



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO



**instituto de**  
**ciências farmacêuticas**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

**CECÍLIA PENA MACÁRIO CONDACK**

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATO ETANÓLICO DE  
PRÓPOLIS ORIGINÁRIAS DE RIO DAS OSTRAS E MACAÉ  
(RJ/BRASIL) PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS  
CARDIOVASCULARES**

**MACAÉ**

**2022**

CECÍLIA PENA MACÁRIO CONDAK

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS  
ORIGINÁRIAS DE RIO DAS OSTRAS E MACAÉ (RJ/BRASIL) PARA O TRATAMENTO  
DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado  
ao Curso de Farmácia, do Centro Multidisciplinar  
UFRJ-Macaé, como requisito para obtenção do título  
de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Louback da Silva

Coorientador(a): Prof. Dr. Juliana Montani Raimundo

MACAÉ

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

C745

Condack, Cecília Pena Macário

Avaliação Farmacológica de extrato etanólico de própolis originárias de Rio das Ostras e Macaé (RJ/Brasil) para o tratamento de doenças cardiovasculares / Cecília Pena Macário Condack - Macaé, 2023.

55 f.

Orientador(a): Leandro Louback da Silva.

Coorientador(a): Juliana Montani Raimundo.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2023.

1. Farmacologia. 2. Produto natural. 3. Própolis. 4. Inflamação.  
. I. Silva, Leandro Louback da, orient. II. Raimundo, Juliana Montani, coorient.  
III.Título.

CDD 615

Cecília Pena Macário Condack

**Avaliação Farmacológica de extrato etanólico de própolis originárias de Rio das Ostras e Macaé (RJ/Brasil) para o tratamento de doenças cardiovasculares**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 13 de janeiro de 2023.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Leandro Louback da Silva (Presidente da Banca)

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/3640859565231717>

Prof. Dr. Thiago Barth

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/2954810429809063>

Doutoranda Stella Schuenck Antunes

UFRJ/Faculdade de Farmácia

<http://lattes.cnpq.br/4732589982048083>

## **Agradecimentos**

Enfim chegou o dia de agradecer. Agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para que, hoje, eu pudesse me tornar farmacêutica. Mas a verdade é que minha gratidão vem desde o meu nascimento. Desde as primeiras palavras. Faladas e escritas. Aquela que me deu a vida foi a mesma que apostou com tudo que tinha (e não tinha) nos meus sonhos. Estudar foi um privilégio que ela me deu, a chance mais sólida que pude agarrar para construir um futuro. A chance mais real de ajudar pessoas, inclusive a ela. Ela é minha mãe. Quem foi meu sustento, mansidão e impulso. Quem me acalmava em semanas de provas com palavras de força e um chá de melissa. Quem trazia um café com bolo para me ajudar a concluir todas as demandas da faculdade e tornava minhas madrugadas melhores. Infelizmente no meio do caminho ela precisou partir. Não poderá ver esse sonho ser concluído. Mas deixou comigo a força que ela sempre teve, a vontade de fazer mais e melhor, o carinho em como tratar o próximo e a resiliência. Resiliência essa que manteve de pé esse sonho que sonhamos juntas por tanto tempo. Te agradeço, mamãe. Te agradeço por tudo! Por hoje ser a luz que entra na minha janela e o pôr do sol mais lindo enquanto escrevo esse texto. Você sempre esteve e permanecerá comigo, eu sinto. Tudo que sou ou serei eu devo a você, meu anjo Marinete.

Obrigada, pai, por me dar o seu melhor. Por ser meu suporte, por fazer esse sonho ser possível. Você, Gilson, é meu exemplo do que é ser trabalhador e ter determinação. Obrigada por me manter segura e apoiar minhas escolhas. Gratidão sem fim a minha irmã Bárbara. Dona do coração mais lindo e generoso que conheço. Ela se tornou meu porto-seguro, aconchego e motivo. Obrigada por me fazer acreditar que tudo seria possível. Por ser aquela dose generosa de coragem quando achei que não fosse ser capaz. Obrigada tia Norma por ter mantido meu lar, pelas orações e pelo amor. Nunca vi uma dedicação tão pura quanto a sua. Obrigada tia Elda, tia Mara, tia Luci e Carol vocês foram meu alicerce em todos os momentos e vibraram com todas as minhas conquistas. Obrigada aos meus amigos por tornarem a jornada mais leve e cheia de boas histórias. Obrigada, Beatriz, por ser minha dupla da faculdade e da vida. Por cada conversa, abraço e momentos vividos. Obrigada por ter segurado e nunca soltado minha mão. Ter você fez toda diferença. Obrigada aos professores incríveis que a UFRJ colocou no meu caminho. Em especial ao meu orientador Leandro Louback que desde o 2º período soube não

apenas me orientar, como também me ouvir, acolher e incentivar. Obrigada por me inspirar a ser uma profissional e ser humano melhor. Você foi luz na minha vida! Gratidão a Nelilma Romeiro, Arídio Mattos, Julianna Montani, Ana Lúcia Shiguihara, Danielle Stapelfeldt e Célia Palmero por terem sido muito mais que bons professores, foram verdadeiros amigos e exemplos de profissionais a seguir.

Com todo meu amor, gratidão a todos vocês.

*“Educação não transforma o mundo. Educação muda  
pessoas. Pessoas transformam o mundo”.*

(Paulo Freire)

## RESUMO

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que contribui para o estresse oxidativo que contribui para a disfunção endotelial em doenças cardiovasculares. A Própolis é um produto das abelhas mediante a coleta de substâncias em plantas, que contém diversos compostos incluindo flavonoides e ácidos aromáticos. Suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante podem estar associadas a inibição da MPO. Este trabalho objetiva avaliar o perfil antioxidante de extratos etanólicos de 4 amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé (RJ/Brasil) e 5 amostras de outros estados brasileiros (brasileiras), medindo sua capacidade sequestrante de espécies radicalares e inibitória da produção de ácido hipocloroso (HOCl) pela MPO. A atividade sequestrante foi avaliada pelo método do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). As amostras e os radicais foram solubilizados em metanol e o remanescente do radical, após 30 minutos de incubação, foi medido pela absorvância em 517 nm. A atividade da MPO foi avaliada pela produção de HOCl pelo método do Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). Amostras, MPO e cloreto foram incubados por 20 minutos em tampão fosfato (0,02 M, pH 7,4) e a reação foi iniciada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A taxa de produção de HOCl foi medida pelo branqueamento da solução em 412 nm. A possível atividade sequestrante de HOCl no meio reacional foi medida substituindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por HOCl. A análise estatística foi realizada empregando o programa *GraphPad Prism 5*. Todas as amostras interagiram com o DPPH•. Dentre as amostras locais, as amostras Rancho e Rosinha as mais potentes ( $p < 0,05$ ) com  $CI_{50}$  de  $15,5 \pm 1,3$  e  $14,5 \pm 1,3$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, quando comparadas com Alexandre e Califórnia com  $CI_{50}$  de  $23 \pm 1,6$  e  $23,1 \pm 1,2$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Com relação às amostras brasileiras a Extra-Verde e Amarela foram mais potentes ( $p < 0,05$ ) com  $CI_{50}$  de  $22,44 \pm 1,5$  e  $35,01 \pm 2,8$  respectivamente, em comparação às amostras Vermelha, Marrom e Verde, que apresentaram  $CI_{50}$  de  $72,72 \pm 5,9$ ,  $128,40 \pm 5,4$  e  $103,60 \pm 12,8$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para inibição da MPO, Califórnia foi mais potente ( $p < 0,05$ ) que Rancho, com valores de  $CI_{50}$  de  $15,5 \pm 2$  e  $32,1 \pm 4,5$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Alexandre e Rosinha apresentaram potências intermediárias com  $CI_{50}$  de  $24,5 \pm 3,3$  e  $26,2 \pm 4,1$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A análise das amostras brasileiras, mostrou a Vermelha foi mais potente ( $p < 0,05$ ), com  $CI_{50}$  de  $16,20 \pm 1,95$   $\mu\text{g/mL}$ , enquanto as amostras Extra-Verde, Amarela e Marrom apresentaram de  $CI_{50}$   $54,07 \pm 5,07$ ,  $52,34 \pm 5,00$  e  $57,35 \pm 9,78$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Por outro lado, a Verde apresentou maior valor de  $CI_{50}$  de  $106,2 \pm 13,80$   $\mu\text{g/mL}$ , sendo a menos potente ( $p < 0,05$ ) delas. Não houve sequestro de HOCl no meio reacional empregado para nenhuma das amostras. As diferenças no perfil de atividade biológica das amostras locais de própolis indicam que apesar da origem em regiões próximas, a composição ou a concentração dos seus componentes podem variar significativamente. Em geral, pode-se concluir que a própolis pode ser fonte de derivados antioxidantes e inibidores da MPO da produção de HOCl pela MPO, permitindo assim maiores estudos das própolis em possíveis intervenções terapêuticas nas doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Própolis, Mieloperoxidase, Estresse Oxidativo, Inflamação, Doenças Cardiovasculares.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cascatas de formação de espécies reativas de oxigênio .....	14
<b>Figura 2.</b> Ciclo Catalítico da MPO .....	17
<b>Figura 3.</b> Localização das Colmeias .....	26
<b>Figura 4.</b> Estrutura do DPPH antes e depois da reação com um antioxidante .....	28
<b>Figura 5.</b> Fundamento do ensaio de avaliação da inibição da MPO pelos extratos de própolis por meio da oxidação do TNB à DTNB por HOCl. ....	29
<b>Figura 6.</b> Gráfico da curva concentração-resposta da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis de Rio das Ostras/Macaé pelo método do DPPH.....	31
<b>Figura 7.</b> Gráfico da curva concentração-resposta da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis brasileiras pelo método do DPPH.....	32
<b>Figura 8.</b> Gráfico da curva concentração resposta dos extratos de própolis de Rio das Ostras quanto atividade inibitória da MPO sobre o ciclo cloração .....	36
<b>Figura 9.</b> Gráfico da curva concentração resposta dos extratos de própolis brasileiras quanto atividade inibitória da MPO sobre o ciclo cloração .....	37
<b>Figura 10.</b> Dendrograma de similaridade entre os extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras em comparação aos extratos brasileiras.....	41
<b>Figura 11.</b> Gráfico de comparação dos valores de $CI_{50}$ em relação as atividades de sequestro de DPPH e inibição da MPO das amostras de Rio das Ostras e brasileiras.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Região de coleta das amostras de própolis brasileiras e o nome dos seus respectivos extratos.....	26
<b>Tabela 2.</b> $Cl_{50}$ dos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé em brasileiras em eliminar os radicais DPPH .....	33
<b>Tabela 3.</b> $Cl_{50}$ dos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras em inibir a atividade clorinante da MPO .....	38
<b>Tabela 4.</b> Atividade de sequestro de HOCl pelos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras .....	40

## LISTA DE SIGLAS e ABREVIATURAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
BHT	Hidroxiltolueno butilado
DDAH 1	Dimetilaminohidrolase 1
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
DTNB	Ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase
EPO	Eosinófilo peroxidase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hmox1	Heme oxigenase-1
ICAM 1	Molécula de adesão intercelular 1
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPO	Lactoperoxidase
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz extracelular
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NQO1	Quinona oxidoreductase-1
PKC	Proteína quinase C
SOD	Superóxido dismutase

TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPO	Peroxidase tireoidiana
VCAM 1	Molécula de adesão vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Disfunção Endotelial .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Mieloperoxidase.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Ciclo catalítico da mieloperoxidase.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. MPO e a Disfunção Endotelial .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5. Constituintes da própolis como potenciais inibidores da MPO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Obtenção das amostras de própolis.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Obtenção da MPO.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4. Ensaio de inibição da MPO sobre o ciclo halogenação pelas própolis</b>	<b>28</b>
<b>4.5. Avaliação do sequestro de HOCl pelos extratos de própolis.....</b>	<b>29</b>
<b>4.6. Análise cromatográfica dos extratos - CLAE-DAD .....</b>	<b>29</b>
<b>4.7. Análise Estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1. Avaliação da atividade antioxidante – Sequestro do radical DPPH.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2. Avaliação da inibição da MPO e sequestro de HOCl.....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Disfunção endotelial

