic pathways stimulated by LPA (lysophosphatidic acid). Abrogates Gαi2-induced invasive migration of ovarian cancer cells, whereby LPA stimulates cell migration.	[70]
			A2780, A2780 ^{cisR} , A2780 ^{ZD0473R}	<i>In vitro</i>	Combined synergistic effect with platinum drugs; Inhibition of NF-KB activation increasing apoptosis.	[25]

***Abbreviations:** A2780 = human ovarian cancer cell line; OVCAR3 = human high-grade serous ovarian adenocarcinoma cell line; SKOV3 = human ovarian cancer cell line derived from a serous cystadenocarcinoma; A2780^{cisR} = cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line; A2780^{ZD0473R} = cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line; A2780/ADM or A2780AD = human ovarian carcinoma cell line resistant to adriamycin and multiple drugs (multidrug resistant); A2780/CP70 = cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line; PA-1 cells = human metastatic ovarian cancer cell line; SKOV3ip = human ovarian cancer cell line derived from a serous cystadenocarcinoma with a higher degree of migration potential; HO-8910PM = highly metastatic human ovarian cancer cell line; CDDP-sensitive = OV2008 (wt-p53), A2780s (wt-p53), OVCAR-432 (p53-mutant); CDDP-resistant = OVCAR-433 (wt-p53), A2780cp, Occ-1 (p53-mutant), and SKOV3 (p53-null); HEY = human ovarian cancer cell line; ES-2 = high grade serous ovarian cancer cell line; OV2008 = human epithelial ovarian cancer cell line; Ov7 = human ovarian cancer cell line carcinoma-derived; COC1/CDDP = cisplatin resistant human ovarian adenocarcinoma cell subline; CaOV3 = human ovarian cancer cell line with epithelial morphology; OVCAR4 = human ovarian cancer cell line with epithelial morphology growing in adherent culture; OVCA429 = human ovarian cancer cell line; HeyA8 = human high-grade serous ovarian adenocarcinoma cell line.; CDDP = cisplatin.

3.1 Antitumor effects of phytochemicals on ovarian cancers

Ovarian cancer is the main cause of death among all reproductive cancers in females [2,71]. The main treatment is chemotherapy, but patients who undergo this type of treatment often develop resistance after long-term chemotherapy, resulting in cancer progression [14]. Thus, resistance to chemotherapeutic agents, especially platinum derivatives and taxanes, drugs of first choice in the treatment of ovarian cancer is a condition that hinders the treatment of the tumor and, therefore, isolated or combined therapeutic alternatives are needed to increase patient survival [16].

In addition, drugs currently used for ovarian cancer therapy have significant toxicity to normal cells [72]. However, several natural products and phytochemicals have demonstrated selective cytotoxicity in ovarian cancer cell types, accompanied by minimal toxicity to normal [14,73].

In this context, phytochemicals belonging to the classes of phenolic compounds (flavonoids, phenolic acids, coumarins, tannins and stilbenes) terpenes (diterpenes, triterpenes, saponins) and alkaloids represent options for the development of new therapeutic agents for ovarian cancer, since they are recognized as safe, easy to obtain, with reduced toxic effects for long-term therapy, and are often cytotoxic to cancer cells but not to normal cells [8,9,12,22].

3.1.1 Phenolic compounds

Phenolic compounds are secondary metabolites of plants that have an aromatic ring attached directly to one or more hydroxyl (OH) and are widely distributed in nature, classified into different classes according to the arrangement of the carbon chain attached to the aromatic ring (C6) (C9): phenolic acids, flavonoids, coumarins, tannins, quinones and stilbenes compounds [74]. However, in this review, we observed that the studies of the antitumor effect of phenolic compounds in ovarian cancer are focused on phenolic acids and flavonoids.

3.1.1.1 Phenolic acids

Phenolic acids are a class of phenolic compounds that are associated with antitumor

capacity in several *in vitro* and *in vivo* studies by promoting apoptosis, reducing proliferation, and modulating various aspects of cancer such as angiogenesis, growth, differentiation, and metastasis [75]. Moreover, the therapeutic activities of phenolic acids are enhanced by their role as epigenetic regulators, as well as by minimizing adverse events or decreasing resistance associated with conventional antitumor therapy [21,76].

Their antitumor effect is mainly attributed to their antioxidant activity; being strong radical scavengers, metal chelators, modifiers of endogenous defense mechanisms such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidases (GPx), potentiators of the redox status of glutathione (GSH) and regulators of various proteins and transcription factors, such as nuclear factor related to erythroid 2 (NRF2) [77]. This antioxidant capacity of phenolic acids is important in ovarian cancer, as previous studies have observed increased expression of pro-oxidant enzymes and reduced expression of antioxidant enzymes in ovarian cancer epithelial tissues [18,78].

Furthermore, their anticarcinogenic effects are associated with their ability to inhibit cell proliferation through the extracellular signal-regulated kinase (Erk) pathway, D-type cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs); inhibit angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and microneural protein (MIC-1); express oncogenic signaling cascades (phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt); induce apoptosis and prevent cell migration and metastasis, through regulation of caspase-3, antiapoptotic *B-cell lymphoma protein 2* (Bcl-2) and pro-apoptotic *BCL-2 associated protein X* (Bax) [19,37,79,80].

Among the phenolic acids, ellagic acid (1), protocatechuic acid (2), 10-gingerol (3) and gallic acid (4) stand out (Figure 1).

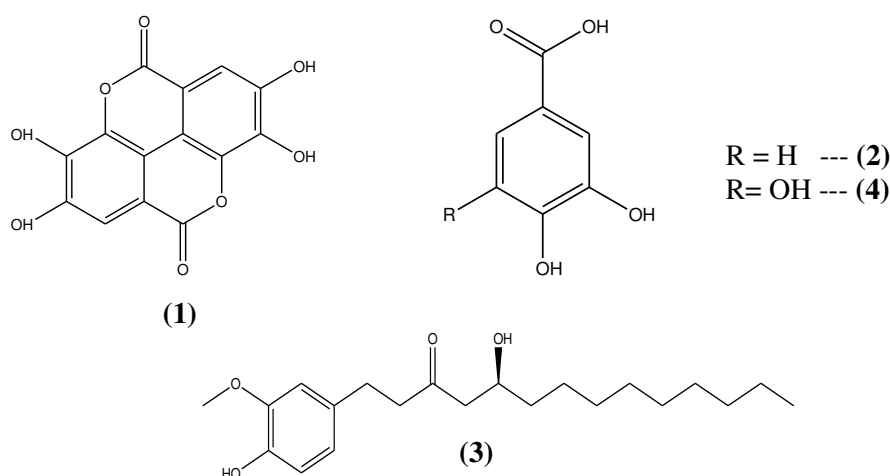


Figure 1. Chemical structures of phenolic acids with action on ovarian cancer.

Ellagic acid (**1**) induced apoptosis through inhibition of Bcl-2 and activation of caspase 3, and induced cell cycle arrest in G1 phase through elevation of p53 and Cip1/ p21 levels and suppression of cyclin D1 and E levels in ES-2 and PA-1 ovarian carcinoma cells [17].

Protocatechuic acid (**2**) demonstrated significant reduction in the viability of ovarian cell lines (SKOV3, OVCAR3 and A2780) through induction of apoptosis by activation of cleaved PARP, caspase-3 and Bax, as well as a negative up-regulation of Bcl-2 and cell cycle arrest in G2/M phase [18].

The phenolic acid 10-gingerol (**3**) suppressed the growth of HEY, OVCAR3 and SKOV3 ovarian cancer cells demonstrating G2 phase cell cycle arrest and decreased expression of cyclins A, B1 and D3 [19].

Gallic acid (**4**) selectively inhibited growth and angiogenesis *in vitro* of two ovarian cancer cell lines OVCAR3 and A2780/CP70, through inhibition of VEGF secretion by suppressing Akt phosphorylation and hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) expression and promoting tensin homologous phosphatase (PTEN) expression, which acts as a tumor suppressor gene, suggesting that the PTEN/AKT/HIF-1 α pathway is responsible for tumor suppression and angiogenesis *in vitro* [81].

Pre-clinical *in vivo* study performed with SKOV3 cells subcutaneously xenotransplanted into female nude mice treated with 50 mg/kg gallic acid for 28 days revealed inhibitory effects on tumor lesions with decreased vascularization, necrotic/fibrotic areas, retraction of the neoplastic stroma, induction of apoptosis and cell cycle regulation, through the PI3K and carbonic anhydrase IX pathway, suggesting that gallic acid can be considered as a starting point for the development of new agents for the treatment of ovarian cancer [8].

Moreover, the association of gallic acid with paclitaxel potentiated the ability of paclitaxel to decrease cell proliferation, induced cell cycle arrest in the G2/M phase in paclitaxel resistant A2780AD ovarian cancer cells and inactivated the Erk pathway suggesting that gallic acid may represent a useful adjuvant in the treatment of ovarian carcinoma, since the inhibited Erk pathway leads to a decrease in signaling events that promote cell growth and proliferation [21].

Regarding the low toxicity in normal cells, among the phenolic acids, we highlight the ellagic acid and gallic acid that selectively decreased the cell viability (*in vitro*) of cancer cells and did not influence the cell viability of normal cell line indicating that they have the effect

of selective inhibition of cell growth in ovarian carcinoma cells, thus suggesting that these phenolic acids may present greater safety for cancer treatment [17,21].

3.1.1.2 Flavonoids

Flavonoids are found in several plant species and have great importance as antitumor agent being investigated their therapeutic applications against cancer progression in recent years [82].

In ovarian cancer, its effects are associated with different molecular mechanisms including inhibition of DNA topoisomerase I/II, cell cycle arrest, increased expression of p53 [26,33,69,82], induction of apoptosis involving Bcl-2, Bax, Caspase 3 and 9 proteins, inhibition of NF- κ B activation, and inhibitory effect of cell migration by negatively regulating the expression of extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) [22].

The flavonoids apigenin (**5**), baicalein (**6**), baicalin (**7**), genistein (**8**), luteolin (**9**), quercetin (**10**), wogonin (**11**) and epigallocatechin-3-gallate (**12**) (Figure 2) have ability to inhibit pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 and inhibit nuclear factor κ B (NF- κ B), a pro-inflammatory transcription factor [20,25,27].

Nuclear factor κ B is a critical regulator of innate and adaptive immune responses, and can promote cell proliferation, migration, and angiogenesis, and inhibit apoptosis [83]. NF- κ B is vital for normal immune responses against infection, but deregulated NF- κ B activation is an important cause of chronic inflammatory diseases and can lead to tumor initiation [84]. NF- κ B also enhances tumor-initiated cell proliferation by increasing inflammatory cytokines and growth factors, therefore NF- κ B inhibition is an ideal therapeutic strategy for ovarian carcinoma treatment, since its inhibition can also lead to pro-apoptotic effects [73,85].

Most flavonoids have also been shown to regulate the expression of p53, a tumor suppressor gene, sensitize TRAIL-induced apoptosis (TNF receptor apoptosis-inducing ligand), and prevent or delay chemotherapy resistance [82,86]. Studies further indicate that apigenin (**5**), baicalein (**6**), baicalin (**7**), genistein (**8**), luteolin (**9**), quercetin (**10**) and, kaempferol (**13**) (Figure 2) inhibit VEGF production and suppress ovarian cancer cell metastasis *in vitro* [27,28]. Finally, wogonin (**11**) (Figure 2) can also contribute to cancer cell suppression by negatively regulating epithelial cell adhesion molecules (EpCAM), which play a role in carcinoma tumorigenesis and metastasis [87].

Another mechanism of action explored by articles is through the induction of apoptosis, either through the intrinsic or extrinsic pathway [88]. The intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway is regulated by the *B-cell lymphoma protein* family 2 (Bcl-2) that controls the release of cytochrome C from mitochondria to the cytosol, where it binds to the apoptotic protease-activating factor-1, promoting the activation of caspase-9 and then caspase-3, which leads to apoptosis [90]. The Bcl-2 family includes pro-apoptotic proteins (including Bad and Bax) and anti-apoptotic proteins (including Bcl-2 and Bcl-xl) [89]. In the extrinsic (cytoplasmic) pathway, apoptosis occurs through the interaction of death receptors that belong to the TNFR (tumor necrosis factor receptor) family of which FAS, TNF-R1 and TRAIL - R1 and 2 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 and 2), with their respective ligands FASL (FAs ligand), TNF- α and TRAIL, which after interaction activate the cascade of caspases 8 and 3, executing death by apoptosis [90].

Thus, the activation of an intrinsic or extrinsic pathway result in the activation of caspases triggering apoptosis [88]. In this context, quercetin (**10**) (Figure 2) regulates the intrinsic apoptotic pathway by reducing anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, Bcl-xL and increases the expression level of apoptotic pro- molecules such as caspase-3, caspase-9, cytoc-c, Bid, Bad and Bax [26]. Myricetin (**14**) (Figure 2) also led activation of the extrinsic apoptotic pathway through caspase 3 and 9 [8,22].

Additionally, another route of action that has been investigated for the treatment of ovarian cancer corresponds to the inhibition of poly-ADP-ribose polymerase (PARP inhibitors), since they block repair and lead to the accumulation of DNA breaks resulting in cell death [91]. PARP inhibitors show promising effects in ovarian carcinomas with mutations in tumor suppressor genes BRCA1 and BRCA2 (Breast Cancer type 1 and 2), because in normal cells these act as tumor suppressor, but cells with defective BRCA1 and 2 do not interrupt the cell cycle, do not stimulate the repair cycle and apoptosis, determining genomic instability and favoring tumorigenesis [92]. In this context, nobiletin (**15**) (Figure 2) induced apoptosis by raising the level of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleaved in ovarian cancer cells A2780 and OVCAR3 showing potential to act as a PARP inhibitor [29].

In addition, due to their potential for multiple cellular targets, acting in several cellular and molecular processes, flavonoids have been shown to be more effective than conventional anticancer drugs with higher selectivity for cancer cells and low toxicity in normal cells [93]. On this review, we highlight myricetin, apigenin, luteolin, baicalin and baicalein, which when evaluated by *in vitro* assays showed selective growth inhibition effect in ovarian carcinoma

cells [22,27].

