Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Digestão *in vitro* e transporte de polifenóis de própolis orgânica do Sul do Brasil
por meio de células humanas Caco-2

Ana Sofia Martelli Chaib Saliba

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Ana Sofia Martelli Chaib Saliba
Bióloga - Bacharela

Digestão *in vitro* e transporte de polifenóis de própolis orgânica do Sul do Brasil por meio de células humanas Caco-2

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Saliba, Ana Sofia Martelli Chaib

Digestão *in vitro* e transporte de polifenóis de própolis orgânica do Sul do Brasil por meio de células humanas Caco-2 / Ana Sofia Martelli Chaib Saliba. - - Piracicaba, 2021.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Própolis orgânica 2. Bioacessibilidade 3. Transporte epitelial Caco-2
4. Atividade antioxidante I. Título

Aos meus pais, Ana e Gilberto
e à minha querida irmã, Soraia

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho, me abençoado e dado forças para que eu sempre siga em frente;

Aos meus pais, Ana e Gilberto, por estarem ao meu lado me dando apoio, carinho e se dedicando ao máximo para sempre me oferecerem o melhor;

À minha irmã Soraia, por fazer meus dias muito mais felizes, por estar do meu lado todos os momentos da minha vida, e por tudo que já vivemos juntas;

Ao meu namorado Rodolfo, por todo carinho e força nos momentos que mais precisei, pela paciência e compreensão;

Ao meu orientador Prof. Severino Matias de Alencar, por me dar a oportunidade de estar realizando esse trabalho, pela confiança depositada em mim, pelos aprendizados e incentivo em conquistar meus objetivos profissionais;

Ao Prof. Masaharu Ikegaki, que sempre esteve muito presente, auxiliando com seus ensinamentos, dando apoio e me incentivando desde à graduação;

Ao Prof. e amigo Alan, por me dar a oportunidade de estagiar em suas disciplinas, por todos os ensinamentos, e principalmente pela amizade;

Ao Prof. Pedro Rosalen, pela confiança, incentivo e ensinamentos;

À Breyer- Produtos das abelhas, por fornecer a própolis para realização do trabalho;

Ao grupo de estudos da própolis orgânica, pela oportunidade e por todos os ensinamentos;

Aos amigos do Laboratório Multiusuário de Bioquímica, em especial à Adna e à Regina, por sempre estarem dispostas a me ajudar, ensinar e incentivar;

Aos amigos que me acolheram em Piracicaba: Polly, Fernanda, José Eduardo, Daniel, Layfa, Gabi e Marina, por todos os momentos vividos, todas as risadas, todo companheirismo, vocês são a minha família de Piracicaba;

As minhas companheiras(o) de apartamento, Bella, Mari e Felipe por todos os momentos bons que vivemos juntos;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, aos meus professores e funcionários do departamento de Agroindústrias, Alimentos e Nutrição,

À Capes, pela concessão das bolsas e suporte financeiro (nº 88882.378384/2019-01).

A todos vocês, meus mais sinceros agradecimentos e carinho!

Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”. (Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Produtos Naturais	13
2.2.1. Própolis Orgânica	15
2.3. Processos Oxidativos e Espécies Reativas	16
2.4. Compostos Fenólicos.....	18
2.5. Biodisponibilidade, bioacessibilidade e bioatividade.....	19
2.6. <i>Galleria mellonella</i> como um bioindicador.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Coleta de amostras de Própolis Orgânica	24
3.2. Preparo de extrato etanólico de Própolis Orgânica	25
3.3. Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>	25
3.4.2. Cultivo de células para ensaio de transporte	28
3.4.3. Teste de viabilidade celular	28
3.4.4. Ensaio de transporte em células Caco-2	28
3.5. Análises química e biológicas do extrato de própolis, fases da digestão e frações do transporte epitelial	29
3.5.1. Espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)	29
3.5.2. Teor de compostos fenólicos totais	30
3.5.3. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS•+	30
3.5.4. Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power).....	30
3.5.5. Atividade antioxidante online por CLAE-FR com o radical ABTS•+	31
3.5.6. Sequestro do radical peroxila (ROO•).....	32
3.5.7. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl).....	33
3.5.8. Ensaio de sequestro do radical superóxido (O ₂ •-)	33
3.6. Ensaio de Toxicidade com <i>Galleria mellonella</i>	34
3.7. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37