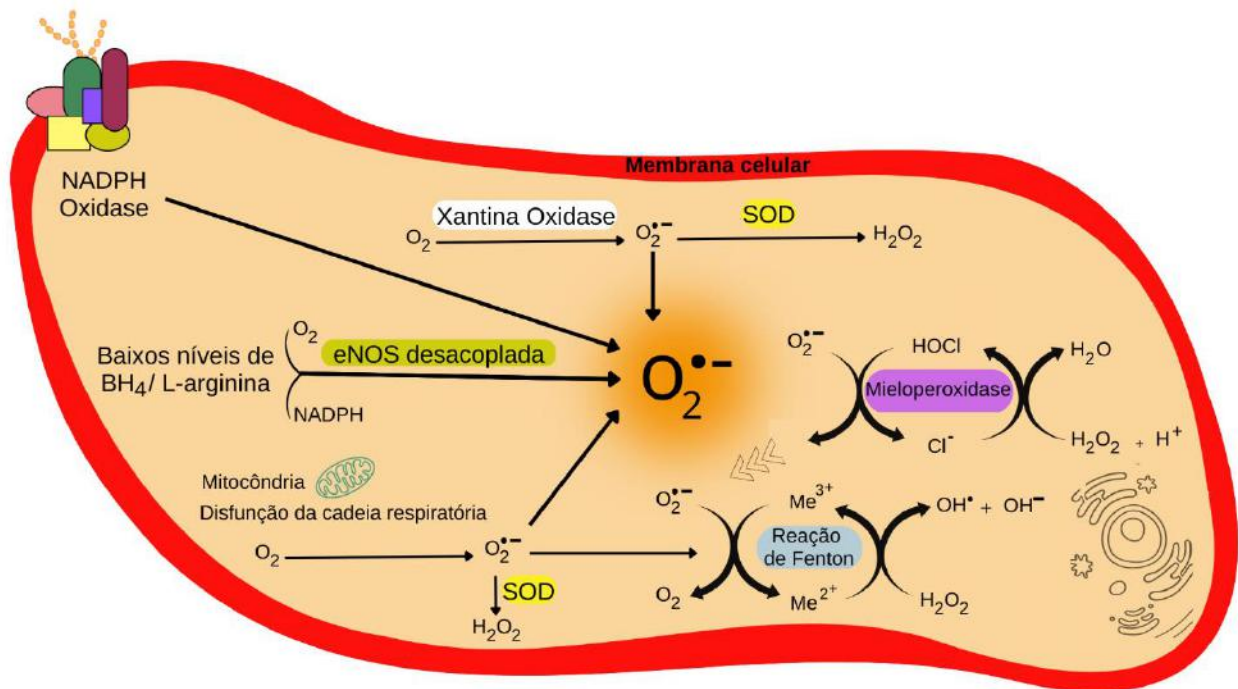
O endotélio vascular é composto por uma única camada de células especializadas (células endoteliais), que formam a interface entre a parede do vaso e o fluxo sanguíneo. O endotélio funcional atua como um regulador chave da homeostase cardiovascular, desempenhando papel de barreira anti-inflamatória e antitrombótica, com permeabilidade seletiva a passagem de células imunes circulantes, macromoléculas, nutrientes e solutos (GODO e SHIMOKAWA, 2017).

Para que mantenha essas propriedades vasoprotetoras, o endotélio promove a transdução ativa de sinais das alterações circulatórias que levam a mudanças no fenótipo da parede do vaso (VITA e KEANEY JR, 2002). Fundamental para isso está a regulação da síntese e das ações de sinalização do óxido nítrico (NO), produzido pela isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS). O NO é um gás com importantes propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias e antioxidantes que desempenha função central na homeostase vascular (CYR et al., 2020).

A redução da biodisponibilidade de NO está diretamente ligada ao processo de disfunção endotelial e ao desenvolvimento e progressão de diversos distúrbios cardiovasculares. A disfunção endotelial é caracterizada por um desequilíbrio do funcionamento homeostático com prejuízo na vasodilatação e por um perfil pró-inflamatório, pró-trombótico e de elevada permeabilidade dos vasos sanguíneos (GIMBRONE JR e GARCÍA-CARDEÑA, 2016).

O estresse oxidativo, por sua vez, é considerado causa de forte relevância para a disfunção endotelial. Durante o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, as artérias inflamadas produzem altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Estas EROs são produzidas por células endoteliais e musculares lisas vasculares envolvendo sistemas enzimáticos endógenos como a xantina oxidase, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, fontes mitocondriais e a eNOS (HARRISON et al., 2003). Porém, os eventos oxidativos que envolvem a disfunção endotelial na doença cardiovascular são complexos, com crescentes evidências na literatura indicando um papel significativo da

enzima mieloperoxidase (MPO) nesse processo (Figura 1) (ZHANG et al., 2001; GOLDMANN et al., 2009).



**Figura 1:** Cascatas de formação de espécies reativas de oxigênio. Enzimas capazes de reduzir o oxigênio molecular para formar  $O_2^{\bullet-}$  são mostrados. A superóxido dismutase, por sua vez, pode atuar como precursora para a formação de outras espécies reativas de oxigênio. Abreviaturas:  $BH_4$ = tetrahydrobiopterina, Me= Metal de transição, SOD= superóxido dismutase, eNOS= óxido nítrico sintase, NADPH= Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato. Imagem produzida pela própria autora.

## 1.2. Mieloperoxidase

A MPO é um membro da superfamília de enzimas hemeperoxidase da qual também fazem parte a eosinófilo peroxidase (EPO), vascular peroxidase (VPO), lactoperoxidase (LPO) e peroxidase tireoidiana (TPO). Em mamíferos, estas enzimas estão presentes em vários órgãos, tecidos, células e estruturas intracelulares onde desempenham suas funções catalíticas (CHENG et al., 2008; DAVIES et al., 2008)

A LPO e EPO são responsáveis pela geração de oxidantes bactericidas em fluidos secretores, oxidando íons brometo e cloreto. A VPO oxida esses mesmos haletos, mas é expressa majoritariamente nos tecidos cardiovasculares. A TPO, por sua vez, oxida íons iodo para a síntese de hormônios tireoidianos e a MPO atua no sistema imunológico inato com a produção de diversos oxidantes, como HOSCN, HOCl, HIO e HOBr (LOUGHRAN et al., 2008; PENG et al., 2018).

A MPO apresenta uma massa de 146 kDa, formada por dois monômeros idênticos e independentes, os quais são ligados por uma única ligação dissulfeto no resíduo de cisteína (Cis-153). Cada monômero apresenta um grupamento heme em seu sítio catalítico e 2 cadeias polipeptídicas, sendo uma pesada e glicosilada formada por 467 resíduos de aminoácidos com massa de 58,5 kDa e outra cadeia leve com 106 resíduos de aminoácidos e uma massa de 14,5 kDa (FIEDLER et al., 2000). A superfície da molécula da MPO contém uma série de resíduos de lisina e arginina que tornam essa enzima uma molécula altamente catiônica. Logo, sua estrutura permite a interação eletrostática com diversos compostos e células que têm uma superfície aniônica, como células bacterianas, células endoteliais, componentes da matriz extracelular (glicosaminoglicanos), apolipoproteína B-100 e entre outros (BALLIEUX et al., 1994; MIYASAKI et al., 1987; REES et al., 2010; CARR et al., 2000).

A MPO é armazenada majoritariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e, em menor proporção, também pode ser encontrada em lisossomos de monócitos circulantes e em macrófagos teciduais. Ela é liberada no fagossomo, juntamente com outros agentes antimicrobianos após a fagocitose de patógenos. Entretanto, enquanto a maioria da MPO permanece no fagossomo, até 30% da MPO celular total pode ser liberado como enzima ativa no espaço extracelular via degranulação ou por associação com armadilhas extracelulares de neutrófilos (PARKER et al., 2012). Essa liberação extracelular está associada a progressão de eventos inflamatórios, conforme observado em distúrbios cardiovasculares (KAYA et al., 2012). A ativação e consequente secreção da MPO pode ser estimulada por uma série de componentes inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (KLINKE et al., 2011), lipopolissacarídeos (LPS) (EISERICH et al., 2002), bradicinina (RICCIARDOLO et al., 2012) e angiotensina II (RUDOLPH et al., 2010).

Além disso, com a liberação de citocinas inflamatórias ocorre também um aumento na expressão de moléculas de adesão vascular e celular, por exemplo da molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Esse processo, em conjunto, contribui para a migração e deposição de neutrófilos e macrófagos sobre o endotélio e sua subsequente internalização no espaço subendotelial das artérias (WANG et al., 2006; HEWING et al., 2014). No caso dos macrófagos, essa



migração contribui para a formação de placa de ateroma, mediante formação de células espumosas carregadas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (WANG, Z. et al., 2007). Enquanto a migração de neutrófilos e a consequente ação da MPO contribui para a instabilidade dessa placa e para o aumento da vasoconstrição. Após a degranulação dos neutrófilos no local de inflamação, a MPO, que não é nativa nos vasos, catalisa uma série de reações oxidativas capazes de prejudicar a biodisponibilidade do NO e a função da barreira endotelial, promovendo a expressão de um fenótipo inflamatório e trombótico do endotélio (MAIOCCHI et al., 2021).

### **1.3. Ciclo catalítico da mieloperoxidase**

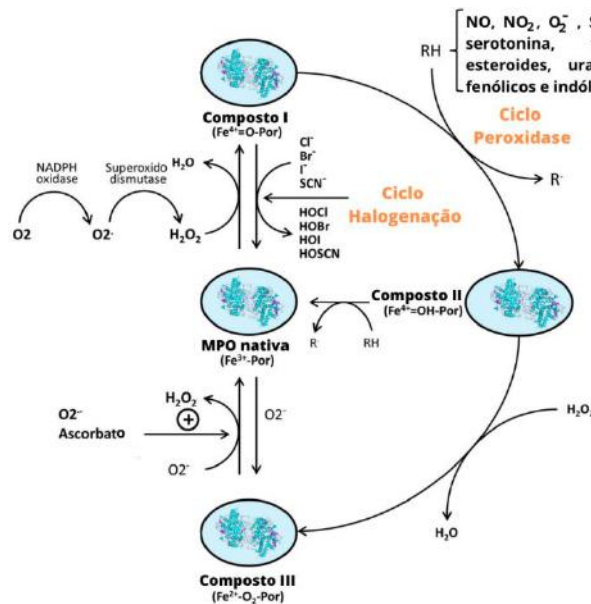
A MPO na presença de  $H_2O_2$  catalisa diferentes reações oxidativas envolvendo um ou dois elétrons formando espécies intermediárias de ferro heme redox no sítio catalítico da enzima. O ciclo catalítico da enzima é iniciado com a oxidação de 2 elétrons de  $Fe^{3+}$ -MPO (composto nativo) formando o composto I ( $^{*}Por-Fe[IV]=O$ ) e  $H_2O$ . Esta etapa ocorre na presença de  $H_2O_2$  que atua como um acceptor de elétrons (MAIOCCHI et al., 2021; FURTMÜLLER et al., 2006).

O principal sistema enzimático fornecedor de  $H_2O_2$  para esse processo é a NADPH oxidase. Após a ativação dos neutrófilos, o complexo NADPH oxidase é recrutado para a superfície interna da membrana celular e esse sistema ativado produz o  $O_2^{\cdot-}$ , que é transformado espontaneamente ou pela ação da SOD em  $H_2O_2$  (FURTMÜLLER et al., 2006; TENG et al., 2017).

O composto I pode ser convertido em enzima nativa novamente por meio da redução de 2 elétrons por haletos ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) ou pseudohaletos ( $SCN^-$ ) resultando na formação dos seus respectivos ácidos (HOCl, HOBr, HOI ou HOSCN) e na restauração da enzima nativa no estado férrico. Esta série de reações é chamada de ciclo halogenação. O ácido hipocloroso (HOCl) é o produto mais abundante e importante da reação envolvendo a MPO devido às concentrações substancialmente mais altas de  $Cl^-$  no plasma humano em comparação aos outros haletos. Sendo assim, considerado um dos principais responsáveis pela forte indução de estresse oxidativo pela MPO (FURTMÜLLER et al., 2006).