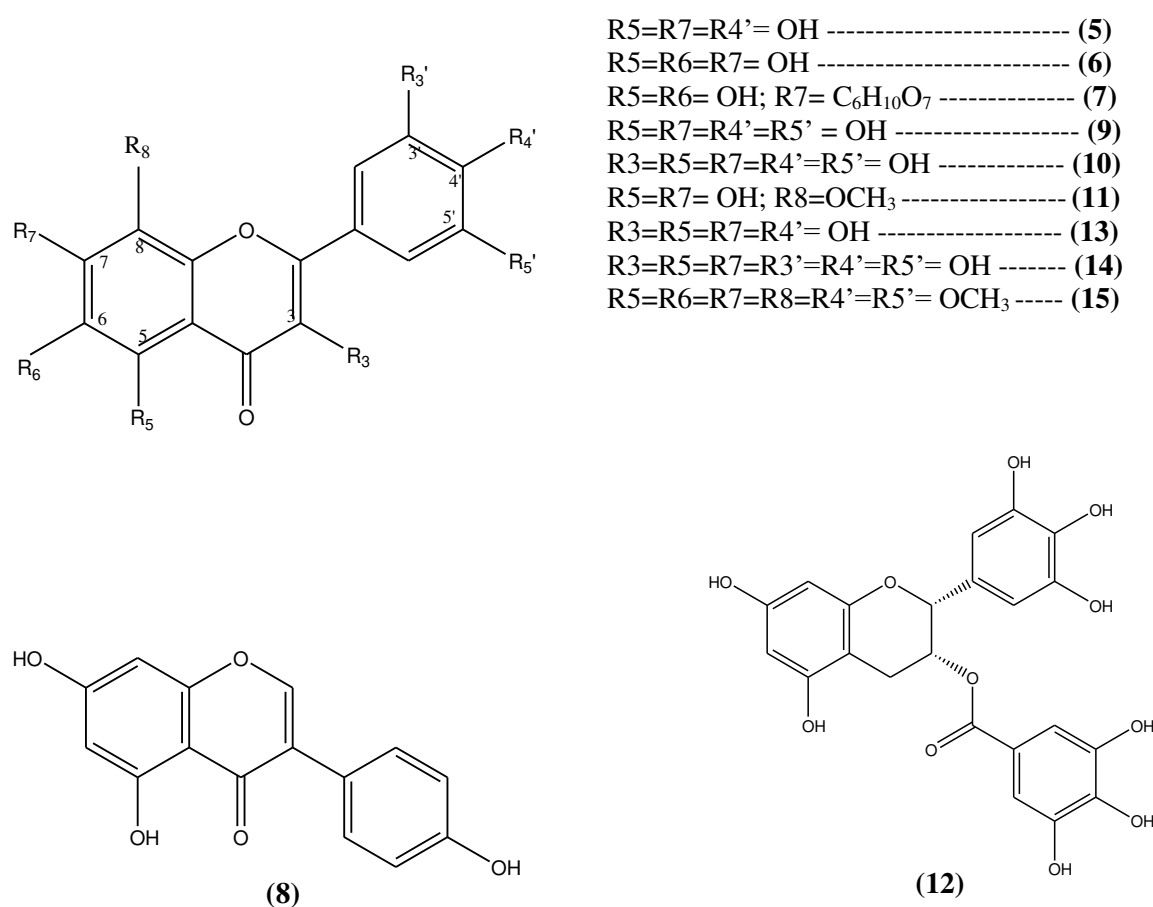


Figure 2. Chemical structures of flavonoids with action on ovarian cancer.

3.1.2 Terpenes

Terpenes, another major class of phytochemicals, have isoprene units in their structures and are known as isoprenoids. They can be classified according to the number of C5 isoprene units incorporated into the structure. In this way, terpenes form a large family of structurally diverse compounds, the hemiterpenes (C5, 1 isoprene unit) monoterpenes (C10, 2 isoprene units), the sesquiterpenes (C15, 3 isoprene units) the diterpenes (C20, 4 isoprene units), the triterpenes (C30, 6 isoprene units), tetraterpenes (C40, 8 isoprene units) and polyterpenes(C5) n , where n can be 9 to 30,000 isoprene units [94].

Some transformations in the structural carbon skeletons of terpenes lead to the biosynthesis of classes of natural products with their own physicochemical and

pharmacological properties, such as steroids, lipophilic vitamins, saponins and cardiotonic glycosides [95]. Among the terpenes with antitumor effect in ovarian cancer, the diterpenes, triterpenes and saponins stand out.

3.1.2.1- Diterpenes

Diterpenes are naturally occurring isoprenoid compounds that can be acyclic or polycyclic of the pimarane, kaurane, abietane, beyerene, trachylobane, atisirane or hibaene type [96].

Some diterpenes show antitumor activity known as taxanes (taxol/paclitaxel), triptolide, oridonin, andrographolide and coffee diterpenes (cafestol and kahweol) acting by different molecular mechanisms in cancer cells resulting in antioxidant effects, induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic pathway, cell cycle arrest, autophagy, angiogenesis inhibition and metastasis [10]. Among the diterpenes that show antitumor effect in ovarian cancer are: oridonin (**16**), cryptotanshinone (**17**), triptolide (**18**), cyparissins A (**19**) and B (**20**), tanshinone IIA (**21**) (Figure 3).

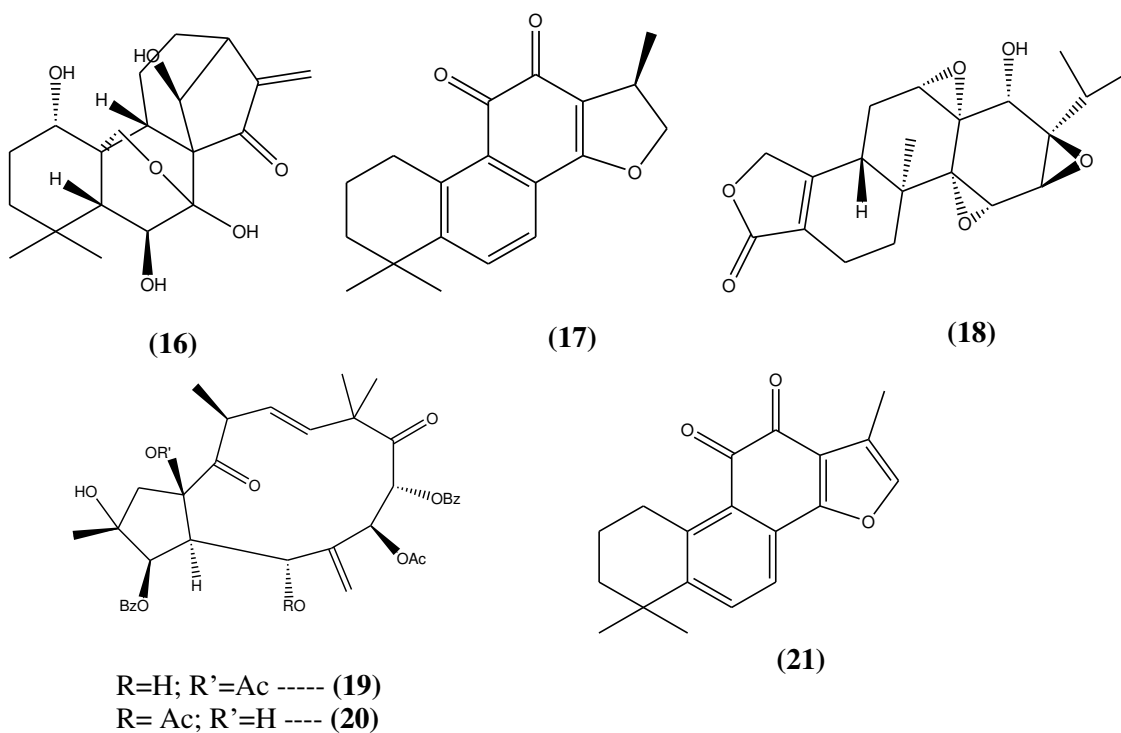


Figure 3. Chemical structures of diterpenes with action on ovarian cancer.

In vitro, oridonin (**16**) inhibited the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells through the inhibition of the mTOR signaling pathway, corroborating with the *in vivo* results, where reduced tumor growth of ovarian cancer cells (SKOV3) was observed [42]. Studies by Wang and Zhu [41] also observed the effect of oridonin (**16**) on SKOV3 and A2780 ovarian cancer cells verifying that this compound blocked cell cycle in G1/S phase, induced apoptosis in cells, suppressed mTOR signaling pathway, positively regulated the level of forkhead box protein 3 (FOXP3) and reduced the expression of MMP-2 and MMP-9, which are closely related to metastasis. Importantly, oridonin showed lower toxicity in normal cells showing higher selectivity for ovarian cancer cells [41,42].

Cryptotansinone (**17**) reduced the expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 leading to inhibition of A2780 cell invasion [43]. These proteolytic enzymes (MMP-2 and MMP-9) degrade various extracellular matrix molecules and promote ovarian cancer metastasis by remodeling the extracellular matrix of the tumor [97]. Thus, compounds that inhibit MMP-2 and MMP-9 expression contribute to inhibit metastasis [41,98].

In vitro and *in vivo* pre-clinical assays performed by Hu et al. [44] demonstrated that triptolide (**18**) induced cell apoptosis and tumor suppression through PI3K / Akt pathway, significant reduction of Akt phosphorylation and GSK3 β , in platinum-resistant human ovarian carcinoma-derived COC1 / DDP cells.

Cyparissins A (**19**) and B (**20**) inhibited P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and exhibited cytotoxic activity against human ovarian cancer A2780 and A2780 ADR cells [45].

Tanshinone IIA (**21**) induced apoptosis in ovarian cancer cells (A2780) by attenuating PI3K/AKT /JNK signaling pathways and through caspases 3, 8 e 9 [46]. Cell cycle arrest in G2/M phase, decrease of Bcl-2 and increase of Bax, promoting apoptosis of SKOV3 cells was also observed [47].

3.1.2.2 Triterpenes

Triterpenes are natural alkenes originated from plants, animals and fungi that have molecular structures consisting of six isoprene units with a total of thirty carbons [99]. The triterpenes can be classified into tetracyclic or pentacyclic and divided into groups according to their structural carbon skeletons: cucurbitane, cycloartane, dammarane, euphane, friedelane, holostane, hopane, lanostane, lupane, oleanane, protostane, tirucalane and ursane

[100]. The properties of these metabolites isolated from plants, have shown a wide spectrum of biological activities, such as: antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive, hepatoprotective, sedative effect, antiallergic, antiangiogenic, antimicrobial and antitumor [101].

In vitro and *in vivo* studies have demonstrated many antitumor effects of triterpenes, such as inhibition of cell proliferation, signal transduction effects, apoptosis, inhibition of matrix metalloproteinases secretion and tumor invasion [43,99]. Various signaling pathways, including STAT3, PI3K, Akt, NF- κ B, PTEN, TRAIL, p53, intrinsic and extrinsic apoptosis pathways have been shown to be involved in the antitumor effect of triterpenes [9,44,50,51].

The pentacyclic triterpenes among them betulinic acid (**22**), oleanolic acid (**23**) and ursolic acid (**24**) (Figure 4) stand out for their antitumor activity in ovarian cancer [102,103].

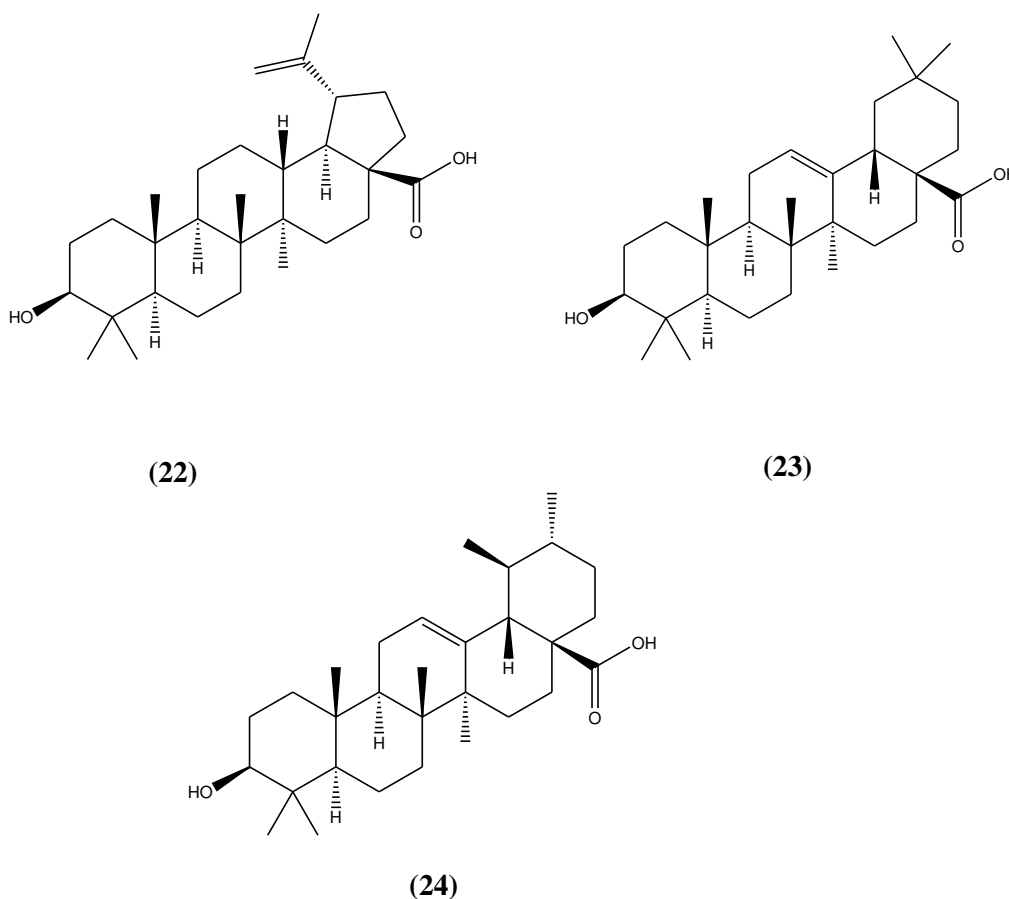


Figure 4. Chemical structures of triterpenes with action on ovarian cancer.