4.1. Composição química do EEP da PO1	37
4.1.1. Lignanas e precursores de lignanas	38
4.1.2. Ácidos Fenólicos	39
4.1.3. Flavonoides	40
4.2. Transporte epitelial de fenólicos da PO1 em monocamadas de células Caco-2	40
4.3. Análises Químicas das frações digeridas e não digeridas	40
4.3.1. Perfil Cromatográfico e Atividade Antioxidante on-line	41
4.3.2. Teor de fenólicos totais do extrato de própolis e frações digeridas	47
4.3.4. Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio (ERO) do extrato de PO1 e frações digeridas	52
4.4. Toxicidade por modelo <i>in vivo</i> com <i>Galleria mellonella</i>	56
5. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Digestão *in vitro* e transporte de polifenóis de própolis orgânica do Sul do Brasil por meio de células humanas Caco-2

A própolis é uma matriz resinosa e balsâmica produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* para a proteção da colmeia contra variações climáticas, patógenos e predadores. É também considerada como um alimento funcional, pois apresenta diversas propriedades bioativas, tais como atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a bioacessibilidade de polifenóis do extrato etanólico da própolis orgânica do tipo 1 (PO1) produzida no sul do Brasil. Para a realização deste trabalho foi utilizada a técnica de digestão estática *in vitro* e o transporte epitelial com o modelo de monocamada de células Caco-2. Foram também avaliadas a composição fenólica e a atividade antioxidante por meio do sequestro de radicais sintéticos e espécies reativas de oxigênio dos extratos não digerido, digerido e do transporte epitelial. Por meio da técnica de LC-ESI-QTOF-MS foram identificados 10 compostos no extrato não digerido, entre os quais as lignanas (-)-Secoisolariciresinol, Lariciresinol, Matairesinol e Balajaponina D. Foi observada uma diminuição do teor de fenólicos e atividade antioxidante do extrato etanólico com o decorrer das etapas da digestão, com exceção do sequestro do radical superóxido, em que a fração basolateral (transportada) apresentou a mesma atividade que o extrato não digerido (IC_{50} basolateral = 0,91mg/ml) ($p < 0,05$). No ensaio de toxicidade com o modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella* foi observada uma toxicidade muito baixa para o extrato etanólico não digerido (DL_{50} = 1,10g/kg). Conclui-se que a digestão possui um efeito significativo na redução da atividade antioxidante e do conteúdo de fenólicos totais desta própolis. Entretanto, o material digerido ainda apresentou atividade antioxidante mesmo após o transporte celular epitelial, sugerindo fortemente que os fenólicos presentes nesta própolis são capazes de apresentar efeitos biológicos *in vivo*, sendo que alguns deles poderiam também ser considerados marcadores de bioatividade desta própolis.

Palavras-chave Bioacessibilidade, Digestão *in vitro*, Transporte epitelial, Atividade antioxidante, Própolis, *Apis mellifera*