Alternativamente, o composto I pode realizar o chamado ciclo peroxidase. Nesse ciclo, a enzima pode usar outros doadores de elétrons, como compostos orgânicos (tirosina, triptofano, serotonina, triptamina, ascorbato, hormônios esteroidais, derivados fenólicos, indólicos, sulfidrilas e urato) ou moléculas inorgânicas, como NO, NO<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O ciclo peroxidase envolve a oxidação por transferência de 1 elétron de algum dos compostos citados acima, resultando na formação do composto II [Por-Fe(IV)-OH]. O composto II pode sofrer redução de 1 elétron para restaurar a enzima nativa, um processo conhecido por ser a etapa limitante do ciclo peroxidase, que é facilitada por redutores como o ânion superóxido e o ascorbato (abundante em neutrófilos). Essas espécies radicalares produzidas no ciclo peroxidase podem formar dímero ou derivados poliméricos, assim como reagir com diversos componentes celulares, incluindo proteínas e lipídios (TENGG et al., 2017).

Outra forma redox da MPO é o composto III (Por-Fe<sup>2+</sup>-O<sub>2</sub>), cuja formação ocorre a partir da reação da MPO nativa com O<sub>2</sub><sup>-</sup>, pela redução de 1 elétron do composto I seguida de reação com oxigênio molecular ou pela reação do composto II com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O composto III é instável e, portanto, é rapidamente convertido na forma nativa da MPO em um processo auxiliado pelo ascorbato ou O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Na figura 2 temos a representação do ciclo catalítico da MPO (MARQUEZ e DUNFORD, 1990).



**Figura 2:** Ciclo catalítico da MPO. O MPO nativo reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar o Composto I. O Composto I pode ser convertido novamente em MPO nativa pelo ciclo de halogenação ou pela redução de um elétron em duas etapas no ciclo da peroxidase. O Composto III é uma forma redox de MPO que ocorre fora dos dois ciclos catalíticos. Adaptado de NDREPEPA, 2019.

#### 1.4. MPO e a disfunção endotelial

A disfunção endotelial induzida por MPO é considerada um dos mecanismos mais relevantes que associam inflamação, estresse oxidativo e doenças cardiovasculares. O estresse oxidativo ocorre quando o processo pró-oxidativo supera a capacidade dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, com consequente aumento na formação das EROs (GILES et al., 2012). O HOCl, por sua vez, é o principal agente responsável por uma série de ações deletérias para manutenção da homeostase cardiovascular (CHENG et al., 2019).

O HOCl é um forte oxidante biológico produzido pelo ciclo halogenação da MPO, sendo capaz de reagir rapidamente com uma série de biomoléculas (WINTERBOURN, 2008). O HOCl atua de diferentes formas promovendo a disfunção endotelial, dentre elas: comprometendo a síntese e biodisponibilidade de NO, prejudicando a integridade da barreira formada pelo endotélio, oxidando diretamente macromoléculas como lipídios, carboidratos e proteínas do glicocálice e da matriz extracelular (MEC) subendotelial, ativando eventos que conduzem a sinalização de processos inflamatórios e trombóticos e por fim causando a perda de viabilidade das células endoteliais (MAIOCCHI et al., 2021)

O HOCl diminui a biodisponibilidade do NO e compromete a função do endotélio por meio de diversos mecanismos. O HOCl age oxidando o substrato da eNOS, a L-arginina, formando adutos clorados do aminoácido que atuam como eficazes inibidores da eNOS competindo com seu substrato, o aminoácido inalterado (ZHANG et al., 2001). Além disso, ao oxidar e inativar a dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1 (DDAH 1), o HOCl eleva os níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), conhecida por ser um inibidor endógeno da eNOS (VON LEITNER et al., 2011).

Outra forma em que o HOCl prejudica a produção de NO ocorre por meio de uma série de reações redox, incluindo a ativação inicial da proteína quinase C (PKC) catalisada por NADPH oxidase, gerando  $O_2^{\cdot-}$  capaz de reagir com o NO formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Esse produto formado oxida o grupamento zinco-tetratiolato da eNOS desestabilizando o homodímero de sua estrutura e assim causando o desacoplamento da enzima (ZOU et al., 2002). Ainda, após se ligar ao sistema plasmático caliceína-cinina em células endoteliais, a MPO pode inativá-lo mediante sua oxidação, levando à diminuição da produção de bradicinina, que age como ativador da eNOS

(ASTERN et al., 2007). Além disso, o HOCl compromete a vasodilatação endotelial ao oxidar o grupo heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), tornando essa enzima refratária à ativação pelo NO (CHENG et al., 2019).

De maneira indireta, o HOCl também pode influenciar na biodisponibilidade do NO. Ele pode agir oxidando e degradando componentes do glicocálice, os quais possuem importante função como sensor mecânico na manutenção da homeostase, ao promoverem a ativação da eNOS e assim controlar os níveis de NO em resposta à tensão de cisalhamento (TARBELL et al., 2014; VAN GOLEN et al., 2012). O HOCl pode também oxidar carboidratos, causando a liberação de fragmentos de polissacarídeos de proteoglicanos do glicocálice luminal e da MEC subendotelial (VAN GOLEN et al., 2012; WOODS e DAVIES., 2003). O prejuízo na função da barreira endotelial também pode ocorrer mediante a oxidação de outros componentes da MEC, como a fibronectina, comprometendo a adesão e a funcionalidade das células do endotélio vascular (VISSERS e THOMAS, 1997).

O HOCl, assim como o HOSCN, pode oxidar proteínas com resíduos de cisteína e tióis de baixo peso molecular, como a glutathiona (GSH), no interior de células endoteliais (BOZONET et al., 2010; STACEY et al., 2012;). Isso pode levar ao estresse oxidativo intracelular, promovendo alteração na sinalização redox e, conseqüentemente, à perda de viabilidade endotelial (LLOYD et al., 2013). Esses ácidos podem interferir na sinalização redox ao promoverem a expressão endotelial do fator tecidual, moléculas de adesão leucocitária (VCAM-1, ICAM-1) ou a expressão do receptor de endotelina tipo B, que apresenta função na vasoconstrição mediada por endotelina (SUGIYAMA et al., 2004; LAU et al., 2014; WANG et al., 2006).

Outro mecanismo de ação do HOCl inclui transformar aminoácidos em cloramínicas reativas (MIDWINTER et al., 2004). Elas modificam componentes proteicos e lipídicos de macromoléculas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (ABDO et al., 2017), lipoproteína de alta densidade (HDL) (ROSSMANN et al., 2011), albumina (MARSCHE et al., 2007) e lipídios celulares (ÜLLEN et al., 2015), formando produtos secundários modificados capazes de alterar a função endotelial.

A oxidação do HDL mediada pela MPO, por exemplo, além de eliminar a capacidade das lipoproteínas de estabelecer o transporte reverso de colesterol, também

compromete as ações vasoprotetoras do HDL em relação ao endotélio. Essas ações incluem ativar a eNOS e promover o crescimento de células endoteliais (YUHANNA et al., 2001; CHEN et al., 2018). Nesse sentido, modificações nessa molécula causada por sua oxidação favorece a vasoconstrição além de tornar o HDL disfuncional e pró-inflamatório. O HDL oxidado prejudica a atividade da eNOS, levando a alterações que comprometem a localização intracelular da enzima (MARSCHE et al., 2004), ativando o fator nuclear kappa B (NF-κB) e a expressão de moléculas de adesão leucocitária em células endoteliais arteriais (UNDURTI et al., 2009).

Essas ações revelam que o HOCl influencia a função endotelial mediante diversos mecanismos oxidativos diretos e indiretos. Sendo assim, manter as concentrações de HOCl baixas, seja inibindo o ciclo cloração da MPO ou por sequestro desse produto, é uma estratégia terapêutica fundamental para preservar a biodisponibilidade e a função do NO endotelial durante a doença cardiovascular.

### **1.5. Constituintes da própolis como potenciais inibidores da MPO**

A própolis é um produto resinoso resultante de compostos coletados pelas abelhas (*Apis mellifera*) partir de brotos e exsudatos de plantas regionais, misturada a cera, pólen, secreções salivares e enzimas das abelhas. A própolis também é conhecida como cola de abelha, sendo utilizada por elas para construir suas colmeias, reparar buracos, rachaduras e proteger contra o ataque de insetos e microrganismos (SFORCIN, 2016).

Trata-se de uma substância complexa, resinosa, com características gomosas e balsâmicas, que apresenta textura, consistência e coloração diversas a depender da sua composição (GHISALBERTI, 1979). A cor da própolis sofre forte influência da sua procedência, podendo ser encontrada em tonalidades que variam do marrom, verde ao vermelho. Amostras de procedências diferentes podem também apresentar odores característicos. O ponto de fusão das própolis se encontra entre 60°C e 70°C, podendo chegar a 100 °C. Geralmente é um material duro a 15°C, tornando-se maleável a partir de 30°C (MARCUCCI et al., 1996; PINTO, 2011).

Solventes como éter, etanol, acetona, tolueno e tricloroetileno permitem a dissolução de diversos compostos da própolis. Entretanto, o etanol tem sido o solvente mais amplamente utilizado para a obtenção de extratos de própolis de baixa

concentração de cera, os quais são ricos nos principais compostos biologicamente ativos (PIETTA et al., 2002). O método de extração da própolis pode ocorrer de várias formas, dentre elas por maceração tradicional, extração por ultrassom ou extração assistida por micro-ondas, os quais apresentam diferentes rendimentos (TRUSHEVA et al., 2007).

A composição química da própolis é complexa e variada, estando intrinsecamente relacionada a fatores como a flora da região onde a abelha realiza a coleta do material resinoso e ao período em que esse processo ocorre. As própolis brasileiras já foram classificadas em até 13 tipos (PARK et al., 2000). De acordo com Sociedade Brasileira de Apiterapia, a própolis brasileira mais comum é a própolis verde, originada do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), além dessa também temos a própolis de copaíba, com origem botânica da *Copaifera langsdorffii* que apresenta uma coloração marrom escura. E ainda, a própolis vermelha, encontrada no litoral da Paraíba, originada do marmeleiro da praia (*Dalbergia ecastophyllum*), que tem despertado interesse de pesquisa em virtude de suas atividades biológicas, como por exemplo sobre células tumorais (PINTO, 2011).

A própolis em seu estado bruto é formada em sua maioria por 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e outras substâncias (BURDOCK, 1998). Dentre os principais compostos orgânicos identificados na própolis temos os flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenoides e fenilpropanoides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e ácidos graxos (HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005; OZKUL et al., 2004; MATSUDA et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2003). Além desses, também podemos encontrar compostos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI et al., 1996).

Apesar do uso popular da própolis, ela não é tida como um agente terapêutico na medicina convencional, uma vez que ainda não existe uma padronização adequada da composição química e da atividade biológica. Desse modo, a caracterização de diferentes tipos de própolis e sua comparação com a origem vegetal e perfil químico se faz necessária. A obtenção dessas informações permite associação a uma possível atividade e mecanismo de ação de novas própolis, contribuindo para a descoberta e o

desenvolvimento de novos fármacos (SILVA-CARVALHO et al., 2015). Logo, a padronização das amostras de própolis é um importante parâmetro no controle de qualidade deste produto, sendo essencial quando se visa uma aplicação terapêutica, podendo torná-la mais efetiva (BANKOVA, 2005).

Atualmente, a própolis vem sendo aplicada em diversas áreas como na medicina, farmácia, cosmetologia e indústria alimentícia. É encontrada associada a suplementos alimentares, preparações para cicatrização de feridas e sintomas de resfriado. As diferentes aplicações da própolis são resultantes de sua ampla atividade biológica associada à diversidade química. Foi demonstrado que a própolis apresenta atividades antibacteriana, imunomoduladora, antiviral, antifúngica e anticancerígena na forma de extrato ou a partir de compostos dela isolados (BHARGAVA et al., 2021). Além dessas, também foi observado ações antioxidante e anti-inflamatória, as quais demonstraram estar associadas a inibição de enzimas, dentre elas a MPO (BOUFADI et al., 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

Importantes propriedades farmacológicas como atividades antioxidante e anti-inflamatória já foram demonstradas para amostras de própolis de diferentes regiões geográficas. Woźniak e colaboradores (2020) avaliaram o potencial antioxidante de extratos etanólicos de própolis chilenas a partir da atividade de eliminação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•). Na concentração de 0,1 mg/mL os extratos etanólicos apresentaram  $29,38 \pm 4,06$  % de atividade antirradicalar frente ao DPPH•, representando 73,05 % da atividade determinada para o padrão Trolox e mais de 90% para o hidroxiltolueno butilado (BHT) também utilizado como padrão. Já no estudo realizado por Boufadi e colaboradores (2014) extratos etanólicos de própolis, coletadas em diferentes regiões da Argélia demonstraram atividade inibitória sobre o ciclo clorinante da MPO. Em uma concentração de 20 µg/mL de extrato de própolis, a amostra mais potente apresentou uma  $CI_{50}$  de  $6,9 \pm 0.2$  µg/mL.