Betulinic acid (**22**) is highly promising due to its low toxicity in healthy cells and strong antiproliferative effects against ovarian cancer cells [104]. Lee et al. [48] demonstrated that betulinic acid induced apoptosis in A2780 cells through mitochondria-dependent and

mitochondria-independent pathways with increased expression levels of cleaved caspases 8, 3 and 9 and Bax and decreased Bcl-2.

Oleanolic acid (**23**) alone and in combination with cisplatin on human ovarian cancer cell lines A2780, A2780ZD0473R and A2780cisR showed apoptotic effect including the increase of p38 MAPK, ASK1 and ROS, and its inhibition effect of signaling pathways such as S6K, PI3K, mTOR, Akt and NF- κ B. These functions make oleanolic acid more active towards platinum resistant cells repressing different mechanisms involved in initiation, metastasis, invasion, and angiogenesis of platinum resistant ovarian cancer [9].

Ursolic acid (**24**) caused significant reduction in the viability of the SKOV-3 ovarian carcinoma cells in a dose-dependent manner via induction of apoptotic cell death which was associated with increase in Bax and decrease in Bcl-2 levels. Also, there was cycle arrest in G2/M and significant upsurge in ROS production [49].

Importantly, resistance to chemotherapeutic agents is the main barrier to effective treatment of advanced ovarian cancer [14]. The molecular mechanisms associated with chemotherapy resistance in ovarian cancer include increased drug efflux pump activity mediated by multidrug resistance protein 1 (MDR-1, also known as P-gp), increased DNA damage repair capacity, decreased apoptosis, and cell cycle arrest [105]. Oleanolic acid, betulinic acid and ursolic acid can increase the sensitivity of ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents [9]. Huq et al. [25] demonstrated that betulinic acid and ursolic acid when evaluated in A2780, A2780cisR, A2780ZD0473R strains inhibited NF-KB activation by increasing apoptosis and showed synergistic effect combined with platinum drugs [25].

3.1.3 Saponins

Saponins are glycosides of steroids or triterpenes (Figure 5) that present high solubility in water and polar solvents, action on cell membranes and complexation with steroids, being this last action responsible for their antifungal and hypocholesterolemic effect [106]. Among the most cited activities for saponins in the scientific literature hemolytic, molluscicide, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial/antimicrobial, antiparasitic, antiviral, and cytotoxic/antitumor stands out [107]. In the antitumor activity, saponins act through multiple targets and cell signaling pathways, to disrupt the homeostasis of the tumor cell, inhibiting its multiplication and angiogenesis or causing its death by inducing apoptosis and cell cycle arrest [108].

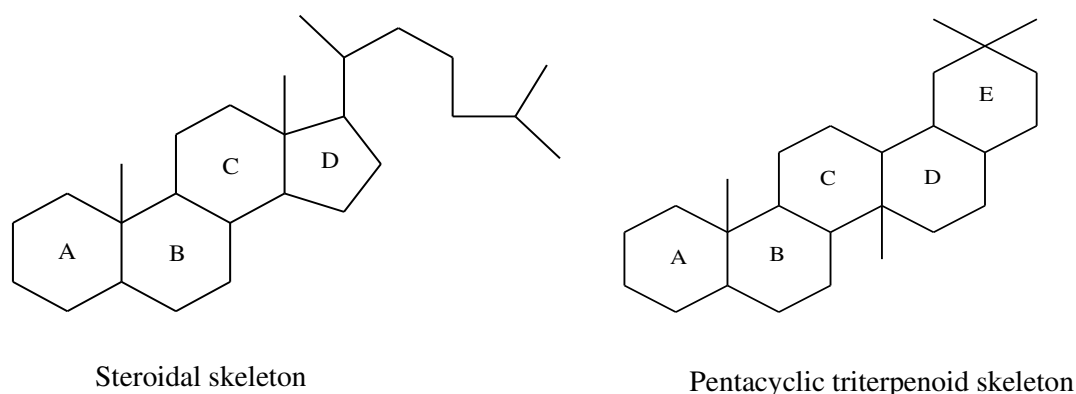


Figure 5. Skeleton of steroidal and triterpenic saponins.

According to Sobolewska et al. [109], only 3.6% of studies conducted for antitumor activity with saponins are related to ovarian cancer. However, these compounds stand out for presenting multiple molecular targets, being able to modulate several oncogenic processes (cancer cell proliferation, migration, apoptosis), inhibit angiogenesis and sensitize chemotherapy-resistant ovarian cancer cells [110,111].

The saponins from *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze flowers have drawn attention for their antitumor effects [112]. Tu et al. [56] demonstrated that *Camellia sinensis* flowers saponins induce apoptosis in human ovarian cancer A2780/CP70 cells showing a strong antiproliferative effect, causing less cytotoxicity to normal cells as well as S-phase arrest through the regulation of proteins related to ATM- Chk2 signaling pathway. In addition, the study also demonstrated the induction of intrinsic and extrinsic apoptosis in A2780/CP70 cells through the Akt-MDM2-p53 signaling pathway by reducing activation of Akt and MDM2 (*Murine double minute 2*), a negative regulator of the tumor suppressor p53, and increasing p53 levels in cells.

Ji et al. [54] demonstrated the effect of saponins from *Tupistra chinensis* Baker on proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells (SKOV3) through the Wnt/ β -catenin pathway. The Wnt/ β -catenin signaling pathway is an intracellular signal transduction pathway that is involved in the regulation of various cellular processes, such as cell survival, apoptosis, and self-renewal [113]. In ovarian cancer, this activated pathway promotes tumor cell proliferation, survival, migration, and invasion, and induces drug resistance [114]. Zhang et al. [115] and Cao et al. [116] showed that inhibition of Wnt / β -catenin signaling pathway can

inhibit ovarian cancer progression.

Dioscin treatment increased cell apoptosis in ovarian cancer SKOV3 cells with progressive increase of concentration through caspase-3, caspase-9, Bax and poly (ADP-ribose) polymerase cleaved pathway, suppressing the expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), phosphoinositide-3-kinase (PI3K), phosphorylated AKT and phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in SKOV3 cells [58].

In vitro and *in vivo* studies with ginsenoside 20(S)-Rg3 demonstrated induction of autophagy in SKOV3 ovarian cancer cells with positive regulation of molecules involved in the autophagic process, including *Light chain 3 protein (LC3 II)*, *Autophagy related protein 5* and *7 (ATG5 and ATG7)*, with this mechanism being responsible for tumor suppression [59].

In addition, saponins used in combination therapy with antineoplastics (cisplatin, paclitaxel) increase the sensitivity of chemoresistant tumor cells to clinically used chemotherapeutic agents [108].

3.1.4 Alkaloids

Alkaloids are cyclic metabolites that have nitrogen in a negative oxidation state and have limited distribution in living organisms. Their biosynthesis is complex and varied, where true alkaloids and protoalkaloids originate from amino acids, while pseudoalkaloids derive from other pathways incorporating nitrogen by transamination reaction [117].

They present antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, and antitumor properties operating in several molecular targets, being recognized for having neurotransmitter characteristics and cytotoxic potential [118].

Among the alkaloids used in cancer treatment of various types of tumors, we can mention vinblastine and vincristine that are obtained from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and camptothecin, obtained from the Chinese species *Camptotheca acuminata* Decne, which enabled the development of anticancer drugs, such as topotecan and irinotecan [11].

In the context of ovarian cancer, we can highlight emetine (**25**), palmatine (**26**), piperlongumine (**27**), piperine (**28**), neferine (**29**), songorin (**30**), berbarine (**31**) and harmine (**32**) (Figure 6).

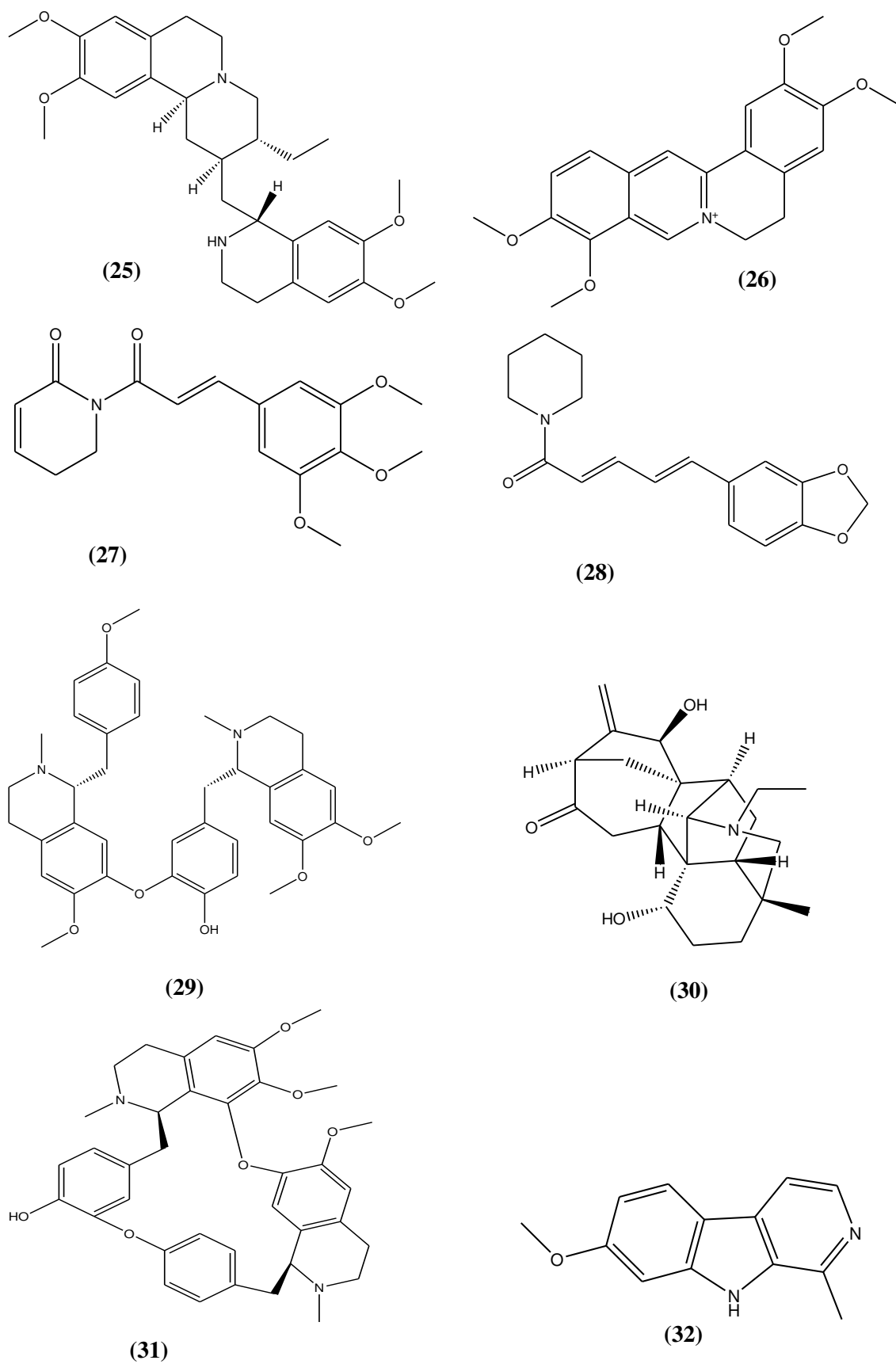


Figure 6. Chemical structures of alkaloids with action on ovarian cancer.

Emetine (**25**) in combination with cisplatin in A2780 and A2780^{CisR} cells (*in vitro*) demonstrated synergistic effect and induced negative regulation of six proteins (VIME, ENPL, GRP78, CARL, NACA and COF1) as well as positive regulation of PPIA and RSSA proteins leading to cisplatin dose reductions in the ovarian cancer cell line A2780 [61]. Sun et al. [13] also found that coadministration of cisplatin and emetine increased apoptotic cell death after 72 hours in the ovarian cancer cell line SKOV3 demonstrating activation of caspases -3, -7 and -8, with sensitization of cancer cells to the action of cisplatin being correlated with negative regulation of Bcl-xL by emetine.

Palmitine (**26**), *in vitro*, induced in A2780 and OVCAR4 cells apoptosis through caspase 3, 7 pathway and poly-ADP-ribose polymerase cleavage. Interestingly, in comparison to carboplatin, palmitine was shown to be more selective for ovarian carcinoma cells where it showed higher cytotoxicity than in human ovarian epithelial cells [62].

Piperlongumine (**27**) induced, *in vitro*, depletion of survivin protein levels through proteasome-dependent pathway mediated by reactive oxygen species and inhibited ovarian cancer cell xenograft tumor growth by downregulating survivin *in vivo*, without exhibiting systemic toxicity [63]. Survivin is an anti-apoptosis protein and its overexpression in ovarian cancer increases resistance to apoptosis and chemotherapy [27]. Thus, piperlongumine may be a safe alternative, since it presents low toxicity, to overcome resistance to apoptosis triggered by survivin overexpression.

Piperine (**28**) exhibited selective cytotoxic effect on A2780 ovarian cancer cells by inducing apoptosis through the activation pathway of caspases-3 and -9 as well as cleaved PARP and decreased phosphorylation of JNK and p38 MAPK [65]. The synergistic effect of piperine with paclitaxel was also verified, where cell cycle arrest in sub-G1 phase was observed in SKOV3 cells, increased Bax/Bcl-2 ratio and positive regulation of cyt-c, Bax and caspase-3 modulating pro- and antiapoptotic genes [64].

Neferine (**29**) induced G1 cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy of human ovarian cancer cells via activation of p38 MAPK / JNK [66]. The signaling pathway involving JNK (c-Jun N-terminal kinase) and p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) play important roles in proliferation, differentiation, and apoptosis by activating intrinsic apoptotic pathway [119].