ABSTRACT

***In vitro* digestion and polyphenols transport of South Brazilian Organic Propolis through Caco-2 human cells**

Propolis is a resinous and balsamic matrix produced by *Apis mellifera* bee's specie with the aim to protect the hive against climatic variation, pathogens and predator's entry. However, is also considered as a functional food, because propolis has been showing many bioactive properties, like antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. Therefore, this research aimed evaluate the polyphenols bioaccessibility of an organic propolis– type 1 ethanolic extract, produced in South Brazil. To the conduct the research, the static *in vitro* digestion method and epithelial transport through Caco-2 cells monolayer was used. In this study has evaluated the total phenolic composition (TPC) and antioxidant activities synthetic radicals and reactive oxygen species in the digested, non-digested and epithelial transport extract. Through the LC-ESI-QTOF-MS technique, were identified 10 compounds in the non-digested extract, like (-)-secoisolariciresinol, lariciresinol, matairesinol and Balajaponin-D. Could be observed a decrease in the total phenolic composition and antioxidant activities in the ethanolic extract during the digestion stages, except in the superoxide scavenging capacity assay, in which the basolateral fraction (transported) showed the same capacity as the non-digested extract ($p < 0.05$) (IC_{50} basolateral = 0.91mg/ml). In the toxicity assay using *Galleria mellonella* larvae *in vivo* model, was observed a very low toxicity of the organic propolis ethanolic extract non-digested ($LD_{50} = 1,10$ g/kg). As a conclusion, the digestion has a significant decrease effect in the antioxidant activities and total phenolic composition in this propolis profile. However, the digested material still having showing antioxidant activity even after the cellular epithelial transport, suggesting strongly that the phenolic compounds present in this propolis are capable to show *in vivo* biological effects, being that some of they can be considered bioactive markers of this propolis profile.

Keywords: Bioaccessibility, *In vitro* digestion, Epithelial transport, Antioxidant activities, Propolis, *Apis mellifera*

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são ferramentas de pesquisa que têm se expandido rapidamente nos últimos anos, pois estão amplamente relacionados com diversas atividades biológicas (NEWMAN; GRAGG, 2016). Devido à baixa taxa de aprovação pela Food and Drugs Administration (FDA), no que se diz respeito às substâncias sintéticas, o interesse na busca por produtos naturais com propriedades bioativas vem ganhando cada vez mais atenção (DUTTA et al., 2019).

A própolis, produto natural produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera*, se caracteriza como um material resinoso formado a partir de cera de abelha, resinas vegetais, óleos essenciais e pólen (GUISALBERT, 1979; MARTINOTTI; RANZATO, 2015; YEUNG; ARGUELLES, 2019). Essa matéria-prima, também classificada como alimento funcional, também se insere no contexto citado acima, ou seja, um produto natural com potencial de estimular e propiciar atividades biológicas de interesse alimentar e farmacêutico.

A composição química da própolis varia de acordo com a vegetação do ambiente onde a colmeia está exposta. Além disso, as variações climáticas também impactam na diversidade desses compostos (TIVERON et al., 2016; PICCINELLI et al., 2011). Devido a essa grande heterogeneidade ambiental, diversos estudos têm mostrado a existência de compostos distintos nos extratos de própolis, os quais são responsáveis isoladamente ou em sinergismo por atividades biológicas específicas, tais como: antimicrobiana, anticâncer, antioxidantes, anticariogênicas, entre outras (HAYACIBARA et al., 2005; SILVA et al., 2016; TIVERON et al., 2016).

Dentre à grande diversidade de própolis brasileiras, está a própolis orgânica produzida no sul do país. Essa própolis é caracterizada por ser produzida em colmeias inseridas em meio à mata nativa e reserva legal, longe de plantações que utilizam agrotóxicos e/ou outros produtos da agricultura intensiva convencional. Esta própolis tem chamado a atenção de consumidores devido a seu sabor suave e presença de atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (TIVERON et al., 2016; TIVERON et al., 2020)

Apesar dos trabalhos já realizados com este perfil de própolis, ainda falta um olhar quanto a questão da bioacessibilidade e transporte epitelial em células, no sentido de entender se os compostos fenólicos e as propriedades biológicas presentes no extrato são modificadas ao longo das etapas da digestão humana. Em adição, os estudos sobre bioacessibilidade de compostos fenólicos de própolis são ainda muito escassos, sendo que apenas dois trabalhos

foram encontrados: Yesiltas et al. (2014) com própolis da Turquia e Argentina e Yen et al. (2017) com própolis marrom. Nestes dois estudos, somente foi avaliada a digestão *in vitro* dos extratos, não sendo feito nenhum ensaio de transporte com células.