Mediante esses resultados, nosso estudo utilizou 4 amostras de própolis originárias do município de Rio das Ostras (RJ/Brasil) e 5 amostras de própolis brasileiras concedidas pelo grupo de pesquisa liderado pelo Professor Doutor Francisco Martins Teixeira, para quem fossem avaliadas quanto ao seu potencial farmacológico como novos inibidores de MPO.

Nesse sentido, este trabalho se justifica tendo em vista o envolvimento da MPO na progressão e desenvolvimento de distúrbios inflamatórios, incluindo doenças cardiovasculares. Isso resulta em um crescente interesse dos pesquisadores por novos compostos potentes em inibir a MPO. Logo, tendo em vista ausência de estudos farmacológicos sobre própolis coletadas em Rio das Ostras e Macaé (RJ) e que a composição química da própolis de diferentes regiões geográficas é variável, podendo influenciar diretamente nas atividades biológicas, o estudo de amostras regionais frente às amostras brasileiras pode trazer resultados interessantes quanto ao perfil farmacológico desse produto.



### **3. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil antioxidante de extratos etanólicos de 4 variedades de própolis obtidas de apiários localizados no município de Rio das Ostras e Macaé (RJ/Brasil) e compará-las com amostras brasileiras, medindo a capacidade dos extratos em sequestrar espécies radicalares oxidantes e de inibir a produção de HOCl pela MPO

#### **Objetivos específicos**

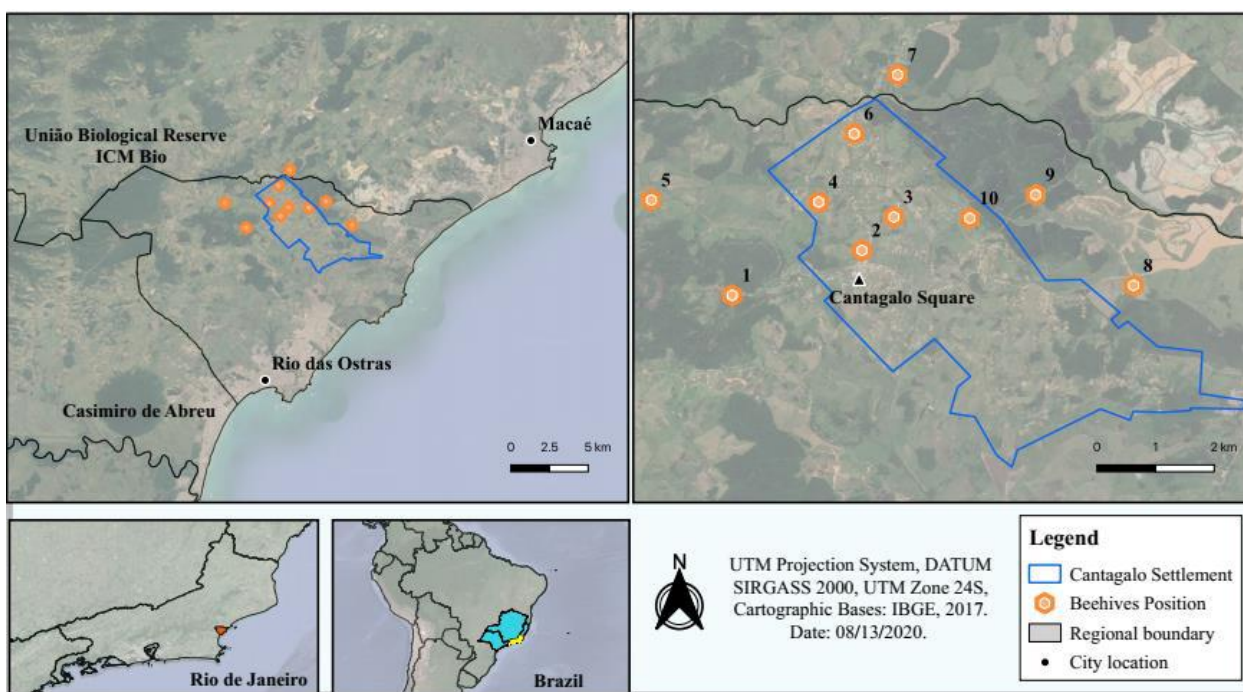
1. Triagem farmacológica dos extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras quanto a atividade de sequestro do radical DPPH.
2. Determinação da potência dos extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras em sequestrar o radical DPPH.
3. Triagem farmacológica dos extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras quanto a capacidade de inibir a produção de HOCl pela MPO;
4. Determinação da potência dos extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras em inibir a produção de HOCL pela MPO.
5. Avaliação dos extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras quanto a capacidade de sequestro de HOCl.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Obtenção das amostras de própolis**

Dois tipos de amostras de própolis foram avaliados no presente trabalho: própolis originárias do município de Rio das Ostras e Macaé (RJ/Brasil) e própolis brasileiras. Ambas foram obtidas a partir de parceria com o grupo de pesquisa do Professor Doutor Francisco Martins Teixeira. As amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé foram coletadas em apiários distribuídos em sítios do distrito de Cantagalo e arredores em setembro de 2019. As própolis de Rio das Ostras/Macaé foram extraídas pela colaboradora Jessica Cristina do Nascimento Machado em Soxhlet usando 3,5 g de amostra para 100 mL de etanol 96% (p/v) como solvente extrator. A extração foi conduzida por 4 horas e em seguida foram secas por rotaevaporador. Após esse processo, os extratos foram enviados ao Laboratório Integrado de Pesquisa em Farmacologia de Produtos Bioativos (Centro Multidisciplinar UFRJ Macaé) para realização dos testes farmacológicos.

Na figura 3, temos o mapa cedido pelo Professor Doutor Francisco Martins Teixeira e seu aluno Igor de Oliveira Machado, indicando onde foi realizada a coleta das 4 variedades de própolis de Rio das Ostras/Macaé avaliadas no presente estudo. Na tabela 1 temos a região de coleta das amostras de própolis brasileiras e seus respectivos nomes.



**Figura 3:** Números representam a localização das colmeias dentro e ao redor do distrito de Cantagalo onde foi realizada a coleta das própolis de Rio das Ostras/Macaé. Nome das amostras: Alexandre (7), Rancho da Pedra (4), Califórnia (6) e Rosinha (3). Região em azul representa o distrito de Cantagalo. Hexágono laranja representa a posição das colmeias e pontos pretos a localização das cidades. Imagem Professor Doutor Francisco Martins Teixeira e seu aluno Igor de Oliveira Machado.

**Tabela 1:** Região de coleta das amostras de própolis brasileiras e o nome dos seus respectivos extratos.

Região de coleta	Extratos - Própolis brasileiras
Bambuú - Minas Gerais	Extra Verde
Bambuú - Minas Gerais	Verde
Vacaria – Rio Grande do Sul	Amarela
Vacaria – Rio Grande do Sul	Marrom
Marechal Deodoro - Alagoas	Vermelha

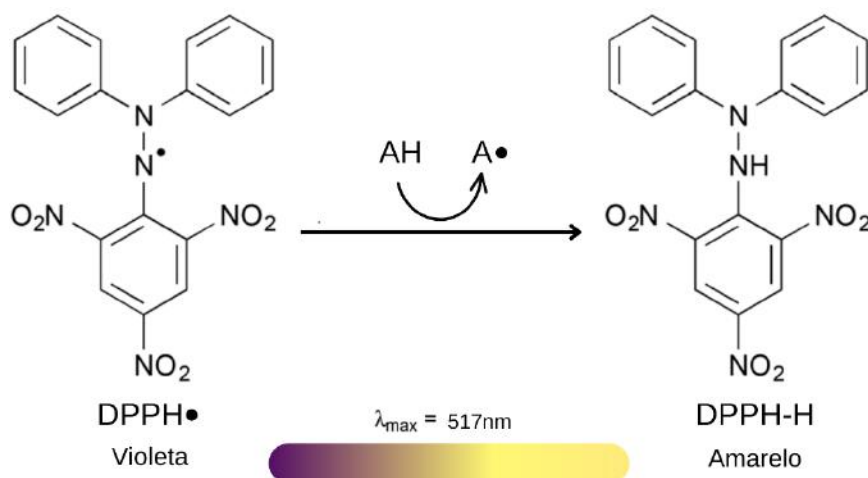
#### 4.2. Obtenção da MPO

Para a extração das células da medula, utilizadas como fonte de MPO, realizou-se uma lavagem no interior do fêmur e tíbia de ratos wistar, machos, pesando entre 200

e 250 g, com uma solução de NaCl 0,9% gelado, contendo EDTA 1mM. Após esse processo, o material obtido foi homogeneizado e centrifugado durante 10 min, com uma rotação de 3000 rpm (centrífuga - Daiki, CENTRIBIO/80-2B) em temperatura ambiente. Para a destruição das hemácias, o pellet foi homogeneizado em 5 mL de salina hipotônica (NaCl 0,2% e EDTA 1 mM) durante 30 segundos e em seguida adicionou-se 5 mL de salina hipertônica (NaCl 1,6% e EDTA 1 mM) para obtenção de uma solução novamente isotônica. O material obtido foi novamente centrifugado (10 min, 3000 rpm, temperatura ambiente) até obtenção de um pellet totalmente branco (sem hemácias). O processo era repetido até que essa condição fosse atingida. Após obtenção do pellet branco, ele foi homogeneizado em homogeneizador tipo Potter (Novatecnica-NT136) com 3 mL de tampão PBS, em pH 7 a 10 mM contendo NaCl 3 mM e MgCl<sub>2</sub> 1 mM (tampão A). Na sequência, o pellet resultante foi mais uma vez homogeneizado em Potter utilizando tampão A com 1% de HTAB. Por fim, após esta homogeneização, o material foi centrifugado durante 15 minutos a 20.000 G em 4°C (Microcentrífuga Cientec-6000 R/20.000 G). O sobrenadante foi coletado, acondicionado em eppendorfs identificados com a data de obtenção da enzima e armazenado congelado para futuros experimentos.

#### **4.3. Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH**

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de própolis foi realizada pelo método colorimétrico do DPPH. Em placa de 96 poços, uma solução 0,26 mM de DPPH, em metanol na proporção de 3:1, foi preparada e misturada com as amostras de própolis em diferentes concentrações, de 6,25 a 100 µg/mL para as amostras de Rio das Ostras/Macaé e de 6,25 a 800 µg/mL para as amostras brasileiras. Após 30 minutos sob agitação, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, a medida do DPPH• remanescente foi feita pela leitura da intensidade da absorção a 517 nm em espectrofotômetro. A diminuição na absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres e a quercetina foi utilizada como controle positivo para a análise das potências (BRAND-WILLIAMS et. al., 1995).