Songorine (**30**) exerted its antitumor effect through GSK3 β / β -catenin and Bcl-2 / Bax signaling pathways. These results highlight the potential use of songorine as a novel therapeutic agent for ovarian cancer, since the increased stability of GSK3 β protein can

accelerate the degradation of β -catenin resulting in negative regulation of MMP secretion inhibiting tumor invasion and migration [67].

Berberamine (**31**) inhibited, *in vitro* and *in vivo*, cell proliferation and tumor growth by inducing cell cycle arrest in G0/G1 phase and signaling of Wnt/ β -catenin pathway inducing apoptosis with increased expression of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, Bax and decreased protein level of Bcl-2 [69].

Harmine (**32**) inhibited SKOV3 cell proliferation and migration mediated by the ERK/CREB pathway and suppressed vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase (MMP) family MMP-2 and MMP-9 expression [68].

In this context, it is possible to realize that the alkaloids have antitumor effects by different mechanisms of action and can be used as a therapeutic alternative in isolation or in combination, since the synergistic effect potentiates the antitumor response.

3.2 Association of phytochemicals with antineoplastic drugs to overcome chemoresistance and/or increase chemosensitivity to ovarian cancer treatment.

Increased knowledge of the molecular mechanisms underlying cancer progression has led to the development of many antineoplastic drugs. However, ovarian cancer still presents a limiting factor to treatment, since the tumor presents chemoresistance, especially to cisplatin and paclitaxel, which correspond to the standard treatment in ovarian cancer, resulting in cancer progression [3].

The main factors involved in the development of drug resistance are the multidrug resistance gene (MDR1), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and serine/threonine protein kinase Akt [14]. In addition, molecular mechanisms associated with increased P- glycoprotein-mediated drug efflux pump activity, increased DNA damage repair capacity and decreased apoptosis are associated with resistance in ovarian cancer chemotherapy [15].

Acquired resistance to cisplatin in ovarian cancer has been shown to be linked to NF- κ B activation, while the chemosensitization of ovarian cancer cells due to the combination of cisplatin with phytochemicals such as genistein, curcumin and resveratrol is related to NF- κ B inactivation with increased sensitivity to cisplatin as the concentration is increased [25].

He et al. [20] found that curcumin increased sensitivity to cisplatin with progressively increasing concentration in SKOV3 and OVCAR3 cell lines with inhibition of NF- κ B and

activation of apoptosis through Akt/mTOR/ERK signaling pathway. It was also possible to observe that curcumin showed synergistic effect combined with paclitaxel [31].

Association of gallic acid with paclitaxel decreased proliferation of A2780 and A2780AD cells and led to G2/M cycle arrest with sensitization of paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cells through ERK-mediated inactivation of reactive oxygen species [21].

Hirsutenone induces apoptosis in cisplatin-resistant strains through negative regulation of PI3K/Akt function, leading to XIAP degradation, via proteasome-ubiquitin, and AIF-dependent apoptosis [36].

Resveratrol reversed ovarian cancer cell resistance to cisplatin through modulation of molecular targets, including the receptor tyrosine kinase family EGFR or VEGFR [120].

Thymoquinone, enhances cisplatin-mediated cytotoxicity in ovarian cancer cells associated with NF- κ B inhibition [25].

Berberine sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin by inhibiting the miR- 93/ PTEN / Akt signaling pathway [14].

Theaflavin-3,3'-digalate enhanced the growth inhibitory effect of cisplatin in ovarian cancer cells through negative regulation of glutathione (GSH) and positive regulation of copper transporter 1 (CTR1) [37].

Betulinic acid and ursolic acid showed synergistic effect combined with platinum drugs with inhibition of NF-KB activation and increasing apoptosis [25].

Emetine and piperine showed synergistic effect with cisplatin and paclitaxel, respectively. For emetine, eight proteins (VIME, ENPL, GRP78, CARL, NACA, COF1, PPIA and RSSA) were considered for the combined actions with cisplatin [61]. The synergistic effect of piperine with paclitaxel interrupted cell cycle in sub-G1 phase, increased Bax / Bcl-2 ratio and induced positive regulation of cyt-c Bax, caspase- 3 genes leading to modulation of pro- and antiapoptotic genes [64]. It has also been shown that piperine can enhance anticancer drug activity in various drug- resistant cancer cells [121].

Therefore, phytochemicals combined with platinum derivatives (cisplatin and oxaliplatin) or taxane derivatives (paclitaxel) can increase antitumor activity by inducing apoptosis through pro-apoptotic signaling, such as MAPKs, p53 and anti-apoptotic Bcl- 2 pathway, NF- κ B, Nrf2, since defects in apoptotic signaling are closely related to resistance to cisplatin and paclitaxel, and this synergism is responsible for decreasing chemoresistance and increasing sensitization.

4. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

In this review article, we demonstrate that phytochemicals have antitumor effects on ovarian cancer (Figure 7) by several mechanisms of action and increase the chemosensitivity to platinum derivatives and taxanes. The main phytochemicals include phenolic acids, flavonoids, diterpenes, triterpenes, saponins and alkaloids presenting as molecular targets NF- κ B, PARP, Akt, ERK, MAPKs, p53, VEGF, MMP, Wnt/ β -catenin, autophagy, and apoptotic pathways. Moreover, several phytochemicals showed synergistic effect with cisplatin and paclitaxel decreasing chemoresistance and toxicity induced by chemotherapeutic agents. Therefore, phytochemicals can be isolated or adjuvant therapeutic alternatives in the treatment of ovarian cancer.

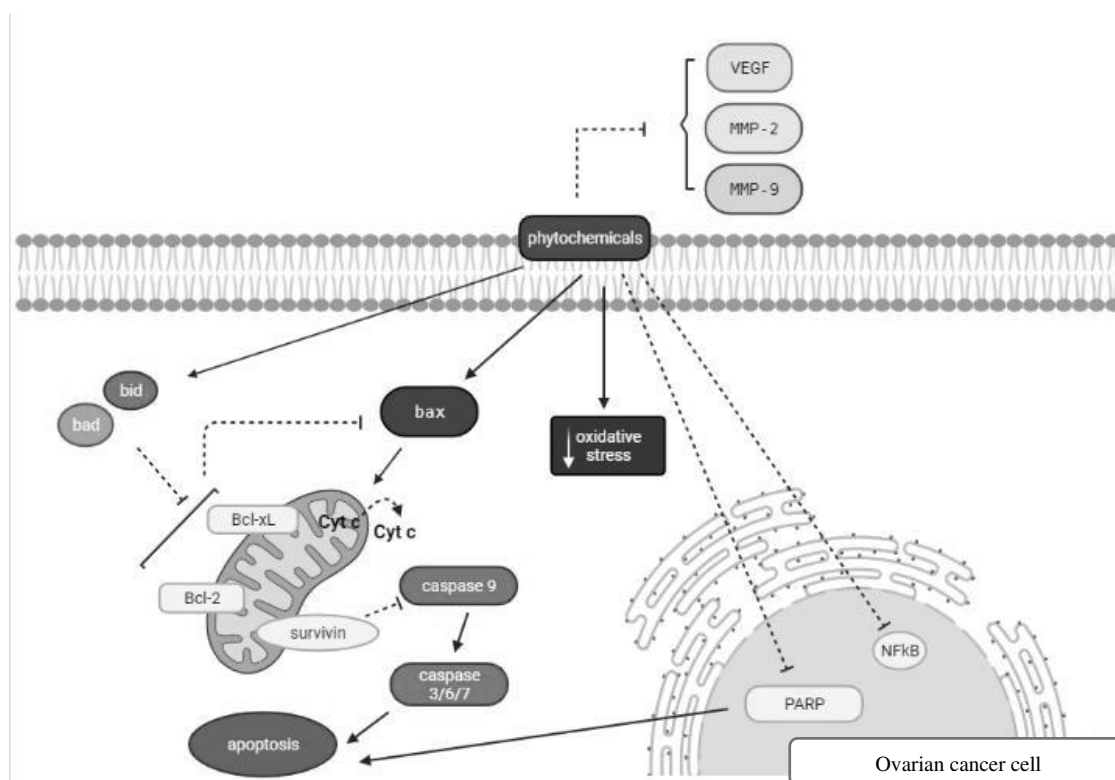


Figure 7. Schematic representation in targeting different signaling pathways by phytochemicals in ovarian cancer.

CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Josianne Rocha Barboza: Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. Alberto Jorge Oliveira Lopes: Writing - review & editing. Francisco Assis Nascimento Pereira:

Writing - review & editing. Maria Nilce de Sousa Ribeiro: Conceptualization, Writing - review & editing.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Foundation for Research and Scientific and Technological Development of Maranhão (FAPEMA) for the financial support (No. 026/2017) to carry out the work and the scholarship of doctoral student Josianne Rocha Barboza and to the CAPES for master's scholarship to Francisco Assis Nascimento Pereira. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Finance Code 001.

REFERENCES

- [1] Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018;68. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021;71. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [3] Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ* 2020. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3773>.
- [4] Stewart CJR, Stewart LM, Holman CDJ, Jordan S, Semmens J, Spilsbury K, et al. Value of Pathology Review in a Population-based Series of Ovarian Tumors. *International Journal of Gynecological Pathology* 2017;36. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000342>.
- [5] Radu MR, Prădatu A, Duică F, Micu R, Crețoiu SM, Suci N, et al. Ovarian Cancer: Biomarkers and Targeted Therapy. *Biomedicines* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060693>.
- [6] Grunewald T, Ledermann JA. Targeted Therapies for Ovarian Cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2017;41. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.12.001>.
- [7] Shafabakhsh R, Asemi Z. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of Ovarian Research* 2019;12. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4>.

- [8] Varela-Rodríguez L, Sánchez-Ramírez B, Hernández-Ramírez VI, Varela-Rodríguez H, Castellanos-Mijangos RD, González-Horta C, et al. Effect of Gallic acid and Myricetin on ovarian cancer models: a possible alternative antitumoral treatment. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 2020;20. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02900-z>.
- [9] Althurwi SI, Yu JQ, Beale P, Huq F. Sequenced Combinations of Cisplatin and Selected Phytochemicals towards Overcoming Drug Resistance in Ovarian Tumour Models. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21207500>.
- [10] Islam MT. Diterpenes and Their Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Phytotherapy Research* 2017;31. <https://doi.org/10.1002/ptr.5800>.
- [11] Efferth T, Oesch F. Repurposing of plant alkaloids for cancer therapy: Pharmacology and toxicology. *Seminars in Cancer Biology* 2021;68. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.010>.
- [12] Ibrahim SRM, Khedr AIM, Mohamed GA, Zayed MF, El-Kholy AA-ES, al Haidari RA. Cucumol B, a new triterpene benzoate from *Cucumis melo* seeds with cytotoxic effect toward ovarian and human breast adenocarcinoma. *Journal of Asian Natural Products Research* 2019;21. <https://doi.org/10.1080/10286020.2018.1488832>.
- [13] SUN Q, YOGOSAWA S, IIZUMI Y, SAKAI T, SOWA Y. The alkaloid emetine sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin through downregulation of bcl-xL. *International Journal of Oncology* 2015;46. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2703>.
- [14] Sun C-Y, Zhang Q-Y, Zheng G-J, Feng B. Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.010>.
- [15] Yan Y-B, Tian Q, Zhang J-F, Xiang Y. Antitumor effects and molecular mechanisms of action of natural products in ovarian cancer (Review). *Oncology Letters* 2020;20. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12001>.
- [16] Woźniak M, Krajewski R, Makuch S, Agrawal S. Phytochemicals in Gynecological Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22031219>.
- [17] Chung Y-C, Lu L-C, Tsai M-H, Chen Y-J, Chen Y-Y, Yao S-P, et al. The Inhibitory Effect of Ellagic Acid on Cell Growth of Ovarian Carcinoma Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/306705>.
- [18] Xie Z, Guo Z, Wang Y, Lei J, Yu J. Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Phytotherapy Research* 2018;32. <https://doi.org/10.1002/ptr.6163>.
- [19] Rasmussen A, Murphy K, Hoskin DW. 10-Gingerol Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth by Inducing G2Arrest. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2019;9. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.080>.
- [20] He M, Wang D, Zou D, Wang C, Lopes-Bastos B, Jiang WG, et al. Re-purposing of curcumin as an anti-metastatic agent for the treatment of epithelial ovarian cancer: *in vitro* model using cancer stem cell enriched ovarian cancer spheroids. *Oncotarget* 2016;7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13413>.

- [21] Sánchez-Carranza JN, Díaz JF, Redondo-Horcajo M, Barasoain I, Alvarez L, Lastres P, et al. Gallic acid sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells through an increase in reactive oxygen species and subsequent downregulation of ERK activation. *Oncology Reports* 2018;39. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6382>.
- [22] Tavsan Z, Kayali HA. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;116. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109004>.
- [23] Zhang Y, Chen S, Wei C, Rankin GO, Ye X, Chen YC. Flavonoids from Chinese bayberry leaves induced apoptosis and G1 cell cycle arrest via Erk pathway in ovarian cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018;147. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.084>.
- [24] Zhang L, Ren B, Zhang J, Liu L, Liu J, Jiang G, et al. Anti-tumor effect of *Scutellaria barbata* D. Don extracts on ovarian cancer and its phytochemicals characterisation. *Journal of Ethnopharmacology* 2017;206. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.032>.
- [25] Huq F, Yu JQ, Beale P, Chan C, Arzuman L, Nessa MU, et al. Combinations of platinum and selected phytochemicals as a means of overcoming resistance in ovarian cancer. *Anticancer Research* 2014;34.
- [26] Teekaraman D, Elayapillai SP, Viswanathan MP, Jagadeesan A. Quercetin inhibits human metastatic ovarian cancer cell growth and modulates components of the intrinsic apoptotic pathway in PA-1 cell line. *Chemico-Biological Interactions* 2019;300. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.008>.
- [27] Chen J, Li Z, Chen A, Ye X, Luo H, Rankin G, et al. Inhibitory Effect of Baicalin and Baicalein on Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14. <https://doi.org/10.3390/ijms14036012>.
- [28] HE Z, LI B, RANKIN GO, ROJANASAKUL Y, CHEN YC. Selecting bioactive phenolic compounds as potential agents to inhibit proliferation and VEGF expression in human ovarian cancer cells. *Oncology Letters* 2015;9. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2818>.
- [29] Zhang R, Chen J, Mao L, Guo Y, Hao Y, Deng Y, et al. Nobiletin Triggers Reactive Oxygen Species-Mediated Pyroptosis through Regulating Autophagy in Ovarian Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2020;68. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07908>.
- [30] Zhao S-F, Zhang X, Zhang X-J, Shi X-Q, Yu Z-J, Kan Q-C. Induction of MicroRNA-9 Mediates Cytotoxicity of Curcumin Against SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014;15. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.8.3363>.
- [31] Liu Z, Zhu Y-Y, Li Z-Y, Ning S-Q. Evaluation of the efficacy of paclitaxel with curcumin combination in ovarian cancer cells. *Oncology Letters* 2016;12. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5192>.
- [32] Vallino L, Ferraresi A, Vidoni C, Secomandi E, Esposito A, Dhanasekaran DN, et al. Modulation of non-coding RNAs by resveratrol in ovarian cancer cells: In silico analysis and literature review of the anti-cancer pathways involved. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2020;10. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.02.006>.