Sendo assim, a avaliação da bioacessibilidade e transporte epitelial por meio de células humanas Caco-2 da própolis orgânica brasileira é um caminho interessante para se agregar valor ao produto. Por meio dos resultados gerados, novos ingredientes alimentares e alimentos funcionais podem ser desenvolvidos, haja vista que grande parte deste tipo de própolis ainda é exportada como matéria-prima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos Naturais

O Brasil é um país considerado megadiverso por abrigar aproximadamente 20% da biodiversidade de todo o planeta (GALÚCIO et al., 2019). Como resultado dessa imensa diversidade genética, o país apresenta grande potencial para a descoberta de compostos bioativos ainda inexplorados, com valores tecnológicos e econômicos para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais, bem como o desenvolvimento de fármacos (BIAZOTTO et al., 2019).

Os produtos naturais têm sido ferramentas de pesquisa importantes na atualidade, sendo que alguns já são amplamente utilizados como alimentos e/ou medicamentos em humanos e animais (NEWMAN; CRAGG, 2016). A Food and Drugs Administration (FDA) tem mostrado uma baixa taxa de aprovação de drogas sintéticas, o que motiva cada vez mais a busca por produtos naturais com propriedades bioativas (DUTTA et al., 2019).

Atualmente, e devido à adoção cada vez mais presente de um estilo de vida saudável, tem havido aumento das indústrias alimentícias em investir na produção de alimentos mais nutritivos, naturais e ricos em compostos biologicamente ativos (SANTOS-BUELGA et al., 2019). Estes alimentos são normalmente denominados de alimentos funcionais.

Segundo a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o termo “Alimentos Funcionais” é definido como sendo aquele que, baseado em comprovações através de estudos clínicos demonstraram associação entre o alimento e o benefício à saúde do consumidor. Assim, agem desempenhando papel fisiológico benéfico no crescimento, desenvolvimento e funcionamento em condições normais do organismo.

2.2. Própolis

Na busca por produtos naturais e alimentos funcionais que apresentem atividades bioativas diversas, têm-se a própolis, um material resinoso produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera*, através da coleta de resinas em fissuras e botões florais de plantas (CHEN et al., 2018; GHISALBERTI, 1979; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Para a produção da própolis, as abelhas misturam a resina coletada com cera, e então a utilizam para a proteção das colmeias contra agentes infecciosos e invasores, bem como contra mudanças bruscas de

temperatura (KORKMAZ; BILICI; KORKMAZ, 2021; OZDAL et al., 2019; ŠTURM; POKLAR ULRIH, 2020).

Diversos fatores devem ser levados em consideração no que se diz respeito à composição química das própolis. Entretanto, ela comumente é constituída por 50% bálsamo e resina de plantas, 30% cera de abelha, 10% óleos essenciais e aromáticos, 5% pólen e 5% outras moléculas orgânicas e/ou inorgânicas (OZDAL et al., 2019; ŠTURM; POKLAR ULRIH, 2020).

A própolis pode apresentar diferentes colorações (verde, vermelho, marrom, amarelo etc) e distintos aromas, o que é função das condições do ambiente em que a colmeia está exposta, bem como aos materiais orgânicos coletados de diferentes plantas durante a sua elaboração (PARK et al., 2002).

A variação da composição química das própolis está diretamente relacionada com a localização geográfica em que as colmeias estão inseridas (ALVARENGA et al., 2020; POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019). Fatores como características climáticas, sazonalidade e altitude do local influenciam na composição da flora nativa, e consequentemente na delimitação da origem botânica das resinas que serão coletadas para a elaboração da própolis. Como exemplo, a própolis verde brasileira é oriunda da resina da planta *Baccharis dracunculifolia* (PARK et al., 2004), enquanto que na própolis vermelha as abelhas usam principalmente a resina de *Dalbergia ecastophyllum* (L) e *Symphonia globulifera* L.f. (SILVA et al., 2008; CCANA-CCAPATINTA et al., 2020).