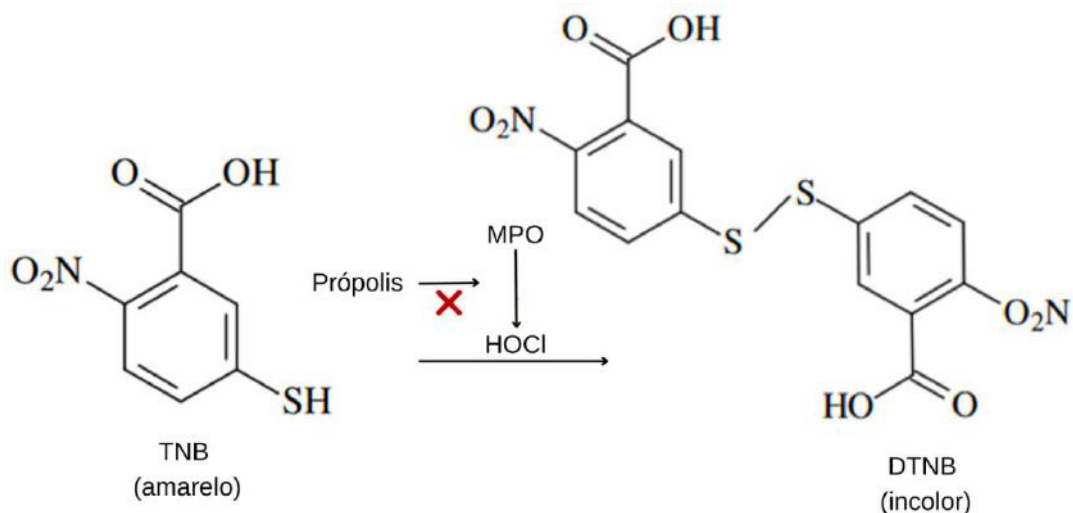


**Figura 4:** Estrutura do DPPH antes e depois da reação com um antioxidante. Imagem produzida pela própria autora.

#### 4.4. Ensaio de inibição da MPO sobre o ciclo halogenação pelas própolis

A produção de HOCl reflete a atividade catalítica da MPO sobre o ciclo halogenação. Desse modo, o ensaio seguiu conforme Ching e colaboradores (1994), sendo baseado na oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) a ácido 5-5'-ditio(2-nitrobenzóico) (DTNB) na presença de um inibidor com concentração definida. Na figura 4 temos a representação esquemática desse processo. O TNB foi obtido a partir do DTNB, com algumas adaptações. O TNB, de coloração amarela, foi preparado a partir de uma mistura de DTNB, hidróxido de sódio (NaOH) e tampão fosfato. A concentração de HOCl foi estimada medindo o decréscimo da absorbância de TNB a 412 nm.

A inibição da atividade da MPO foi avaliada utilizando microplacas de 96 poços com volume final de 125  $\mu\text{L}$ . Os extratos de própolis de Rio das Ostras/Macaé foram avaliados na faixa de 3,125 a 200  $\mu\text{g/mL}$  enquanto os extratos de própolis brasileiras foram avaliados faixa 1,25 a 600  $\mu\text{g/mL}$  em meio reacional contendo tampão fosfato de sódio (0,02 M, pH 7,4), MPO, 100 mM de NaCl e excesso de TNB ( $\sim 120 \mu\text{M}$ ). Após 20 minutos de incubação sob agitação, a reação foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a placa foi lida em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 412 nm por 1 min durante 10 min.



**Figura 5:** Fundamento do ensaio de avaliação da inibição da MPO pelos extratos de própolis por meio da oxidação do TNB à DTNB por HOCl. Imagem produzida pela própria autora.

#### 4.5. Avaliação do sequestro de HOCl pelos extratos de própolis

Considerando o perfil antioxidante das própolis, possuindo em sua composição compostos capazes de interagir com espécies oxidantes como o HOCl, as amostras foram avaliadas quanto a sua capacidade de interagir com esse ácido no mesmo meio em que se realizou os testes de inibição da MPO. Assim, a fim de remover alguma possível influência de sequestro de HOCl realizada pelos extratos, o mesmo procedimento do ensaio de inibição de MPO foi repetido, entretanto, a reação foi iniciada com a adição de 50  $\mu\text{M}$  de HOCl em vez de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O HOCl utilizado nesse ensaio foi produzido a partir de uma mistura de hipoclorito de sódio de uso doméstico (água sanitária) com tampão fosfato (0,02 M, pH 7,4) (CHING et al., 1994).

#### 4.6. Análise cromatográfica dos extratos - CLAE-DAD

As análises cromatográficas dos extratos etanólicos de própolis foram realizadas usando um UHPLC Dionex Focused Ultimate 3000 equipado com um detector DAD acoplado a um espectrômetro de massa LCQ Fleet Ion Trap da marca ThermoFisher Scientific. As condições cromatográficas foram uma coluna Ascentis Express C18 e a

fase móvel foi composta por solução de ácido fórmico 0,1% e metanol e detecção em detector de arranjo de diodos. Essa análise foi realizada em colaboração com o professor Doutor Thiago Barth.

#### **4.7. Análise estatística**

Para a análise estatística, utilizou-se o Software GraphPad Prism versão 5.0. Os valores de  $Cl_{50}$  foram determinados por regressão não-linear e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foram realizados ao menos 3 ensaios independentes realizados em triplicata. Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade empregando teste de Shapiro-Wilk seguido de análise One-way ANOVA, com o teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas para  $P < 0,05$ .

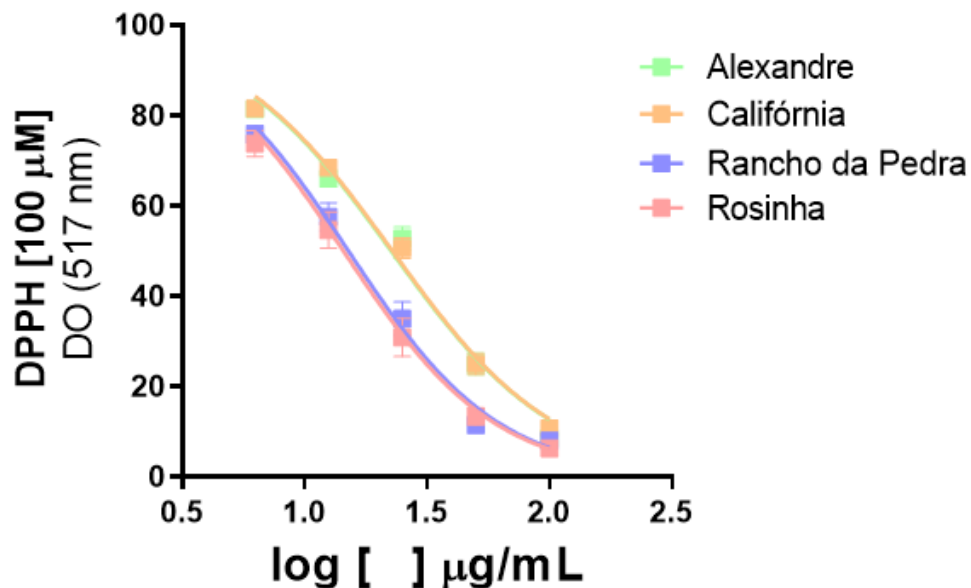
Para a Análise de Agrupamentos hierárquicos (HCA), os cromatogramas das amostras de própolis foram exportados para arquivos de texto (ASCII) e abertos no programa Excel. Os dados, incluindo os tempos de retenção e os valores de absorvância obtidos no comprimento de onda de 280 nm, foram carregados no software MINITAB 17.0 para realizar análise multivariada por HCA (análise realizada em colaboração com o professor Doutor Thiago Barth).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Avaliação da atividade antioxidante – Sequestro do radical DPPH

O potencial antioxidante das amostras de própolis foi avaliado pela capacidade dos extratos de sequestrar o DPPH radicalar. Em etapa de triagem, os extratos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras foram avaliados na concentração de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, onde demonstraram atividade antioxidante. A partir disso, uma curva concentração-resposta foi realizada (Figura 6) e a potência determinada.

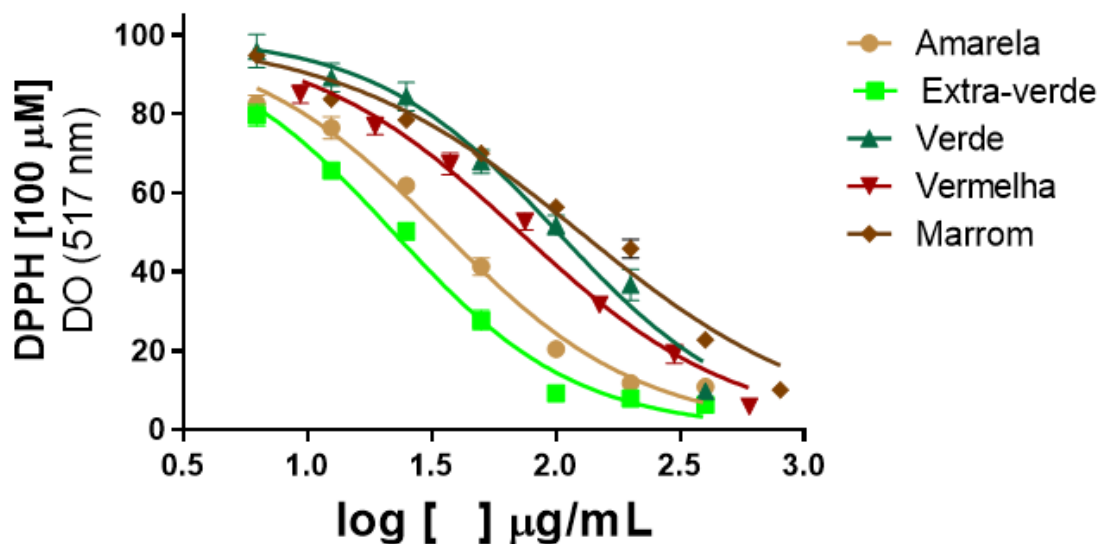
Desse modo, todos os extratos etanólicos das amostras de Rio das Ostras/Macaé foram capazes de sequestrar os radicais de DPPH próximo a 80%. Os extratos etanólicos das amostras Rancho da Pedra e Rosinha foram os mais potentes dentro do grupo, com  $\text{Cl}_{50}$  de  $15,52 \pm 1,2$  e  $14,52 \pm 1,3$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto os extratos das amostras Alexandre e Califórnia apresentaram  $\text{Cl}_{50}$  de  $23,0 \pm 1,6$  e  $23,09 \pm 1,2$   $\mu\text{g/mL}$ , nessa ordem ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).



**Figura 6:** Gráfico da curva concentração resposta da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis de Rio das Ostras/Macaé pelo método do DPPH. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 6,25 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Pontos representam a média e traços o erro padrão da média de 3-4 experimentos realizados em triplicata. Dados expressos como % do DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) remanescente em relação ao controle. Regressão não-linear realizada no programa *Graph Pad Prism 0.5*.



Assim como os extratos das amostras de Rio das Ostras/Macaé, todos os extratos etanólicos das amostras brasileiras apresentaram atividade de eliminação desses radicais livres (Figura 7).



**Figura 7:** Gráfico da curva concentração resposta da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis brasileiras pelo método do DPPH. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL. Pontos representam a média e traços o erro padrão da média de 3-4 experimentos realizados em triplicata. Dados expressos como % do DPPH (100 µM) remanescente em relação ao controle. Regressão não-linear realizada no programa *Graph Pad Prism 0.5*.

Os extratos das amostras Amarela e Extra-Verde apresentaram  $CI_{50}$  de  $35,01 \pm 2,8$  µg/mL e  $22,44 \pm 1,5$  µg/mL, respectivamente, sendo mais potentes que as demais amostras, cujas  $CI_{50}$  foram de  $72,72 \pm 5,9$  µg/mL,  $103,6 \pm 12,8$  µg/mL e  $128,4 \pm 5,4$  µg/mL para as amostras Vermelha, Verde e Marrom na sequência ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Potência dos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras a partir do método do DPPH.

Extrato etanólico de Própolis	N	CI <sub>50</sub> ± EPM (µg/mL)
<b>Rio das Ostras/Macaé</b>		
Alexandre	3	23 ± 1,6 <sup>a</sup>
Califórnia	3	23,09 ± 1,2 <sup>a</sup>
Rancho da Pedra	3	15,52 ± 1,2 <sup>b</sup>
Rosinha	3	14,52 ± 1,3 <sup>b</sup>
<b>Brasileiras</b>		
Amarela	3	35,01 ± 2,8 <sup>a</sup>
Extra-Verde	3	22,44 ± 1,5 <sup>a</sup>
Verde	3	103,6 ± 12,8 <sup>b</sup>
Vermelha	3	72,72 ± 5,9 <sup>c</sup>
Marrom	4	128,4 ± 5,4 <sup>b</sup>
<b>Controle Positivo</b>		
Quercetina	3	12,8 ± 0,5 <sup>d</sup>

Média de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata. EPM: Erro Padrão da Média. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa. Valores de CI<sub>50</sub> obtidos por regressão não-linear realizada no programa *Graph Pad Prism 0.5*.