- [33] Wang X, Chen Z, Li X, Jiang Z, Zhao Y, Ping F. Geraniin suppresses ovarian cancer growth through inhibition of NF- κ B activation and downregulation of Mcl-1 expression. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2017;31. <https://doi.org/10.1002/jbt.21929>.
- [34] Fu Y, Ye X, Lee M, Rankin G, Chen YC. Prodelphinidins isolated from Chinese bayberry leaves induces apoptosis via the p53-dependent signaling pathways in OVCAR-3 human ovarian cancer cells. *Oncology Letters* 2017;13. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5813>.
- [35] Jia L, Jin H, Zhou J, Chen L, Lu Y, Ming Y, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF- β signaling pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013;13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-33>.
- [36] Farrand L, Kim JY, Byun S, Im-aram A, Lee J, Suh J-Y, et al. The Diarylheptanoid Hirsutenone Sensitizes Chemoresistant Ovarian Cancer Cells to Cisplatin via Modulation of Apoptosis-inducing Factor and X-linked Inhibitor of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2014;289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513879>.
- [37] Pan H, Kim E, Rankin GO, Rojanasakul Y, Tu Y, Chen YC. Theaflavin-3,3'-digallate inhibits ovarian cancer stem cells via suppressing Wnt/ β -Catenin signaling pathway. *Journal of Functional Foods* 2018;50. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.021>.
- [38] Zeng Z, Lin C, Wang S, Wang P, Xu W, Ma W, et al. Suppressive activities of mangiferin on human epithelial ovarian cancer. *Phytomedicine* 2020;76. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153267>.
- [39] Jiang G, Liu J, Ren B, Tang Y, Owusu L, Li M, et al. Anti-tumor effects of osthole on ovarian cancer cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 2016;193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.045>.
- [40] Lee HN, Kim J-K, Kim JH, Lee S-J, Ahn E-K, Oh JS, et al. A mechanistic study on the anti-cancer activity of ethyl caffeate in human ovarian cancer SKOV-3 cells. *Chemico-Biological Interactions* 2014;219. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.05.017>.
- [41] Wang Y, Zhu Z. Oridonin inhibits metastasis of human ovarian cancer cells by suppressing the mTOR pathway. *Archives of Medical Science* 2019;15. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.77068>.
- [42] Xia R, Chen S-X, Qin Q, Chen Y, Zhang W-W, Zhu R-R, et al. Oridonin Suppresses Proliferation of Human Ovarian Cancer Cells via Blockage of mTOR Signaling. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2016;17. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.2.667>.
- [43] Jiang G, Liu J, Ren B, Zhang L, Owusu L, Liu L, et al. Anti-tumor and chemosensitization effects of Cryptotanshinone extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bge. on ovarian cancer cells in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 2017;205. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.026>.
- [44] Hu H, Luo L, Liu F, Zou D, Zhu S, Tan B, et al. Anti-cancer and Sensibilisation Effect of Triptolide on Human Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Cancer* 2016;7. <https://doi.org/10.7150/jca.16178>.
- [45] Lanzotti V, Barile E, Scambia G, Ferlini C. Cyparissins A and B, jatrophone diterpenes from *Euphorbia cyparissias* as Pgp inhibitors and cytotoxic agents against ovarian cancer cell lines. *Fitoterapia* 2015;104. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.012>.

- [46] Zhang X, Zhou Y, Gu Y. Tanshinone IIA induces apoptosis of ovarian cancer cells in vitro and in vivo through attenuation of PI3K/AKT/JNK signaling pathways. *Oncology Letters* 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9744>.
- [47] Huang J, Lin H, Hong Y. *In vitro* anti-tumor activity of the tanshinone IIA against SKOV3 cells. *Natural Product Research* 2016;30. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1068774>.
- [48] Lee D, Lee SR, Kang KS, Ko Y, Pang C, Yamabe N, et al. Betulinic Acid Suppresses Ovarian Cancer Cell Proliferation through Induction of Apoptosis. *Biomolecules* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/biom9070257>.
- [49] Lin W, Ye H. Anticancer activity of ursolic acid on human ovarian cancer cells via ROS and MMP mediated apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of PI3K/AKT pathway. *Journal of BUON: Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 2020;25.
- [50] Jeong M, Kim HM, Kim HJ, Choi J-H, Jang DS. Kudsophilactone B, a nortriterpenoid isolated from *Schisandra chinensis* fruit, induces caspase-dependent apoptosis in human ovarian cancer A2780 cells. *Archives of Pharmacal Research* 2017;40. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0902-5>.
- [51] Qu Y, Cong P, Lin C, Deng Y, Li-Ling J, Zhang M. Inhibition of paclitaxel resistance and apoptosis induction by cucurbitacin B in ovarian carcinoma cells. *Oncology Letters* 2017;14. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6148>.
- [52] Cho YJ, Woo J-H, Lee J-S, Jang DS, Lee K-T, Choi J-H. Eclalbasaponin II induces autophagic and apoptotic cell death in human ovarian cancer cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2016;132. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.02.006>.
- [53] Kazemi M, Zolfaghari B, Keyvanlo Shahrestanaki M, Sadeghi Dinani M. Cytotoxic Effects of *Allium affine* Ledeb Butanolic Fraction on Breast and Ovary Cancer Cell Lines. *Journal of Medicinal Plants* 2017;16:83–90.
- [54] Ji X, Yang C, Xie J, Yin X, Hu Q. Effect of Saponin from *Tupistra chinensis* Baker on proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by Wnt/ β -Catenin pathway. *IUBMB Life* 2020;72. <https://doi.org/10.1002/iub.2308>.
- [55] Wang Y, Xia C, Chen L, Chen YC, Tu Y. Saponins Extracted from Tea (*Camellia Sinensis*) Flowers Induces Autophagy in Ovarian Cancer Cells. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25225254>.
- [56] Tu Y, Chen L, Ren N, Li B, Wu Y, Rankin GO, et al. Standardized Saponin Extract from Baiye No.1 Tea (*Camellia sinensis*) Flowers Induced S Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis via AKT-MDM2-p53 Signaling Pathway in Ovarian Cancer Cells. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25153515>.
- [57] Wang Y, Ren N, Rankin GO, Li B, Rojanasakul Y, Tu Y, et al. Anti-proliferative effect and cell cycle arrest induced by saponins extracted from tea (*Camellia sinensis*) flower in human ovarian cancer cells. *Journal of Functional Foods* 2017;37. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.001>.
- [58] Guo X, Ding X. Dioscin suppresses the viability of ovarian cancer cells by regulating the VEGFR2

- and PI3K/AKT/MAPK signaling pathways. *Oncology Letters* 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8454>.
- [59] Zheng X, Chen W, Hou H, Li J, Li H, Sun X, et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 induced autophagy to inhibit migration and invasion of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;85. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.072>.
- [60] Zhang X, Samadi AK, Roby KF, Timmermann B, Cohen MS. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in ovarian carcinoma cell lines CaOV3 and SKOV3 by natural withanolide Withaferin A. *Gynecologic Oncology* 2012;124. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.11.044>.
- [61] Alam MN, Yu JQ, Beale P, Huq F. Cisplatin in combination with emetine and patulin showed dose and sequence dependent synergism against ovarian cancer. *Synergy* 2020;10. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2019.100060>.
- [62] Johnson-Ajinwo OR, Richardson A, Li W-W. Palmatine from Unexplored *Rutidea parviflora* Showed Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. *Toxins* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/toxins11040237>.
- [63] Nan X-W, Gong L-H, Chen X, Zhou H-H, Ye P-P, Yang Y, et al. Survivin Promotes Piperlongumine Resistance in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01345>.
- [64] Pal MK, Jaiswar SP, Srivastav AK, Goyal S, Dwivedi A, Verma A, et al. Synergistic effect of piperine and paclitaxel on cell fate via cyt-c, Bax/Bcl-2-caspase-3 pathway in ovarian adenocarcinomas SKOV-3 cells. *European Journal of Pharmacology* 2016;791. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.019>.
- [65] Si L, Yang R, Lin R, Yang S. Piperine functions as a tumor suppressor for human ovarian tumor growth via activation of JNK/p38 MAPK-mediated intrinsic apoptotic pathway. *Bioscience Reports* 2018;38. <https://doi.org/10.1042/BSR20180503>.
- [66] Xu L, Zhang X, Li Y, Lu S, Lu S, Li J, et al. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/ JNK activation. *Tumor Biology* 2016;37. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4737-8>.
- [67] Zhang H, Dong R, Zhang P, Wang Y. Songorine suppresses cell growth and metastasis in epithelial ovarian cancer via the Bcl-2/Bax and GSK3 β / β -catenin signaling pathways. *Oncology Reports* 2019. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7070>.
- [68] Gao J, Zhu H, Wan H, Zou X, Ma X, Gao G. Harmine suppresses the proliferation and migration of human ovarian cancer cells through inhibiting ERK/CREB pathway. *Oncology Reports* 2017;38. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5952>.
- [69] Zhang H, Jiao Y, Shi C, Song X, Chang Y, Ren Y, et al. Berbamine suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer partially via the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2018;50. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy036>.
- [70] Ha JH, Jayaraman M, Radhakrishnan R, Gomathinayagam R, Yan M, Song YS, et al. Differential effects of thymoquinone on lysophosphatidic acid-induced oncogenic pathways in ovarian cancer cells. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2020;10.

<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.04.001>.

- [71] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018;68. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [72] Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H, Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Translational Medicine* 2018;16. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1471-1>.
- [73] Barboza JR, Pereira FAN, Fernandes RA, Vasconcelos CC, Cartágenes M do S de S, Oliveira Lopes AJ, et al. Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *Biology* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/biology9090292>.
- [74] Călinoiu LF, Vodnar DC. Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/nu10111615>.
- [75] Majidinia M, Bishayee A, Yousefi B. Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. *DNA Repair* 2019;82. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102679>.
- [76] Weng Y-P, Hung P-F, Ku W-Y, Chang C-Y, Wu B-H, Wu M-H, et al. The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers. *Oncotarget* 2018;9. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23015>.
- [77] Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/biom10020221>.
- [78] Jiang Z, Fletcher NM, Ali-Fehmi R, Diamond MP, Abu-Soud HM, Munkarah AR, et al. Modulation of redox signaling promotes apoptosis in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* 2011;122. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.04.051>.
- [79] Rajagopal C, Lankadasari MB, Aranjani JM, Harikumar KB. Targeting oncogenic transcription factors by polyphenols: A novel approach for cancer therapy. *Pharmacological Research* 2018;130. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.034>.
- [80] Kleczka A, Kubina R, Dzik R, Jasik K, Stojko J, Cholewa K, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induced Apoptosis in Serous Ovarian Cancer OV7 Cells by Deregulation of BCL2/BAX Genes. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25153514>.
- [81] HE Z, CHEN AY, ROJANASAKUL Y, RANKIN GO, CHEN YC. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 α /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncology Reports* 2016;35. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4354>.
- [82] Abotaleb M, Samuel S, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, et al. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers* 2018;11. <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>.
- [83] DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews* 2012;246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x>.

- [84] Fan Y, Mao R, Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & Cell* 2013;4. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-2084-3>.
- [85] Yang W, Liu L, Li C, Luo N, Chen R, Li L, et al. TRIM52 plays an oncogenic role in ovarian cancer associated with NF- κ B pathway. *Cell Death & Disease* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0881-6>.
- [86] George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2017;45. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.11.007>.
- [87] Chen SS, Michael A, Butler-Manuel SA. Advances in the treatment of ovarian cancer: a potential role of antiinflammatory phytochemicals. *Discovery Medicine* 2012;13.
- [88] Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2020;17. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- [89] Rajabi S, Maresca M, Yumashev AV, Choopani R, Hajimehdipoor H. The Most Competent Plant-Derived Natural Products for Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Biomolecules* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/biom11040534>.
- [90] Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death & Differentiation* 2018;25. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.170>.
- [91] Smolle E, Taucher V, Pichler M, Petru E, Lax S, Haybaeck J. Targeting Signaling Pathways in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14. <https://doi.org/10.3390/ijms14059536>.
- [92] Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes & Development* 2020;34. <https://doi.org/10.1101/gad.334516.119>.
- [93] de Oliveira Júnior RG, Christiane Adrielly AF, da Silva Almeida JRG, Grougnet R, Thiéry V, Picot L. Sensitization of tumor cells to chemotherapy by natural products: A systematic review of preclinical data and molecular mechanisms. *Fitoterapia* 2018;129. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.025>.
- [94] Tholl D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants, 2015. https://doi.org/10.1007/10_2014_295.
- [95] Bergman ME, Davis B, Phillips MA. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules* 2019;24. <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>.
- [96] T. C. Barbosa L, G. Vega MR. Diterpenes from the Genus *Xylopia*. *Revista Virtual de Química* 2017;9. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170099>.
- [97] Al-Alem L, Curry TE. Ovarian cancer: involvement of the matrix metalloproteinases. *REPRODUCTION* 2015;150. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0546>.
- [98] WEIDLE UH, BIRZELE F, KOLLMORGEN G, RUEGER R. Mechanisms and Targets Involved in Dissemination of Ovarian Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics* 2016;13.