Utilizada há séculos na medicina popular, e mais recentemente em indústrias alimentícias de alimentos e bebidas (OLDONI et al., 2011), a própolis possui compostos bioativos responsáveis por prover benefícios à saúde de seus consumidores, como por exemplo propriedades antimicrobianas (AL-WAILI et al., 2012; BUENO-SILVA et al., 2017; FREIRES et al., 2016; POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; TIVERON et al., 2016), antivirais (AMOROS et al., 1992a; BERRETTA et al., 2020; ITO et al., 2001; REFAAT et al., 2020), antioxidantes (MOUHOUBI-TAFININE; OUCHEMOUKH; TAMENDJARI, 2016; OLDONI et al., 2011; POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; TIVERON et al., 2016; WOŹNIAK et al., 2019), anti-inflamatórias (BUENO-SILVA et al., 2013, 2015; FRANCHIN et al., 2016; TIVERON et al., 2016), anticâncer (ACIKELLI et al., 2013; FRANCHI et al., 2012; PINA et al., 2017) e antiparasitária (PINA et al., 2017; REBOUÇAS-SILVA et al., 2017; SILVA et al., 2021).

Estudos já têm também mostrado que alguns compostos encontrados nas própolis, quando utilizados de maneira isolada, não apresentam atividades biológicas tão pronunciadas

quanto quando em conjunto com os demais compostos, havendo assim um efeito sinérgico (AMOROS et al., 1992b; CHEN et al., 2018)

Dentre os compostos bioativos mais comuns nas própolis estão os polifenóis, que incluem os terpenos, lignanas, cumarinas, flavonoides, derivados do ácido cinâmico, entre outros (ALVARENGA et al., 2020; OLDONI et al., 2015; OZDAL et al., 2019; TIVERON et al., 2016). Já foram relatados mais de 420 compostos químicos na própolis, sendo que uma amostra de própolis tem em média entre 80-100 compostos químicos que são responsáveis por caracterizar o perfil em relação às propriedades benéficas que ela apresenta (ŠTURM; POKLAR ULRIH, 2020).

2.2.1. Própolis Orgânica

O uso de pesticidas, herbicidas e fungicidas na agricultura, além de afetar diretamente a população de abelhas, também podem ser contaminantes nos derivados apícolas, como é o caso da própolis, sendo que a quantidade e frequência desses contaminantes ainda não é bem conhecida (ALVARENGA et al., 2020).

Dentre as própolis produzidas no sul do Brasil, se insere a própolis orgânica certificada, a qual é obtida de colmeias inseridas em mata nativa e reserva legal, longe de plantações que utilizam agrotóxicos e/ou outros produtos da agricultura intensiva convencional. Esta própolis, pouco estudada, tem chamado a atenção devido a seu sabor suave e fortes atividades biológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (TIVERON et al., 2016).

Estudos com as própolis orgânicas do sul do país mostraram a existência de 7 perfis cromatográficos distintos (PO1-PO7) (TIVERON et al., 2016), e uma grande diversidade de fitoquímicos (NANI et al., 2020). Devido à grande variedade de plantas no ambiente em que as colmeias estão inseridas, a origem botânica dessas própolis ainda é pouco conhecida (TIVERON et al., 2020).

Apesar de não possuírem altos teores de flavonoides, as própolis orgânicas do sul do país apresentam atividades antioxidantes, como é o caso da PO1 (Própolis Orgânica do tipo 1) que possui alta capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio (TIVERON et al., 2020). De acordo com Tiveron et al. (2020), lignanas e precursores de lignanas isoladas da PO1 podem ser utilizadas como marcadores desta própolis. Segundo esses autores, (+)-

lariciresinol, (-)-secoisolariciresinol, (-)-matairesinol e Balajaponina D são os principais marcadores químicos desta própolis.

2.3. Processos Oxidativos e Espécies Reativas

Espécies reativas são moléculas ou fragmentos moleculares que possuem alta reatividade, o que é função da presença de um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais externos de determinados átomos (POPRAC et al., 2017). São comumente conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

As espécies reativas de oxigênio não são exclusivamente denominadas como “radicais livres”, apesar do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) apresentarem-se como tal, elas podem também se apresentar como moléculas, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GLASAUER; CHANDEL, 2013; LUSHCHAK, 2014; MUNNÉ-BOSCH; PINTÓ-MARIJUAN, 2016).