Ao compararmos nossos resultados sobre eliminação de radicais livres com os da literatura, temos que os valores de CI<sub>50</sub> encontrados para os extratos etanólicos de Rio das Ostras/Macaé estão próximos aos encontrados para os extratos etanólicos de duas amostras da Argélia. Os valores de CI<sub>50</sub> encontrados foram de 19,4 ± 0,2 µg/mL para a região de Tizirt e de 24,7 µg/mL ± 0,3 µg/mL para a região Yennarou do respectivo país (BOUFADI et al., 2014).

Ainda, diferentemente das outras própolis argelinas analisadas, as própolis de Tizirt e Yennarou foram coletadas em regiões ricas em plantas e com elevada

disponibilidade hídrica, o que sugere ter colaborado para as maiores concentrações de compostos antioxidantes, incluindo polifenóis, flavonoides e ácido ascórbico (BOUFADI et al., 2014). O município de Rio das Ostras, por sua vez, também é favorecido por esses fatores, sendo contemplado por 3 bacias hidrográficas e tendo como principais rios o Jundiá, Macaé e das Ostras. O distrito de Cantagalo onde foi feita a coleta das própolis é drenado principalmente pelo rio Jundiá, além de ser localizado em um dos maiores fragmentos de mata-atlântica do município (LOPES, 2017). Logo, a disponibilidade de água e a flora da região são aspectos que podem ter contribuído para a composição química e, conseqüentemente, para a atividade antioxidante observada para extratos de Rio das Ostras/Macaé.

O potencial antioxidante das amostras de própolis vem sendo associado a concentração de compostos fenólicos, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. Sua estrutura química permite a doação de elétrons a moléculas instáveis, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), reduzindo assim o dano oxidativo (KUMAZAWA et al., 2004).

Um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2017) com amostras de própolis verde brasileiras identificou que o ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, ácido 3,4,5- tricofilinquinico, o kaempferol, o kaempferide e o artepillin C (mais abundante) apresentavam relação significativa com a atividade de sequestro de radicais DPPH, sugerindo que esses 8 compostos tinham importante participação para a atividade antioxidante revelada.

Desses compostos, o ácido clorogênico, ácido cafeico, kaempferide e o artepillin C já foram identificados nos extratos das amostras Extra-Verde e de Rio das Ostras/Macaé (dados não publicados fornecidos pelo professor Thiago Barth), sugerindo terem colaborado para a atividade antioxidante.

A determinação dessa composição química é contribuída pelo estudo de RICE-EVANS e colaboradores (1996), o qual demonstrou que as diferenças na capacidade antioxidante dos compostos fenólicos são dependentes de sua estrutura química em relação ao número e posição dos grupos hidroxila no anel fenólico. E que, além disso, a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres 3,4-orto substituídos é favorecida. Ainda, para os flavonoides, uma melhor atividade antioxidante é alcançada

quando o grupo 3-OH está ligado à ligação dupla 2,3 e adjacente ao grupo 4-carbonilo no anel C, além da presença do catecol no anel B. Desse modo, a identificação do ácido 3,4-dicafeoilquínico e da quercetina nos extratos analisados no presente estudo (dados ainda não publicados pelo Professor Thiago Barth) reforçam o potencial antioxidante das amostras Extra-Verde e de Rio das Ostras/Macaé por também apresentarem esses compostos.

Além disso, o perfil antioxidante observado para os extratos das própolis de Rio das Ostras/Macaé e das brasileiras pode contribuir para redução dos danos causados pelo estresse oxidativo ao endotélio vascular, não apenas eliminando radicais livres, mas também modulando positivamente a resposta antioxidante endógena. Um estudo feito por Zhu e colaboradores (2011), demonstrou que enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e o tripeptídeo GSH (glutathione) apresentaram aumento significativo em animais tratados com extrato etanólico de própolis verde brasileira em comparação com aqueles não tratados em um modelo de diabetes induzido.

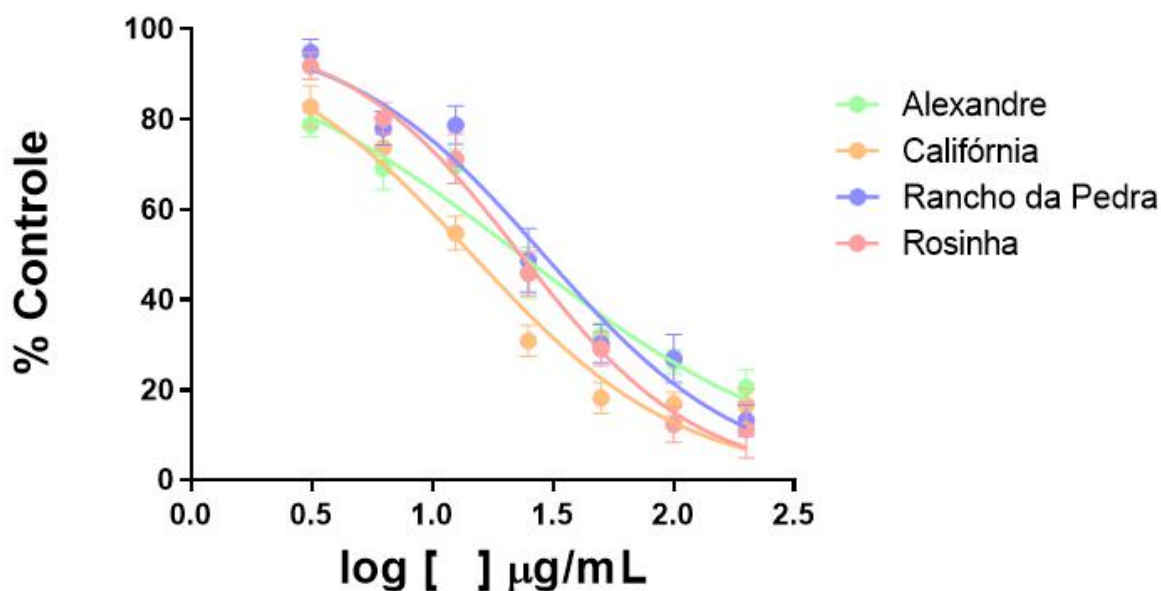
Apesar de não ser totalmente elucidada as causas desse aumento enzimático, a ativação do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) já foi relatada. O Nrf2 é um fator de transcrição que age como o principal regulador da resposta antioxidante. Durante eventos de estresse oxidativo, ele migra para o núcleo celular e ativa genes envolvidos na expressão dessas enzimas antioxidantes. O tratamento com própolis vermelha brasileira, por exemplo, promoveu aumento dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) dos genes Nrf2, quinona oxidoreductase-1 (NQO1), heme oxigenase-1 (Hmox1) responsáveis pela ativação de defesas antioxidantes endógenas. Logo, embora não seja possível extrapolarmos este resultado para os outros tipos de própolis analisadas no presente estudo, essas informações sugerem que ativação da via Nrf2 possa estar envolvida (HOTTA et al., 2020).

## **5.2. Avaliação da inibição da MPO e sequestro de HOCl**

A atividade da MPO foi medida por meio da produção de HOCl utilizando o método de oxidação do TNB. Para isso, inicialmente foi realizada uma triagem para todos os extratos etanólicos das amostras de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras. Nessa etapa, a

concentração dos extratos foi de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  para as amostras de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras, respectivamente, e todos apresentaram atividade significativa. A partir disso, uma curva concentração-resposta foi plotada para a análise da eficácia dos extratos em inibir o ciclo catalítico da MPO e para a determinação de sua potência. A quercetina foi utilizada como controle positivo.

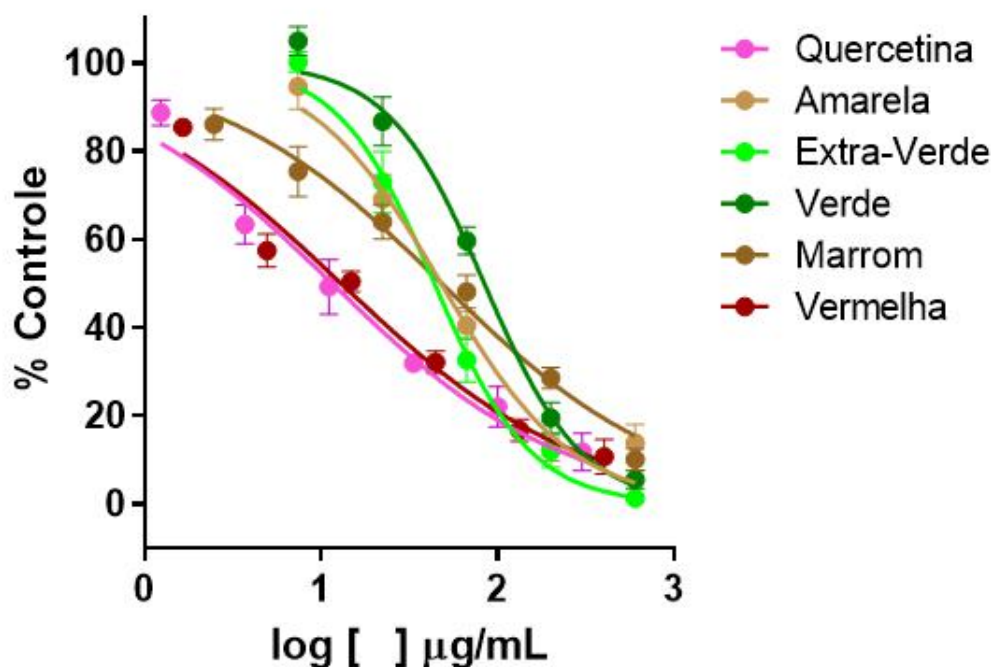
Todos os extratos etanólicos das amostras de Rio das Ostras/Macaé foram eficazes em inibir a produção de HOCl pela MPO (Figura 8). O extrato da amostra Califórnia apresentou o menor valor de  $\text{CI}_{50}$  ( $15,52 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$ ), sendo diferente estatisticamente apenas do extrato de Rancho da Pedra, cujo valor de  $\text{CI}_{50}$  foi de  $32,15 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,05$ ). Os extratos das amostras Alexandre e Rosinha apresentaram valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $24,54 \pm 3,3$  e  $26,24 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabela 3).



**Figura 8:** Curva concentração resposta dos extratos de própolis de Rio das Ostras quanto atividade inibitória da MPO sobre o ciclo cloração. Os derivados foram avaliados a concentrações de 3,125 a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Pontos representam a média e traços o erro padrão da média de 3-4 experimentos realizados em triplicata. Dados expressos como % controle tendo como taxa de atividade da MPO a taxa de branqueamento do TNB em 412 nm. Regressão não-linear realizada no programa *Graph Pad Prism 0.5*.

Em relação aos extratos etanólicos das amostras brasileiras, todos também foram capazes de inibir a enzima (Figura 9). O extrato etanólico da amostra Vermelha apresentou  $\text{CI}_{50}$  de  $16,2 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$  e se mostrou mais potente que os demais extratos de própolis brasileiras analisadas neste estudo ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença

significativa do extrato de própolis Vermelha em relação ao padrão positivo quercetina ( $CI_{50} = 14,19 \mu\text{g/mL}$  ( $P > 0,05$ )). Os extratos das amostras Amarela, Marrom e Extra-Verde apresentaram potências intermediárias, com valores de  $CI_{50}$  de  $52,34 \pm 5,0 \mu\text{g/mL}$ ,  $57,35 \pm 9,8 \mu\text{g/mL}$  e  $54,07 \pm 5,0 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. A própolis que revelou menor potência foi a Verde, com uma  $CI_{50}$  de  $106,2 \pm 13,8 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 3).



**Figura 9:** Gráfico da curva concentração resposta dos extratos de própolis brasileiras quanto atividade inibitória da MPO sobre o ciclo cloração. Os derivados foram avaliados a concentrações de 1,25 a 600  $\mu\text{g/mL}$ . Pontos representam a média e traços o erro padrão da média de 3-4 experimentos realizados em triplicata. Dados expressos como % controle tendo como taxa de atividade da MPO a taxa de branqueamento do TNB em 412 nm. Regressão não-linear realizada no programa *Graph Pad Prism 0.5*.

**Tabela 3:** Potência dos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras em inibir a atividade clorinante da MPO.