<https://doi.org/10.21873/cgp.20004>.

- [99] Lei P, Zhang W, Men X. Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2014;10. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139746>.
- [100] Chudzik M, Korzonek-Szlacheta I, Król W. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules* 2015;20. <https://doi.org/10.3390/molecules20011610>.
- [101] Salazar JR, Loza-Mejía MA, Soto-Cabrera D. Chemistry, Biological Activities and In Silico Bioprospection of Sterols and Triterpenes from Mexican Columnar Cactaceae. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25071649>.
- [102] Lombrea A, Scurtu AD, Avram S, Pavel IZ, Turks M, Lugiņina J, et al. Anticancer potential of betulonic acid derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22073676>.
- [103] Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, Kurzepa J. Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews* 2019;18. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09623-1>.
- [104] Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M, Mehrbod P, Khadem F, Behrouj H, et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnology Advances* 2020;38. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.008>.
- [105] Cornelison R, Llaneza D, Landen C. Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18. <https://doi.org/10.3390/ijms18102171>.
- [106] Vo NNQ, Fukushima EO, Muranaka T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins. *Journal of Natural Medicines* 2017;71. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1026-9>.
- [107] Juang Y-P, Liang P-H. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25214974>.
- [108] Koczurkiewicz P, Kłaś K, Grabowska K, Piska K, Rogowska K, Wójcik-Pszczola K, et al. Saponins as chemosensitizing substances that improve effectiveness and selectivity of anticancer drug—Minireview of in vitro studies. *Phytotherapy Research* 2019;33. <https://doi.org/10.1002/ptr.6371>.
- [109] Sobolewska D, Galanty A, Grabowska K, Makowska-Wąs J, Wróbel-Biedrawa D, Podolak I. Saponins as cytotoxic agents: an update (2010–2018). Part I—steroidal saponins. *Phytochemistry Reviews* 2020;19:139–89. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09661-0>.
- [110] Sethi G, Shanmugam M, Warriar S, Merarchi M, Arfuso F, Kumar A, et al. Pro-Apoptotic and Anti-Cancer Properties of Diosgenin: A Comprehensive and Critical Review. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/nu10050645>.
- [111] CHEN Y, TANG Y-M, YU S-L, HAN Y-W, KOU J-P, LIU B-L, et al. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chinese Journal of Natural Medicines*

2015;13. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30053-4](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30053-4).

- [112] Jia L-Y, Wu X-J, Gao Y, Rankin GO, Pigliacampi A, Bucur H, et al. Inhibitory Effects of Total Triterpenoid Saponins Isolated from the Seeds of the Tea Plant (*Camellia sinensis*) on Human Ovarian Cancer Cells. *Molecules* 2017;22. <https://doi.org/10.3390/molecules22101649>.
- [113] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews* 2018;62. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.002>.
- [114] Nguyen VHL, Hough R, Bernaudo S, Peng C. Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *Journal of Ovarian Research* 2019;12. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0596-z>.
- [115] Zhang H, Sun D, Qiu J, Yao L. SFRP1 inhibited the epithelial ovarian cancer through inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *Acta Biochimica Polonica* 2019. https://doi.org/10.18388/abp.2019_2757.
- [116] Cao P, Zhao S, Sun Z, Jiang N, Shang Y, Wang Y, et al. BRMS1L suppresses ovarian cancer metastasis via inhibition of the β -catenin-wnt pathway. *Experimental Cell Research* 2018;371. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.08.013>.
- [117] Ur Rashid M, Alamzeb M, Ali S, Ullah Z, Shah ZA, Naz I, et al. The chemistry and pharmacology of alkaloids and allied nitrogen compounds from *Artemisia* species: A review. *Phytotherapy Research* 2019;33. <https://doi.org/10.1002/ptr.6466>.
- [118] Adamski Z, Blythe LL, Milella L, Bufo SA. Biological Activities of Alkaloids: From Toxicology to Pharmacology. *Toxins* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/toxins12040210>.
- [119] Peluso I, Yarla NS, Ambra R, Pastore G, Perry G. MAPK signalling pathway in cancers: Olive products as cancer preventive and therapeutic agents. *Seminars in Cancer Biology* 2019;56. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.09.002>.
- [120] Engelke LH, Hamacher A, Proksch P, Kassack MU. Ellagic Acid and Resveratrol Prevent the Development of Cisplatin Resistance in the Epithelial Ovarian Cancer Cell Line A2780. *Journal of Cancer* 2016;7. <https://doi.org/10.7150/jca.13754>.
- [121] WANG M, LIU Z-F, TANG H, CHEN B-A. Application of alkaloids in reversing multidrug resistance in human cancers. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2018;16. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30093-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30093-1).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que os extratos hidroetanólicos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da região da Baixada maranhense (municípios Viana e Pinheiro) apresentaram atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral sobre as linhagens celulares de câncer de ovário (A2780 e ES2) e pulmão (A549 e H460) mostrando baixa toxicidade contra linhagem de células HUVEC não malignas e baixa toxicidade aguda frente ao *Danio rerio*.

Quanto ao perfil químico os extratos hidroetanólicos da geoprópolis de *M. fasciculata* demonstraram a presença de substâncias pertencentes as classes dos flavonoides glicosilados, dos taninos hidrolisáveis, dos triterpenos, das antraquinonas, das saponinas triterpênicas e das catequinas. Estudos *in silico* demonstram que a coralagina (tanino hidrolisável), tifanosideo (flavonol glicosilado), β -amirina, taraxarona e marsformosanona (triterpenos) podem estar associados as atividades anti-inflamatória e antitumoral.

Relata-se pela primeira vez o mecanismo molecular envolvido na ação antitumoral do extrato hidroetanólico da geoprópolis produzida por *M. fasciculata* em células de câncer de ovário (A2780) demonstrando efeito apoptótico mediado por ativação da caspase-3 e clivagem da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP).

Neste trabalho, também obtemos como resultado uma revisão integrativa, onde foi abordada os principais fitoquímicos, os alvos moleculares e como a associação com os fitoquímicos podem contribuir na diminuição da quimiorresistência no tratamento do câncer de ovário. Além disso, essa revisão contribuiu para melhor entendimento das vias de sinalização e mecanismo de ação envolvidos no tratamento de câncer de ovário podendo ser utilizada de subsídio para melhor discussão dos mecanismos envolvidos na geoprópolis de *M. fasciculata* no câncer de ovário.

Portanto, com os resultados encontrados neste estudo que demonstram a bioatividade da geoprópolis de *M. fasciculata*, abre perspectivas futuras para aproveitamento como matéria-prima para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, evidenciando seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOTALEB, M.; SAMUEL, S. M.; VARGHESE, E.; VARGHESE, S.; KUBATKA, P.; LISKOVA, A.; BÜSSELBERG, D. Flavonoids in cancer and apoptosis. **Cancers**. v. 11, n. 1, p.1-39, 2018.
- 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**, v.8, n.1, p.18-24, 2006.
- ABUKHDEIR, A. M.; PARK, B. H. P21 and P27: Roles in carcinogenesis and drug resistance. **Expert Reviews Molecular Medicine**, v.10, p.e19, 2008.
- AGUIAR, N. N. **Avaliação de parâmetros físico-químicos dos méis de *Melipona fasciculata* e de *Apis mellifera* da região do semi-árido maranhense, município de Brejo.** Monografia (Curso de Química) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2007.
- ALBUQUERQUE, P. M. C.; GOSTINSKI, L. F.; REGO, M. M. C; CARREIRA, L. M. M. **Flores e Abelhas: a interação da tiúba (*Melipona fasciculata*, Meliponini) com suas fontes florais na Baixada Maranhense.** Sao Luís: Edufma, 163p. 2013.
- 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. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.
- AL-HATAMLEH, M. A. I.; BOER, J. C.; WILSON, K. L.; PLEBANSKI, M.; ROHIMAH, M.; MUSTAFA, M. Z. Antioxidant-based medicinal properties of stingless bee products: recent progress and future directions **Biomolecules**, v.10, n.1, p.923-951, 2020.
- ALVARENGA, E. C.; CAIRES, A.; LADEIRA, L. O.; GAMERO, E. J. P., ANDRADE, L. M.; PAZ, M. T. L.; LEITE, M. F. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, v.66, n.1, p.43-48, 2014.
- ALVES, R.M.O. Production and Marketing of Pot-Honey. In Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (Eds.) **Pot- Honey: A legacy of stingless bees.** Springer, 2013.
- AMARAL, R. G.; DOS SANTOS, S. A.; ANDRADE, L.N.; SEVERINO, P.; CARVALHO, A. A. Natural products as treatment against cancer: A historical and current vision. **Clinics in Oncology**, v.4, n.1562, p.1-5, 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global Cancer Facts & Figures** 4th Edition. Atlanta: American Cancer Society, 2018.
- 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**, v.4, n.1, p.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**, v.46, n.1, p.61-68, 2016.

AZEVEDO, S. G.; DE MOURA, L.; CURADO, M. P.; GOMES, F.S.; OTERO, U.; REZENDE, L. F. M. The fraction of cancer attributable to ways of life, infections, occupation, and environmental agents in Brazil in 2020. **PLoS One**, v.11, n.2, p. e0148761, 2016.

BAJRAMI, I.; FRANKUM, J. R.; KONDE, A.; MILLER, R. E.; REHMAN, F. L.; BROUGH, R.; CAMPBELL, J.; SIMS, D.; RAFIQ, R.; HOOPER, S.; CHEN, L.; KOZAREWA, I.; ASSIOTIS, I.; FENWICK, K.; NATRAJAN, R.; LORD, C. J.; ASHWORTH, A. Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. **Cancer Research**, v.74, n.1, p.287-297, 2014.

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

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, n.1, p.361-367, 1998.

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, n.1, p.71-85, 2006.

BARREIRO, E. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, supl. 3, p. 1- 6, 2019.

BATISTA, M. C. A. **Perfil farmacológico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* (túba) cultivados em municípios do Cerrado maranhense**. Monografia (Curso de Farmácia) – Universidade Federal do Maranhão, 2008.

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.

BATISTA, M. C. A. **Bioprospecção anti-helmíntica da geoprópolis de *Melipona fasciculata* smith em testes *in vitro* com ovos e larvas de *Haemochus contortus* de pequenos ruminantes**. Tese (Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

BATISTA, M. C. A.; RIBEIRO, M. N. S.; COSTA JUNIOR, L. M. **Formulação**

farmacêutica anti-helmíntica com o extrato seco da geoprópolis. BRPI10201600246. 04/02/2016.

BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; DA SILVA, L. M.; ROMAGNOLI, G. G.; DE OLIVEIRA, D. E.; SFORCIN, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.81, n.1, p.48-55, 2016.

BAYER, V.; AMAYA, B.; BANIEWICZ, D.; CALLAHAN, C.; MARSH, L.; MCCOY, A. S. Cancer immunotherapy: an evidence-based overview and implications for practice. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v.21, n.2, p.13-21, 2017.

BENAOUDIA, M. M. F.; TORRE, L. A.; BRAY, F.; FERLAY, J.; JEMAL, A. Lung cancer incidence in young women vs. young men: A systematic analysis in 40 countries. **Cancer Epidemiology**, v.1, p.142-151, 2020.

BEZERRA, A. L. D.; DE SOUSA, M. N. A.; MEDEIROS, A. C.; LIMA, D. C.; MARACAJÁ, P. B. Pharmacological actions of geopropolis: an integrative review of the literature. **Temas em Saúde**, v.1, n.1, p. 555-570, 2018.

BONAMIGO, T.; CAMPOS, J. F.; ALFREDO, T. M.; BALESTIERI, J. B. P.; CARDOSO, C. A. L.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SOUZA, P.K.; DOS SANTOS, E. L. Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2017, n.1, p.1–12, 2017.

BONSUCCESSO, J. S.; GLOAGUEN, T. V.; NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, C. A. L.; DIAS, F. S. Metals in geopropolis from beehive of *Melipona scutellaris* in urban environments. **Science of the Total Environment**, v.634, n.1, p.687–694, 2018.

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.1359-69, 2010.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, L.A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, v.68, n.1, p.394– 424, 2018.

BRAY, F.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; ZANETTI, R.; FERLAY, J. **Cancer Incidence in Five Continents**, Vol. XI (electronic version). Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2019. Available from: <http://ci5.iarc.fr>, acessado [17 jan, 2020].

CAIRNS, R. A.; MAK, T. W. The current state of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v.16, n.10, p.613-614, 2016.

CAMARGO, J. M. F. Ninhos e biologia de algumas espécies de Meliponídeos (Hymenoptera: Apidae) da região de Porto Velho, Território de Rondônia, Brasil. **Revista de Biologia Tropical**, v.16, n.2, p.207-239, 1970.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 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, 2013. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2020.

CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Stingless bee honey: technical regulation proposal. **Brazilian Journal Food Technology**, v.20, e2016157, 2017.

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**, v.65, n.1, p.374-380, 2014.

CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, H. F.; BONAMIGO, T.; DOMINGUES, N. L. C.; SOUZA, K. P.; DOS SANTOS, E. L. Stingless Bee Propolis: New Insights for Anticancer Drugs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2021, n. 1, p. 1-18, 2021.

CANTANHEDE, D. C.; MASCENA, Z. U.; BEZERRA, J. L.; DUTRA, R. P.; COUTINHO, D. F.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S. Bioatividade de *Artemia salina* em extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.5, n.1, p.1-15, 2007.

CHIU, Y. H.; HSU, S. H.; HSU, H. W.; HUANG, K. C.; LIU, W.; WU, C. Y.; WEI, P. H.; CHEN, J. Y. F.; CHEN, B. H. CHIU, C.C. Human non-small cell lung cancer cells can be sensitized to camptothecin by modulating autophagy. **International Journal of Oncology**, v.53, p.1967-1979, 2018.

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

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

Alternative Medicine, v.2015, p.1-10, 2015.