A formação endógena de ERO ocorre em sua maior parte nas mitocôndrias, organelas responsáveis pela produção de ATP através da cadeia transportadora de elétrons. Isso se deve a probabilidade de ocorrer o escape de elétrons que estão sendo transportados pelos sítios enzimáticos durante o processo de fosforilação oxidativa. O escape de elétrons possibilita o encontro destes com moléculas de oxigênio livres, formando um ânion superóxido, que pode se transformar nas demais ERO (LUSHCHAK, 2014).

Entretanto, os organismos possuem mecanismos regulatórios que visam manter os níveis de ERO baixos. Assim existem controles entre a produção e a eliminação das espécies reativas, como por exemplo, a ação da enzima superóxido desmutase, que catalisa a reação entre ânions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e prótons de hidrogênio (H^+) para a produção de gás oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que então, através da ação da enzima catalase, produz água (H_2O) e gás oxigênio (O_2) (LUSHCHAK, 2014) (Figura 1).

Figura 1: Reações químicas desenvolvidas pelo organismo como mecanismos regulatórios contra o estresse oxidativo (adaptado de LUSHCHAK, 2014).

A presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, quando em concentrações moderadas, podem apresentar papéis importantes no funcionamento do organismo. Elas podem atuar como mensageiros secundários para ativação de enzimas que irão atuar no processo de regulação intracelular para transdução de estímulos (DAENEN et al., 2018).

Entretanto, alguns fatores podem provocar a insuficiência no controle dos níveis de espécies reativas pelo organismo, fazendo com que haja um aumento na concentração destas. Esse aumento desregulado pode provocar o chamado “Estresse Oxidativo”, que dá início à algumas reações prejudiciais ao organismo, como o rompimento das membranas lipídicas, desnaturação de proteínas e consequentes danos aos ácidos nucleicos (MUNNÉ-BOSCH; PINTÓ-MARIJUAN, 2016).

O aumento e a desregulação nos níveis de espécies reativas presentes no organismo devem-se a diversos fatores endógenos e exógenos. Como exemplo, podemos citar a exposição do organismo em locais com elevados níveis de radiação, condições de estresse constante, o uso de drogas e a exposição a ambientes com altos níveis de poluição do ar e água. Além de todos esses fatores, a adoção de dietas ricas em gorduras que contribuem para obesidade geram um constante estado inflamatório que resulta na produção desregulada de ERO's devido a ativação de células do sistema imunológico (CHAINY; SAHOO, 2020; DAENEN et al., 2018; TAN; NORHAIZAN, 2019).

Contudo, existem os antioxidantes, compostos que possuem a função de neutralizar ou diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo a fim de promover a homeostase. Ou seja, eles atuam impedindo um desbalanço que possa ocasionar condições de estresse oxidativo no organismo (ALKADI, 2018; ISMAEEL et al., 2019).

Esses compostos antioxidantes podem ser de origem endógena ou exógena. Os de origem endógena são classificados como enzimáticos (ex. glutathione peroxidase e superóxido desmutase) e não enzimáticos. Enquanto os antioxidantes de origem exógena podem ser comumente obtidos por meio da dieta (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; ALKADI, 2018; SIDDEEG et al., 2020), o que inclui compostos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitaminas e minerais (HE et al., 2017; NEHA et al., 2019).

As atividades apresentadas pelos compostos antioxidantes diferem em relação à forma com que interagem com as espécies reativas (ARUOMA, 2003). Estas podem ocorrer pela inibição da síntese de radicais livres, pela captura dos radicais para que não haja reações em cadeia e consequente desbalanço na concentração de espécies reativas e através da restauração dos elétrons desemparelhados nos orbitais das moléculas dos radicais (NEHA et al., 2019).

Diversos produtos naturais se apresentam como fontes promissoras contra o estresse oxidativo, devido à grande diversidade de compostos antioxidantes com capacidade para desativar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SIDDEEG et al., 2020). Sendo assim, a suplementação alimentar utilizando fontes ricas em compostos antioxidantes apresentam diversos benefícios a saúde, incluindo a prevenção de doenças, como por exemplo o câncer e doenças neurodegenerativas (YANG et al., 2018).