<b>Extrato etanólico de Própolis</b>	<b>N</b>	<b>CI<sub>50</sub> ± EPM (µg/mL)</b>
<b>Rio das Ostras/Macaé</b>		
Alexandre	3	24,54 ± 3,3 <sup>a,b</sup>
Califórnia	3	15,52 ± 2 <sup>a</sup>
Rancho da Pedra	3	32,15 ± 4,5 <sup>b</sup>
Rosinha	3	26,24 ± 4,1 <sup>a,b</sup>
<b>Brasileiras</b>		
Amarela	3	52,34 ± 5 <sup>b</sup>
Extra-Verde	3	54,07 ± 5 <sup>b</sup>
Verde	3	106,2 ± 13,8 <sup>c</sup>
Vermelha	4	16,2 ± 1,9 <sup>a</sup>
Marrom	3	57,35 ± 9,8 <sup>b</sup>
<b>Controle positivo</b>		
Quercetina	3	14,19 ± 2,05 <sup>a</sup>

Média de 3 a 4 experimentos independentes realizados em triplicata. EPM: Erro Padrão da Média. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa. Valores de CI<sub>50</sub> determinados por regressão não-linear no programa Graph Pad Prism 0.5.

Nesse sentido, ao compararmos ambos os grupos de própolis estudados, é possível perceber que os valores de CI<sub>50</sub> para a inibição da MPO dos extratos de Rio das Ostras se aproximam daquele encontrado para o extrato de própolis Vermelha (16,2 µg/mL). Além disso, no mesmo estudo realizado por Boufardi e colaboradores (2014), os extratos de própolis argelinas também foram submetidos ao teste de inibição da MPO. Em seus resultados, dentre os extratos etanólicos, as amostras de Tizirt e Ain El Arba apresentaram CI<sub>50</sub> de 21 µg/mL e Yennarou de 10,3 µg/mL. Esses valores também são

semelhantes ao que encontramos para a os extratos etanólicos de própolis Vermelha brasileira e as mais potentes de Rio das Ostras quando utilizado o mesmo solvente de extração.

Entretanto, diferentemente do observado no estudo de Boufardi e colaboradores (2014), as amostras mais potentes em sequestrar os radicais DPPH analisadas no presente estudo (Extra-Verde e Rosinha) não foram as mais potentes em inibir a atividade da MPO (Vermelha e Califórnia). Esse resultado pode ser explicado pelo estudo de Shiba e colaboradores (2008), que demonstraram com de uma análise de relação estrutura-atividade que as ações inibitórias dos compostos fenólicos eram dependentes não apenas da atividade de eliminação de radicais, mas também de propriedades físico-químicas como a hidrofobicidade e o tamanho da molécula. O artigo revela que o esqueleto estrutural hidrofóbico de flavonoides favorece a interação com a MPO, conforme se observa com a quercetina, um potente inibidor dessa enzima que atua se ligando em uma região hidrofóbica do sítio heme distal da MPO. Ainda, grandes moléculas de flavonoides e polifenóis podem causar impedimento estérico, dificultando o composto de acessar e interagir com o sítio ativo da enzima.

Além disso, tendo em vista a composição química e o perfil antioxidante das própolis, as quais apresentam compostos fenólicos e flavonoides capazes de interagir com espécies oxidantes, um controle adicional foi realizado. Para isso, os extratos de própolis foram avaliados quanto a sua capacidade de sequestrar o HOCl, o principal agente oxidante produzido pela MPO. Neste protocolo, tanto os extratos etanólicos das amostras de Rio das Ostras/Macaé quanto das brasileiras, nas maiores concentrações utilizadas sobre o ciclo da MPO, não apresentaram redução significativa nos níveis de HOCl (Tabela 3).

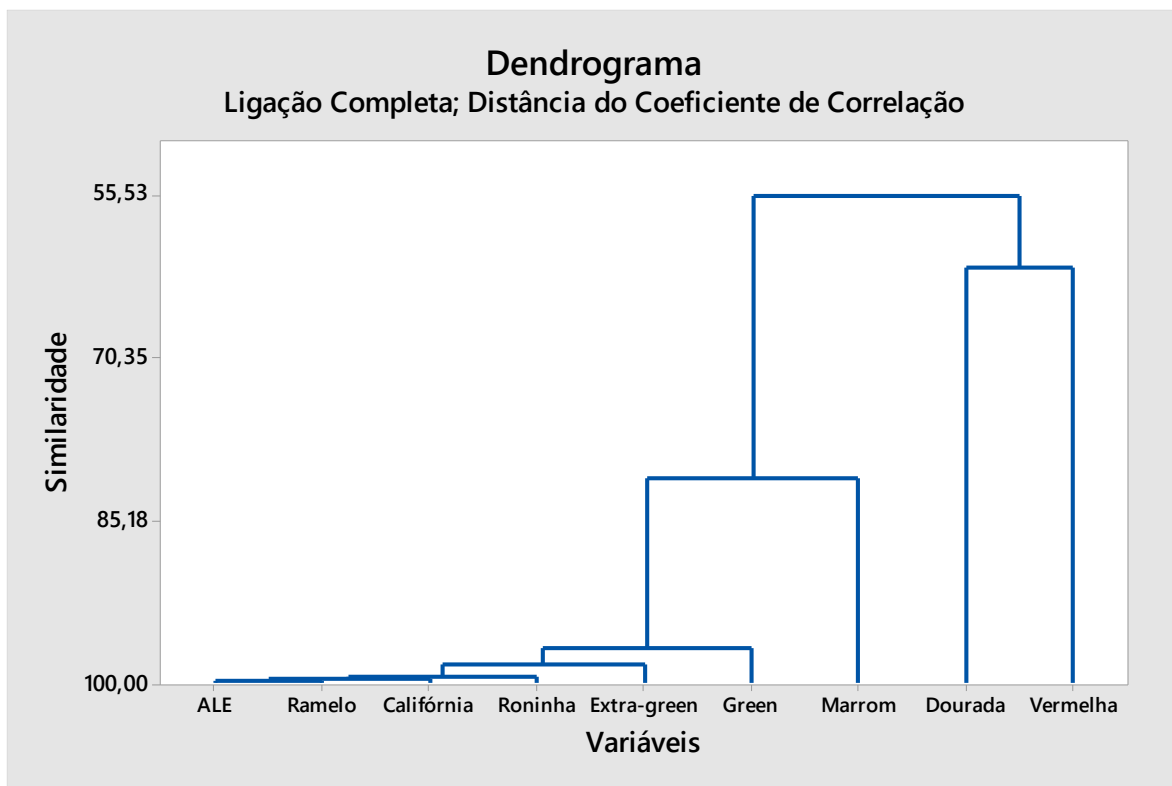
Desse modo, pode-se considerar que as substâncias presentes nas amostras de própolis podem, de fato, estar interagindo com o sítio catalítico da MPO, inibindo a sua atividade, e não apenas sequestrando seu produto (HOCl).



**Tabela 4:** Atividade de sequestro de HOCl pelos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras em relação ao percentual do controle.

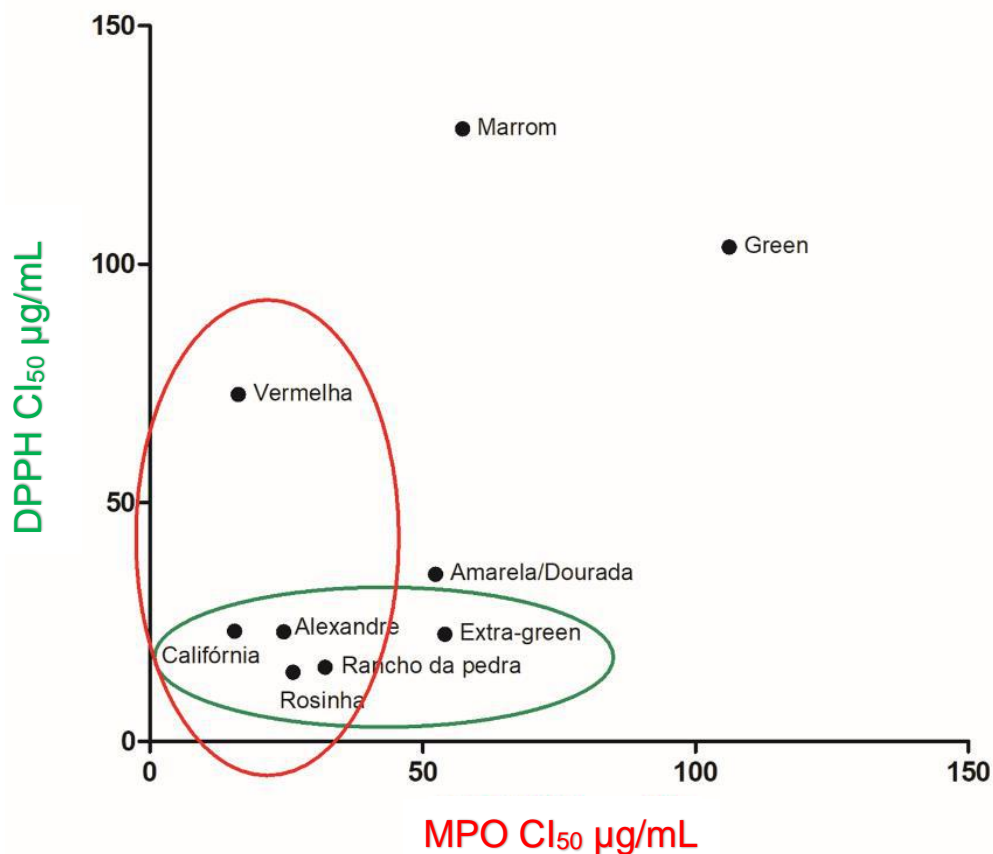
<b>Extrato etanólico de Própolis</b>	<b>N</b>	<b>HOCl remanescente (% controle)</b>
<b>Rio das Ostras/Macaé (200 µg/mL)</b>		
Alexandre	3	101,9 ± 5,9
Califórnia	3	100,1 ± 7,1
Rancho da Pedra	3	91,9 ± 6,7
Rosinha	3	89 ± 8,2
<b>Brasileiras (600 µg/mL)</b>		
Amarela	3	87,99 ± 9,7
Extra-Verde	3	138,92 ± 21,7
Verde	3	126,74 ± 18,8
Vermelha	3	125,16 ± 17,6
Marrom	3	106,42 ± 13,6

Uma análise fitoquímica realizada pelo grupo do professor Thiago Barth permitiu uma comparação das amostras quanto às suas similaridades (dados não publicados). Um dendrograma obtido a partir de uma análise de grupamento hierárquico revelou a similaridade dos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras com os extratos etanólicos brasileiros. Assim, os extratos de Rio das Ostras tiveram um índice de semelhança em torno de 98 com o extrato da amostra Extra-Verde, e mostraram ser praticamente iguais entre si (índice de similaridade em torno de 100) (Figura 10).



**Figura 10:** Dendrograma de similaridade entre os extratos etanólicos das própolis de Rio das Ostras em comparação aos extratos brasileiros.

Nesse sentido, para a análise de sequestro do DPPH, a similaridade da atividade das amostras de Rio das Ostras/Macaé e das brasileiras (Extra-Verde) é compatível com a fitoquímica observada. Entretanto, quando tomamos a atividade inibitória sobre a MPO, a similaridade dos extratos das amostras de Rio das Ostras/Macaé é maior com a própolis Vermelha (Figura 11). Isso evidencia a dificuldade de padronização das própolis considerando apenas a sua composição química. Se por um lado o efeito antioxidante é menos seletivo no que se refere a requisitos estruturais, podendo estar associado a ação de diversas substâncias com capacidade redutora, por outro, a interação com o sítio catalítico da MPO pode ser mais específica, exigindo requisitos estruturais e propriedades físico-químicas.



**Figura 11:** Comparação dos valores de Cl<sub>50</sub> em relação as atividades de sequestro de DPPH e inibição da MPO das amostras de Rio das Ostras e brasileiras.

No estudo de Boufadi e colaboradores (2014) foi demonstrado concentrações muito variáveis de flavonoides e polifenóis nas amostras, sendo ambos potencialmente capazes de inibir a MPO. Entretanto, numa análise mais detalhada, apenas uma correlação entre o teor de polifenóis e a inibição da MPO pôde ser estabelecida, não existindo essa mesma correlação para os flavonoides. Esse dado sugere que, apesar do potencial em inibir a MPO, alguns flavonoides inibem especificamente essa enzima enquanto outros não apresentam essa capacidade, mas podem contribuir com a atividade antioxidante.