COSTA, M. C. P.; CÂMARA, A. L.; RIBEIRO, M. N. S.; SANTOS, D. M. S.; BORGES, M. O. DA R.; DUTRA, R. P.; OLIVEIRA, A. R.; MACHADO, J. L.; ARAÚJO, O. C.; MELO W. **Processo de obtenção do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba) para preparação de formulações farmacêuticas de ação analgésica, antiinflamatória e cicatrizante.** BRPI 1102701-0 A2. 15/06/2011.

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 (túba). **Cadernos de Pesquisa**, v.16, n.3, p.31-38, 2009.

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, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.1, p.13-23, 2013.

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

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

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

DE GROOT, P. M.; WU, C. C.; CARTER, B. W.; MUNDEN, R. F. The epidemiology of lung cancer. **Translational Lung Cancer Research**, v.7, n.1, p.220– 233, 2018.

DOS SANTOS, J. R. **Bioprospecção de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA; 2010.

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

DUAILIBE, S. A. C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, v.15, n.5, p.420-423, 2007.

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**. v.18, n.4, p.557-562, 2008.

DUTRA, R. P.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Processo de obtenção, formulação de extratos padronizados, fração e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira de abelha sem ferrão e seu uso como agente leishmanicida**. BRPI1103291-0 A2. 05/07/2011

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**, v.62, n.1, p.2549–2557, 2014.

DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; SILVA, M. C. P.; BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F. J. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, n.3, p.287-293, 2019.

EID, S. Y.; EL-READIN, M. Z.; FATANI, S. H.; ELDIN, E. E. M. N.; WINK, M. Natural products modulate the multifactorial multidrug resistance of cancer. **Pharmacology & Pharmacy**, v.6, p.146-176, 2015.

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

FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; JONG, D. D.; BASTOS, J. K.; SOARES, A. E. E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.2, p.635-640, 2009.

FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. SALHAB, H. A. FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v.5, n.28, p.1-17, 2020.

FERREIRA, D.M. **Comparação das frações polínicas de méis produzidos por abelhas do gênero *Apis mellifera* e *Meliponas* da região Tocantina**. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Maranhão, 2006.

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

FRANCHIN, M.; 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**, v.143, n.1, p.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**, v.2013, n.1, p.1-9, 2013.

FRANÇA, H. H. S.; COSTA, D. O.; CARVALHO, F. R.; NUNES, L. S.; SOUZA, A. F. F.; FREITAS, G. G.; BARRETO, M. C.; CAJAZEIRO, J.; FAKHOURI, S.F. Carcinoma epitelial ovariano: aspectos prognósticos. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.21, p.42-44, 2011.

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

GHANTE, M. H.; JAMKHANDI, P. G. Role of pentacyclic triterpenoids in chemoprevention and anticancer treatment: an overview on targets and underlying mechanisms. **Journal of Pharmacopuncture**, v.22, n.2, p.55-67, 2019.

GHARIBVAND, L.; BEESON, W. L.; SHAVLIK, D.; KNUTSEN, R.; GHAMSARY, M.; SORET, S.; KNUTSEN, S. F. The association between ambient fine particulate matter and incident adenocarcinoma subtype of lung cancer. **Environmental Health**, v.16, n.1, p.71, 2017.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. International Agency on Cancer (IARC). World Health Organization (WHO). (Lyon, France, 2020). Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2020.

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, 1990.

GOSTINSKI, L. F.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; CONTRERA, F. A. L. Effect of honey harvest on the activities of *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 workers. **Journal of Apicultural Research**, v.56, n.4, p.319-327, 2017.

GOTTESMAN, M. M.; LAVI, O.; HALL, M. D.; GILLET, J. P. Toward a better understanding of the complexity of cancer drug resistance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.56, p.85-102, 2016.

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.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n. 5, p.646–674, 2011.

HEITZ, A. E.; BAUMGARTNER, R. N.; BAUMGARTNER, K. B.; BOONE, S.D. Healthy lifestyle impact on breast cancer-specific and all-cause mortality. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.167, n.1, p.171-181, 2018.

HENLEY, S. J.; WARD, E. M.; SCOTT, S. M. A. J.; ANDERSON, R. N.; FIRTH, A. U.; THOMAS, C. C.; ISLAMI, F.; WEIR, H. K.; LEWIS, D. R.; SHERMAN, R. L.; WU, M.; BENARD, V.B.; RICHARDSON, L. C.; JEMAL, A.; CRONIN, K.; KOHLER, B. A. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. **Cancer**. V.126; n.10, p.2225-2249, 2020.

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

JAYSON, G. C.; KOHN, E. C.; KITCHENER, H. C.; LEDERMANN, J. A. Ovarian cancer. **Lancet**, v.384, n.9951, p.1376-1388, 2014.

KASHFI, K. Anti-inflammatory agents as cancer therapeutics. **Advances in Pharmacology**, v.57, n. 1, p.31-89, 2009.

KEHM, R. D., HOPPER, J. L., JOHN, E. M.; PHILLIPS, K. A.; MACINNIS, R. J.; DITE, G. S.; MILNE, R. L.; LIAO, Y.; ZEINOMAR, N.; KNIGHT, J. A.; SOUTHEY, M. C.; VAHDAT, L.; KORNHAUSER, N.; CIGLER, T.; CHUNG, W. K.; GILES, G. G.; MCLACHLAN, S. A.; FRIEDLANDER, M. L.; WEIDEMAN, P. C.; GLENDON, G.; NESCI, S.; ANDRULIS, I. L.; BUYS, S. S.; DALY, M. B.; TERRY, M. B. Regular use of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk for women at familial or genetic risk: a cohort study. **Breast Cancer Research**, v.21, n.52, p.1-13, 2019.

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

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **A abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Acangaú. 144p, 1996.

KUMAR D, RAHMAN H, TYAGI E; LIU, T.; LI, C.; LU, R.; LUM, D.; HOLMEN, S.; MASCHEK, J.A. COX, J.; VANBROCKLIN, M. W.; GROSSMAN, D. Aspirin suppresses PGE₂ and activates AMP kinase to inhibit melanoma cell motility, pigmentation, and selective tumor growth *in vivo*. **Cancer Prevention Research**. v.11, n.10, p.629-642, 2018.

KUSTIAWAN, P. M.; PUTHONG, S.; ARUNG, E. T.; CHANCHAO, C. *In vitro* cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, n.7, p.549–556, 2014.

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

LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B.C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.;

AZEVEDO, M. M. B.; VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; VERMELHO, A. B.; CARNEIRO, C. S.; RODRIGUES, I. A. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, n.2019, p.389-399, 2019.

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.

LEE Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal Pharmacology**, v. 834, n.1, p.188-196, 2018.

LI, F.; WU, T.; XU, Y.; DONG, Q.; XIAO, J.; XU, Y.; LI, Q.; ZHANG, C.; GAO, J.; LIU, L.; HU, X.; HUANG, J.; LI, X.; ZHANG, Y. A comprehensive overview of oncogenic pathways in human cancer. **Briefings in Bioinformatics**, v.21, n.3, p.957-969, 2020.

LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A., DUTRA, R. P.; ARAMYS, S. R.; 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 Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p.1-10, 2011.

LIBERIO, 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, BRPI0905583-5, 2009.

LIMA FILHO, F. V. P. **Zoneamento apibotânico e sobreposição de nicho trófico entre abelhas africanizadas *Apis mellifera* e abelhas indígenas *Melipona fasciculata***. Monografia (Curso de Agronomia) – Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

LIU, B.; QU, L.; YAN, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer Cell International**. v.15, n.106, p.1-13, 2015.

LOPES, M. T. R.; SILVA, J. O.; PEREIRA, F. M.; ARAUJO, R. S.; CAMARGO, R. C. R.; VIEIRA-NETO, J. M.; RIBEIRO, V. Q. Atividade de vôo de abelhas jandaira (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) instaladas em dois modelos de colméia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Meio-Norte, p.20, 2007.

MALUMBRES, M. Control of the cell cycle. **Abeloff's Clinical Oncology**, v.1, p.56-73, 2020.

MASOOD, I.; KIANI, M. H.; AHMAD, M.; MASOOD, M. I.; SADAQUAT, H. Major contributions towards finding a cure for cancer through chemotherapy: a historical review. **Tumori Journal**, v.102, n.1, p.6-17, 2016.

MARTINS, A. C. L.; REGO, 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**, v.41, n.2, p.183–190, 2011.

MATEO, J.; LORD, C. J.; SERRA, V.; TUTT, A.; BALMAÑA, J.; CASTROVIEJO-BERMEJO, M.; CRUZ, C.; OAKNIN, A.; KAYE, S. B.; BONO, J. S. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. **Annals of Oncology**, v.30, n.9, p.1437-1447, 2019.

MATZ, M.; COLEMAN, M. P.; SANT, M.; CHIRLAQUE, M. D.; VISSER, O.; GORE, M.; ALLEMANI, C. The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). **Gynecologic Oncology**, v.144, n.2, p.405-413, 2017.

MCCREERY, M.Q.; BALMAIN, A. Chemical carcinogenesis models of cancer: back to the future. **Annual Review of Cancer Biology**, v.2017, n.1, p.295–312, 2017.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 2007.

MICHENER, C. D. Origin, Biodiversity and behavior of the stingless bees (Meliponini). In Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (Eds.) **Pot- Honey: A legacy of stingless bees**. Springer, 2013.

MITRA, A. K.; AGRAHARI, V.; MANDAL, A.; CHOLKAR, K.; NATARAJAN, C.; SHAH, S.; JOSEPH, M.; TRINH, H. M.; VAISHYA, R.; YANG, X.; HAO, Y.; KHURANA, V.; PAL, D. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. **Journal of Control Release**, v.219, p. 248-268, 2015.

MORAES, D. F. C.; MESQUITA, L. S. S.; AMARAL, F. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; MALIK, S. Anticancer drugs from plants. In: Malik S. (Org.). **Biotechnology and production of anti-cancer compounds**. 1ed.: Springer -Verlag, Germany, v.1, p. 121-142, 2017.

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, p.44-60, 2004.

MUSTAFA, M. A. R.; JAMALULAZIZI, E. L.; IIZAM, A.; NAZIRAH, A. M.; SHARIFA, S. A.; ABBAS, S. Lung Cancer: Risk Factors, Management, and Prognosis. **Journal of Dental and Medical Sciences**, v.15, p.94-101, 2016.

NAINU, F.; MASYITA, A.; BAHAR, M. A.; RAIHAN, M.; PROVA, S. R.; MITRA, S.; EMRAN, T. B.; SIMAL-GANDARA, J. Pharmaceutical prospects of bee products: special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. **Antibiotics**, v.10; n.7, p. 822- 859, 2021.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, n. 3, p.629–661, 2016.

NEWMAN, D. J, CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis. 446p., 1997.

OLIVEIRA, F. F.; RICHERS, B. T. T.; SILVA, J. R.; FARIAS, R. C.; MATOS, T. A. L. Guia Ilustrado das Abelhas "Sem-Ferrão" das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, MCT/IDSM**, 267f, 2013.

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.

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

OLIVEIRA, F. **A arte de manejar abelhas indígenas sem ferrão na região Amazônica**, 2004. Disponível em: <<http://www.projetoiraquara.com.br>>. Acesso em: 19 agosto 2019.

OLIVEIRA, P. P.; SANTOS, V. E. P.; BEZERRIL, M. S.; ANDRADE, F. B.; PAIVA, R. M.; SILVEIRA, E. A. A. Segurança do paciente na administração de quimioterapia antineoplásica e imunoterápicos para tratamento oncológico. **Texto e Contexto – enfermagem**, v.28, p.1-18, 2019.

PAIER, C. R. K.; MARANHÃO, S. S.; CARNEIRO, T. R.; LIMA, L. M.; ROCHA, D. D.; SANTOS, R. D. S.; FARIAS, K. M.; MORAES-FILHO, M. O.; PESSOA, C. Natural products as new antimetabolic compounds for anticancer drug development. **Clinics**, vol.73, supl. 1 São Paulo, 2018.

PATIERNO, S. R. Environmental Factors. **Abeloff's Clinical Oncology**, v.1, p.139-153, 2020.

POPOVA, M; TRUSHEVA, B; BANKOVA, V. Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity **Phytomedicine**. Available online 27 September,153098, 2019.

POVEDA, A.; FLOQUET, A.; LEDERMANN, J. A.; ASHER, R.; PENSON, R. T.; OZA, A. M.; KORACH, J.; HUZARSKI, T.; PIGNATA, S.; FRIEDLANDER, M.; BALDONI, A.; PARK-SIMON, T. W.; TAMURA, K.; SONKE, G. S.; LISYANSKAYA, A.; KIM, J. H.; FILHO, E. A.; MILENKOVA, T.; LOWE, E. S.; ROWE, P.; VERGOTE, I.; PUJADE-LAURINE, E. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of

a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet Oncology**, v.22, n.5, p.620-631, 2021.

REID, B. M.; PERMUTH, J. B.; SELLERS, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer Biology and Medicine**, v.14, n.1, p.9-32, 2017.

REID, M. A.; SANDERSON, S. M.; LOCASALE, J. W. Cancer Metabolism. **Abeloff's Clinical Oncology**, v.1, n.1, p.127-138, 2020.

RÊGO, M. C.; ALBUQUERQUE, P. M. C.; VENTURIERI, G. C. Menos locais para ninhos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.42, p.50-51, 2008.

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. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-5, 2015.

ROCHA, A. O. **Caracterização de extratos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith de biomas maranhenses**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA; 2013.

SAWADOGO, W. R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M. H.; CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. A. Survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2011. **Molecules**, v.18, p.3641-3673, 2013.

SAEED, M. E.; ABDELGADIR, H.; SUGIMOTO, Y.; KHALID, H. E.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p.644-58, 2015.

SANTOS, H. F. D.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, C. M. D.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SOUZA, K. P.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.5, p.1-18, 2017.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. **International Journal of Oncology**, v.54, n.2, p.407-419, 2019.

SFORCIN, J. M. **Própolis e geoprópolis: uma herança das abelhas**. São Paulo: Editora Unesp Digital, 84p., 2017

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; AHMEDIN, A. Cancer Statistics, 2019. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v.69, n.1, p.7-34, 2019.

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

SIQUEIRA, J. S.; MESOCOUTO, C. S. T.; LEMOS, M. S.; PEREIRA-JUNIOR, J. B.; VENTURIERI, G. C.; DANTAS FILHO, H. A. DANTAS, K. G. F Determination of inorganic elements in geopropolis samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry **Journal of Apicultural Research**. v.1, p.1-9, 2020.

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

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A.; ALVES, R. M. O.; DIAS, C. S.; CLARTON, L. **Mundurí (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa**. Série Meliponicultura, Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 46 p. 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**, v.2013, p.1-5, 2013.

SOUZA, S. A.; DIAS, T. L. M. F.; SILVA, T. M. G.; FALCÃO, R. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v.61, n.4, p. 560-565, 2014.

SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. G.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A. SILVA, T. M. S. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**. v.29, n.6, p.549–558, 2018.

SPECIESLINK REDE. **Collaborative databasing of North American bee collections within a global informatics network project (AMNH-Bee)**, Coleção Entomológica Paulo Nogueira-Neto - IB/USP (CEPANN), Fototeca Cristiano Menezes (FCM), Coleção de Hymenoptera INPA (INPA-Hymenoptera), Snow Entomological Museum Collection (KU-SEMC), Coleção Camargo - FFCLRP/USP (RPSP), 2020. Disponível em: <<http://www.splink.cria.org.br>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2020.

SHUH, M.; BOHORQUEZ, H.; LOSS, G. E. J. R; COHEN, A. J. Tumor necrosis factor-alpha: life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury. **Ochsner Journal**, v.13 p.119–30, 2013.

STEWART, C. J. R. STEWART, L. M.; HOLMAN, C. D. J.; JORDAN, S.; SEMMENS, J.; SPILSBURY, K.; THRELFALL, T. Value of pathology review in a population-based series of ovarian tumors. **International Journal of Gynecological Pathology**, v.36, n. 4, p. 377-385, 2017.

SUN, C.Y; ZHANG, Q. Y.; ZHENG, G. J.; FENG, B. Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. **Biomed Pharmacother**, v.110, p. 518-527, 2019.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.;

JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin.**, v.71, n.3, p.209-249, 2021.

TENORIO, E. G.; BARROS, J. R. S.; PACHECO, C. C. M. (org.) **25 anos de pesquisas com abelha tiúba (*Melipona fasciculata*) no Maranhão**. 1ed. São Luís: UEMA, 2012.

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**, v.34, p.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**, v.30, n.2, p.237-240, 2016.

TORRE, L. A.; TRABERT, B.; DESANTIS, C. E.; MILLER, K. D.; RUNOWICZ, C.D.; GAUDET, M. M.; JEMAL, A.; SIEGAL, R. L. Ovarian cancer statistics, 2018. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.68, n.4, p.284–296, 2018.

TRENDOWSK, M. Recent advances in the development of antineoplastic agents derived from natural products. **Drugs**, v.75, p.1993–2016, 2015.

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.; PHUWAPRAIRISAN, 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, p.37, 2011.

VARSHOSAZ, J.; GHASSAMI, E.; NOORBAKHS, A.; JAHANIAN-NAJAFABADI, A.; MINAIYAN, M.; BEHZADI, R. Poly (Butylene Adipate-Co-Butylene Terephthalate) Nanoparticles prepared by electrospraying technique for docetaxel delivery in ovarian cancer induced mice. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.44, n.6, p.1012-1022, 2018.

VELTHUS, 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: MELO, G.A.R.; do SANTOS, I. A. **Apoidea Neotropical: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: UNESC, v.1, p.171-176, 2003.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Braganca - PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v.3, n.2, p.1-7, 2003.

VENTURIERI, G. C., ALVES, D. A., VILLAS-BOAS, J. K., CARVALHO, C. A. L., MENEZES, C., VOLLET-NETO, A., CONTRERA, F. A. L., CORTOPASSILAURINO, M., NOGUEIRA-NETO, P., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Meliponicultura no Brasil:

situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: **Polinizadores no Brasil** - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP, p.213-236, 2012.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão**. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2. ed. Brasil, 2018.

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

WEBB, P. M.; JORDAN, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.41, p.3-14, 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <http://https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acessado em: 20 jan de 2020.

WILEY, K.; LEFEBVRE, K. B.; WALL, L.; BALDWIN-MEDSKER, A.; NGUYEN, K.; MARSH, L.; BANIEWICZ, D. Immunotherapy administration: Oncology Nursing Society recommendations. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v.1, n.21, p.5-7, 2017.

WONG, R. S. Y. Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in cancer prevention and cancer promotion. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**. v.2019, p.1-10., 2019.

ZHAO, L.; YU, M.; SUN, M.; XUE, X.; WANG, T.; CAO, W.; SUN, L. Rapid determination of major compounds in the ethanol extract of geopropolis from Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. **Molecules**, v.22, n. 11, p.1935, 2017.

ANEXOS

SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Pharmacological Research

Molecular mechanisms of action and chemosensitization of tumor cells in ovarian cancer by phytochemicals.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review Article
Keywords:	ovarian cancer; phytochemicals; molecular mechanisms; chemosensitivity; chemoresistance
Corresponding Author:	Josianne da Rocha Barboza, PhD UFMA: Universidade Federal do Maranhao BRAZIL
First Author:	Josianne da Rocha Barboza, PhD
Order of Authors:	Josianne da Rocha Barboza, PhD Francisco Assis Nascimento Pereira, PhD Alberto Jorge Oliveira Lopes, PhD Maria Nilce de Sousa Ribeiro, PhD
Abstract:	Ovarian cancer is the second leading cause of mortality among women with cancer of the genital tract. Currently, platinum-derived drugs and taxanes are the standard treatments for ovarian cancer. However, patients receiving this chemotherapy often develop cumulative toxic effects and are prone to chemotherapy resistance. Therefore, it is necessary to determine treatment options that are more effective and better tolerated by patients. In this context, phytochemicals are chemicals naturally produced in plants in their secondary metabolism with antitumor activity that can represent therapeutic or adjuvant alternatives in the treatment of ovarian cancer. The present review focused on the antitumor effects of the main phytochemicals, including phenolic acids, flavonoids, diterpenes, triterpenes, saponins and alkaloids that are being increasingly investigated as therapeutic options in ovarian cancer. Moreover, the molecular mechanisms involved in inhibition of cell proliferation and metastasis, in induction of apoptosis and increase of the chemosensitivity to platinum and taxanes derivatives with these phytochemicals were presented.
Suggested Reviewers:	Francisco Lima, PhD Full Professor, UESPI: Universidade Estadual do Piaui fdcalima@gmail.com Andreia Melo, PhD Full Researcher, INCA: Instituto Nacional de Cancer andreia.melo@inca.gov.br

COLABORAÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DA TESE.

Trabalhos publicados:

- Use of Stingless Bee Propolis and Geopropolis against Cancer - A Literature Review of Preclinical Studies.
- Câncer de Mama e os Cuidados da Enfermagem.

Capítulo de livro aceito:

- Câncer do Colo do Útero, Vírus (HPV) e a Participação da Enfermagem no Tratamento e Prevenção da Doença.



Review

Use of Stingless Bee Propolis and Geopropolis against Cancer—A Literature Review of Preclinical Studies

Francisco Assis Nascimento Pereira *¹, Josianne Rocha Barboza¹, Cleydlenne Costa Vasconcelos, Alberto Jorge Oliveira Lopes *¹ and Maria Nilce de Sousa Ribeiro *¹

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Campus Bacanga, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís 65080-805, Maranhão, Brazil; josi.anne.r@hotmail.com (J.R.B.); cleydlenne@yahoo.com.br (C.C.V.)

* Correspondence: franciscopho2015@gmail.com (F.A.N.P.); lopesajo@gmail.com (A.J.O.L.); mnsousaribeiro@gmail.com (M.N.d.S.R)

Abstract: Cancer is one of the major maladies affecting humankind and remains one of the leading causes of death worldwide. The investigation of the biological activities of stingless bee products, especially propolis and geopropolis, has revealed promising therapeutic properties, especially in the research on new antineoplastic agents. This literature review of preclinical trials, involving biological assays of antitumor activity and identification of the chemical composition of propolis and geopropolis of stingless bee species, describes the cytotoxicity in tumor lineages (breast, lung, ovarian, liver, mouth, pharynx, larynx, colon, stomach, colorectal, cervix, kidney, prostate, melanoma, human glioblastoma, canine osteosarcoma, erythroleukemia, human chronic myelocytic leukemia, and human promyelocytic leukemia) of propolis and geopropolis of 33 species of stingless bees. The chemical composition of propolis and geopropolis was identified, indicating that these belong to the chemical classes of phenolic acids, flavonoids, coumarins, benzophenones, anthraquinones, alkaloids, terpenes, steroids, saponins, fatty acids, and carbohydrates and are possibly responsible for the cytotoxicity in tumor cells. Apoptosis was one of the main mechanisms of cytotoxicity of extracts and substances isolated from stingless bee products. Although the results found are encouraging, other preclinical studies and clinical trials are essential for the discovery of new anticancer agents.

Keywords: stingless bee products; new anticancer agents; propolis; geopropolis



Citation: Pereira, F.A.N.; Barboza, J.R.; Vasconcelos, C.C.; Lopes, A.J.O.; Ribeiro, M.N.d.S. Use of Stingless Bee Propolis and Geopropolis against Cancer—A Literature Review of Preclinical Studies. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1161. <https://doi.org/10.3390/ph14111161>

Academic Editor: Daniela De Vita

Received: 8 October 2021
Accepted: 11 November 2021
Published: 14 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Stingless bees, also known as meliponines, live in colonies and are characterized by having atrophied stingers [1]. They are social insects of great diversity and wide geographic distribution, occupying almost all of Latin America and Africa, besides southeast Asia and northern Australia [2–4]. There are more than 600 described species, and they are spread across all tropical and subtropical areas of the globe [5]. Among the genera with the largest number of known species are *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona*, *Scaptotrigona*, and *Trigonisca* [6].

Meliponines make great contribution to environmental conservation, as they perform pollination of native plant species and contribute to a reduction in deforestation and environmental damage [4,7]. In addition, they are commercially known for their role in the production of natural products, such as honey, wax, royal jelly, propolis, and geopropolis and accumulation of pollen [3,4,8,9].

Propolis is a mixture of salivary secretions and plant resins collected by bees and is produced to seal the hive and prevent the entry of air and invading insects, besides having antimicrobial activity, protecting the colony from diseases [10,11].

Some meliponin species mix propolis with clay or soil. The result of this mixture is a resinous material more rigid than propolis. Despite the differences in the formation of both products, geopropolis has similar functions to propolis regarding the protection of the hive [12].

CÂNCER DE MAMA E OS CUIDADOS DA ENFERMAGEM

Kelyanne Mota

Nogueira*Luciana

Vieira Pinho* Raquel

Ramos Pinto* Regilane

Silva Leite Alves*

Sarah Karoliny Rocha

Sousa*Josianne Rocha

Barboza**

Rose Daiana Cunha dos Santos**

RESUMO

O aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas no mundo e conseqüentemente no Brasil tem gerado uma série de estudos, inclusive sobre o câncer. Devido ao grande número de casos novos da patologia, é comum nos depararmos com estes pacientes durante a nossa prática clínica. Dentre estes, encontramos o câncer de mama, no Brasil e no mundo, tem aumentado e aparecido cada vez mais cedo na vida da mulher. Este foi o fator relevante para a realização desta pesquisa bibliográfica, sendo os dados coletados por meio de livros, artigos, revistas e sites, com o objetivo de conhecer em profundidade as especificidades do câncer de mama, suas implicações e as considerações de enfermagem. É de extrema importância a valorização do referencial teórico para o aprimoramento de uma assistência mais integral e abrangente, uma vez que este tipo de neoplasia traz consigo uma diversidade de fatores. A revisão demonstrou a importância da equipe de enfermagem na atuação dessa patologia devendo ter com um conhecimento técnico científico suficiente para lidar com o tratamento das mulheres portadoras de câncer de mama.

Palavras-chave: Cuidados da enfermagem. Neoplasia mamária. Câncer de mama.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa, que se apresenta de múltiplas formas clínicas e morfológicas, com diferentes graus de agressividade tumoral e potencial metastático, atingindo frequentemente mulheres após os quarenta anos de idade, embora se tenha observado um fenômeno, em nível mundial, do aumento de sua incidência em faixas etárias mais jovens. (PINHO et al., 2017).

* Graduanda do curso de Enfermagem da Instituição de Ensino Superior Franciscano. Paço do Lumiar, MA.

** Graduada em Farmácia-Bioquímica pela Universidade Federal do Maranhão; Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Maranhão. Doutoranda em biotecnologia – Rede Bionorte/UFMA. E-mail: josi.anne.r@hotmail.com

** Graduada em Enfermagem pelo Centro Universitário do Maranhão; Especialista em Programa de Saúde



Carta de Aceite

Prezados autores:

ADRIANA KARINE OLIVEIRA DE ANDRADE, MARILIA CARLA CUNHA SILVA & JOSIANNE ROCHA BARBOZA, este documento atesta que o capítulo **CÂNCER DO COLO DO ÚTERO, VÍRUS (HPV) E A PARTICIPAÇÃO DA ENFERMAGEM NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA DOENÇA** foi aceito para compor o livro **SAÚDE DA MULHER** e, que o mesmo será publicado em julho de 2021 pela Editora Pasteur, Irati/PR, prefixo editorial 86700.

O livro atende a todos os requisitos solicitados pela CAPES, e.g. corpo editorial, ISBN, índice remissivo e avaliação por pares.

Agradeço suas contribuições para produção desse livro.

Dr. Guilherme Barroso L. de Freitas
Diretor Científico do Instituto de Ensino Pasteur
Editor Chefe da Editora Pasteur



@editorapasteur
www.editorapasteur.com.br



+55 42 999119595
Diretor Científico
Dr. Guilherme Barroso



atendimento@editorapasteur.com.br