O perfil farmacológico dos extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé mostrou que suas potências variam entre si, tanto no efeito antioxidante, quanto no efeito inibidor da MPO. Isso evidencia que, apesar de terem sido coletadas em regiões geográficas próximas, as abelhas podem utilizar diferentes plantas como fonte

de coleta de material para a produção desse produto, o que pode interferir em sua composição e efeito. Logo, um conhecimento maior da provável origem botânica das própolis de Rio das Ostras pode auxiliar no entendimento das suas atividades biológicas.

Além disso, a identificação das substâncias relacionadas à inibição da MPO nas amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé e brasileiras, permitirá compreender se a similaridade farmacológica encontrada está relacionada a presença das mesmas substâncias, ou substâncias similares, que atuem isoladamente ou em conjunto. Haja vista, a baixa similaridade fitoquímica observada entre a amostra de própolis Vermelha e as de Rio das Ostras/Macaé.

## 6. CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos das amostras Rosinha, Rancho da Pedra, Amarela e Extra-Verde foram os mais potentes em eliminar o radical DPPH, sendo compatível com o estudo fitoquímico realizado. Em relação a inibição da MPO, os extratos etanólicos das amostras Califórnia e Vermelha demonstraram maior potência. Sendo assim, tanto os extratos etanólicos das amostras de própolis de Rio das Ostras/Macaé como as brasileiras foram capazes de promover tanto a neutralização de espécies radicalares quanto a inibição da produção de espécies oxidantes. Essa característica indica que as própolis produzidas na região podem ser fonte de compostos antioxidantes e apresentar substâncias específicas capazes de inibir a MPO, demonstrando potencial atividade anti-inflamatória, a qual pode ser útil no tratamento de doenças cardiovasculares, principalmente no que refere ao combate à disfunção endotelial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, Adrian I. et al. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction. **Redox biology**, v. 13, p. 623-632, 2017.

ASTERN, Joshua M. et al. Myeloperoxidase interacts with endothelial cell-surface cytokeratin 1 and modulates bradykinin production by the plasma Kallikrein-Kinin system. **The American journal of pathology**, v. 171, n. 1, p. 349-360, 2007.

BALLIEUX, B. E. P. B. et al. Binding of proteinase 3 and myeloperoxidase to endothelial cells: ANCA-mediated endothelial damage through ADCC?. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 97, n. 1, p. 52-60, 1994.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**. v.100, n.1-2, p. 114-117, 2005.

BHARGAVA, Priyanshu et al. Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2528, 2021.

BOUFADI, Yasmina Mokhtaria et al. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 2327-2345, 2014.

BOZONET, Stephanie M. et al. Hypothiocyanous acid is a potent inhibitor of apoptosis and caspase 3 activation in endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 6, p. 1054-1063, 2010.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CARR, Anitra C. et al. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. **FEBS letters**, v. 487, n. 2, p. 176-180, 2000.

CHEN, Xing et al. Myeloperoxidase modification of high-density lipoprotein suppresses human endothelial cell proliferation and migration via inhibition of ERK1/2 and Akt activation. **Atherosclerosis**, v. 273, p. 75-83, 2018.

CHENG, David et al. Inhibition of MPO (myeloperoxidase) attenuates endothelial dysfunction in mouse models of vascular inflammation and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 39, n. 7, p. 1448-1457, 2019.

CHENG, Guangjie et al. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 12, p. 1682-1694, 2008.

CHING, Tjong-Lie; DEJONG, Jan; BAST, Aalt. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application anti-asthmatic drugs. **Analytical biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 377-381, 1994.

CYR, Anthony R. et al. Nitric oxide and endothelial dysfunction. **Critical care clinics**, v. 36, n. 2, p. 307-321, 2020.

DALEPRANE, Julio Beltrame; ABDALLA, Dulcinéia Saes. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, 2013.

DAVIES, Michael J. et al. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 7, p. 1199-1234, 2008.

DOS SANTOS, C. R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 71-74, 2003.

EISERICH, Jason P. et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. **Science**, v. 296, n. 5577, p. 2391-2394, 2002.

FIEDLER, Tristan J.; DAVEY, Curt A.; FENNA, Roger E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11964-11971, 2000.

FURTMÜLLER, Paul G. et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 445, n. 2, p. 199-213, 2006.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GILES, Thomas D. et al. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 198-205, 2012.

GIMBRONE JR, Michael A.; GARCÍA-CARDEÑA, Guillermo. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. **Circulation research**, v. 118, n. 4, p. 620-636, 2016.

GODO, Shigeo; SHIMOKAWA, Hiroaki. Endothelial functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 9, p. e108-e114, 2017.

GOLDMANN, Britta U. et al. Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 1, p. 79-83, 2009.

HARRISON, David et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **The American journal of cardiology**, v. 91, n. 3, p. 7-11, 2003.



HAYACIBARA, Mitsue F. et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 110-115, 2005.

HOTTA, Sho; UCHIYAMA, Satoshi; ICHIHARA, Kenji. Brazilian red propolis extract enhances expression of antioxidant enzyme genes in vitro and in vivo. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 84, n. 9, p. 1820-1830, 2020.

HU, Fuliang et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 276-283, 2005.

KAYA, Mehmet G. et al. Potential role of plasma myeloperoxidase level in predicting long-term outcome of acute myocardial infarction. **Texas Heart Institute Journal**, v. 39, n. 4, p. 500, 2012.

KLEBANOFF, Seymour J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 2, p. 185-198, 2013.

KLINKE, Anna et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 117, n. 4, p. 1350-1358, 2011.

KUMAZAWA, Shigenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LAU, Denise et al. Myeloperoxidase upregulates endothelin receptor type B expression. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 69, p. 76-82, 2014.

LLOYD, Mitchell M. et al. Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1352-1362, 2013.

LOPES, Renata S. et al. Plano Municipal de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica. **Série Planos da Mata Atlântica**, v.8, p. 65-71, 2017

LOUGHRAN, Noeleen B. et al. The phylogeny of the mammalian heme peroxidases and the evolution of their diverse functions. **BMC evolutionary biology**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2008.

MAIOCCHI, Sophie L. et al. Myeloperoxidase: A versatile mediator of endothelial dysfunction and therapeutic target during cardiovascular disease. **Pharmacology & therapeutics**, v. 221, p. 107711, 2021.

MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARQUEZ, Leah A.; DUNFORD, H. B. Reaction of compound III of myeloperoxidase with ascorbic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 11, p. 6074-6078, 1990.

MARSCHE, Gunther et al. 2-Chlorohexadecanal derived from hypochlorite-modified high-density lipoprotein-associated plasmalogen is a natural inhibitor of endothelial nitric oxide biosynthesis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 12, p. 2302-2306, 2004.

MARSCHE, Gunther et al. Hypochlorite-modified albumin colocalizes with RAGE in the artery wall and promotes MCP-1 expression via the RAGE-Erk1/2 MAP-kinase pathway. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 1145-1152, 2007.

MATSUDA, Andrea Harumi; MACHADO, Luci Brocardo; DEL MASTRO, Nélida Lucia. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 63, n. 3-6, p. 353-355, 2002.

MIDWINTER, Robyn G. et al. Extracellular oxidation by taurine chloramine activates ERK via the epidermal growth factor receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32205-32211, 2004.

MIYASAKI, K. T. et al. Role of high-avidity binding of human neutrophil myeloperoxidase in the killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and immunity**, v. 55, n. 5, p. 1029-1036, 1987.

NDREPEPA, Gjin. Myeloperoxidase—A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. **Clinica chimica acta**, v. 493, p. 36-51, 2019.

NICHOLLS, Stephen J.; HAZEN, Stanley L. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 6, p. 1102-1111, 2005.

OZKUL, YUSUF; SILICI, SİBEL; EROĞLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, v. 12, n. 10, p. 742-747, 2005.

PARK, Yong Kun; IKEGAKI, Masaharu; ALENCAR, SM de. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v. 58, n. 9, p. 3-7, 2000.

PARKER, Heather et al. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. **Journal of leukocyte biology**, v. 91, n. 3, p. 369-376, 2012.

PENG, Huihui et al. VPO1 modulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) in abdominal aortic aneurysms. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 17, p. e010069, 2018.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. S7-S20, 2002.

PINTO, Luciana de Matos Alves; DO PRADO, Ney Robson Taironi; DE CARVALHO, Lucas Bragança. PROPRIEDADES, USOS E APLICAÇÕES DA PRÓPOLIS. **Revista Eletrônica de farmácia**, v. 8, n. 3, p. 25-25, 2011.

REES, Martin D. et al. Myeloperoxidase-derived oxidants selectively disrupt the protein core of the heparan sulfate proteoglycan perlecan. **Matrix biology**, v. 29, n. 1, p. 63-73, 2010.

RICCIARDOLO, Fabio LM et al. Bradykinin-and lipopolysaccharide-induced bradykinin B2 receptor expression, interleukin 8 release and “nitrosative stress” in bronchial epithelial cells BEAS-2B: role for neutrophils. **European journal of pharmacology**, v. 694, n. 1-3, p. 30-38, 2012.

RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROSSMANN, Christine et al. Hypochlorite-modified high-density lipoprotein promotes induction of HO-1 in endothelial cells via activation of p42/44 MAPK and zinc finger transcription factor Egr-1. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 509, n. 1, p. 16-25, 2011.

RUDOLPH, Volker et al. Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. **Nature medicine**, v. 16, n. 4, p. 470-474, 2010.

SFORCIN, José M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SHIBA, Yuko et al. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 8, p. 1600-1609, 2008.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

STACEY, Melissa M. et al. Protein thiol oxidation and formation of S-glutathionylated cyclophilin A in cells exposed to chloramines and hypochlorous acid. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 527, n. 1, p. 45-54, 2012.

SUGIYAMA, Seigo et al. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 7, p. 1309-1314, 2004.

TARBELL, John M.; SIMON, Scott I.; CURRY, Fitz-Roy E. Mechanosensing at the vascular interface. **Annual review of biomedical engineering**, v. 16, p. 505, 2014.

TENG, Nathaniel et al. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. **Redox Report**, v. 22, n. 2, p. 51-73, 2017.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; Bankova, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2007.

ÜLLEN, Andreas et al. Covalent adduct formation between the plasmalogen-derived modification product 2-chlorohexadecanal and phloretin. **Biochemical pharmacology**, v. 93, n. 4, p. 470-481, 2015.

UNDURTI, Arundhati et al. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 30825-30835, 2009.

VAN GOLEN, Rowan F.; VAN GULIK, Thomas M.; HEGER, Michal. Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1382-1402, 2012.

VISSERS, Margret CM; THOMAS, Carin. Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 401-411, 1997.

VITA, Joseph A.; KEANEY JR, John F. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?. **Circulation**, v. 106, n. 6, p. 640-642, 2002.

VON LEITNER, Eike-Christin et al. Pathogenic cycle between the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetrical dimethylarginine and the leukocyte-derived hemoprotein myeloperoxidase. **Circulation**, v. 124, n. 24, p. 2735-2745, 2011.

WANG, Jian-Guo et al. Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: a novel HOSCN-specific oxidant mechanism to amplify inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8714-8722, 2006.

WINTERBOURN, Christine C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WOODS, Alan A.; DAVIES, Michael J. Fragmentation of extracellular matrix by hypochlorous acid. **Biochemical Journal**, v. 376, n. 1, p. 219-227, 2003.

WOŹNIAK, Magdalena et al. Effect of the solvent on propolis phenolic profile and its antifungal, antioxidant, and in vitro cytoprotective activity in human erythrocytes under oxidative stress. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4266, 2020

YUHANNA, Ivan S. et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. **Nature medicine**, v. 7, n. 7, p. 853-857, 2001.

ZHANG, Cuiping et al. Identification of free radical scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. **Journal of food science**, v. 82, n. 7, p. 1602-1607, 2017.

ZHANG, Renliang et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. **Jama**, v. 286, n. 17, p. 2136-2142, 2001.

ZHU, Wei et al. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

ZOU, Ming-Hui et al. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 6, p. 817-826, 2002.