A busca por compostos antioxidantes oriundos de produtos naturais tem também se destacado pelo fato de que alguns antioxidantes sintéticos apresentaram atividades nocivas à saúde humana (OLSZOWY, 2019; SIDDEEG et al., 2020). Sendo assim, diversos metabólitos secundários de plantas, como por exemplo os compostos fenólicos, têm sido apontados como potenciais substitutos dos antioxidantes sintéticos (ARUOMA, 2003; OLSZOWY, 2019).

De qualquer forma, para que esses compostos possam de fato ser benéficos à saúde, após o processo de digestão eles precisam estar biodisponíveis, ou seja, serem eficientemente absorvidos para que possam exercer suas funções antioxidantes nos órgãos específicos (YANG et al., 2018). Assim, não basta somente que estes compostos apresentem atividade antioxidante nos extratos brutos, mas que esta resista ao processo de digestão e absorção pelas células do epitélio intestinal (ARUOMA, 2003).

2.4. Compostos Fenólicos

Os organismos pertencentes aos reinos Plantae e Fungi possuem a capacidade de produzirem os chamados metabólitos secundários (MULLER et al., 2019), que caracterizam-se como compostos orgânicos responsáveis por auxiliar no desenvolvimento, crescimento e proteção desses organismos. Sendo assim, esses compostos atuam, como exemplo, contra a herbivoria, entrada de organismos patogênicos e na inibição do crescimento de plantas que sejam potenciais concorrentes na disponibilidade de nutrientes (RAMAKRISHNA et al., 2021).

Dentre esses metabólitos secundários se insere a classe de compostos fenólicos, um grupo amplo de moléculas com a principal função de proteger a planta contra situações de estresse oxidativos ocasionados pela incidência de radiação ultravioleta e entrada de organismos patogênicos. Esta classe de compostos também é responsável pela pigmentação e aroma das plantas e frutos (BODOIRA; MAESTRI, 2020; KUMAR; GOEL, 2019; MULLER et al., 2019).

Os compostos fenólicos são muito heterogêneos e devido a isso, eles são subdivididos em classes, sendo as cinco principais conhecidas como: ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, taninos e estilbenos (BODOIRA; MAESTRI, 2020; GE; LI; LISAK, 2020; MULLER et al., 2019).

A classificação, assim como as propriedades que possuem, são decorrentes da sua estrutura química. De forma geral, os compostos fenólicos contêm um anel aromático com um número variável de ligações hidroxila (-OH), podendo ir de moléculas simples, até a formação de macromoléculas (GE; LI; LISAK, 2020; KUMAR; GOEL, 2019).

Essa classe de compostos tem chamado muito a atenção das indústrias de alimentos e até das farmacêuticas, devido ao potencial bioativo destas moléculas, com destaque a atividade antioxidante (GE; LI; LISAK, 2020; KUMAR; GOEL, 2019; LIU et al., 2019).

Diversos alimentos de origem vegetal ricos em compostos fenólicos podem ser comumente encontrados nas dietas, como por exemplo, frutas, cafés e chás (MULLER et al., 2019). Dentro dessa diversidade de produtos naturais, o extrato da própolis se mostra como um alimento funcional rico em compostos fenólicos que propicia benefícios à saúde humana.

Portanto, torna-se muito importante entender como esses polifenóis interagem com outros constituintes da matriz alimentar e se existem perdas, bem como se estes mantêm suas propriedades bioativas após o processo de digestão (GRANATO; MOCAN; CÂMARA, 2020).

2.5. Biodisponibilidade, bioacessibilidade e bioatividade

Biodisponibilidade é um termo que foi criado pela Food and Drug Administration (FDA-EUA), o qual objetiva estabelecer farmacologicamente a proporção em que uma substância ativa em determinada concentração poder ser absorvida pelo organismo a fim de se tornar disponível em seu sítio de ação. Três aspectos principais devem ser levados em consideração no estudo de biodisponibilidade, são eles: bioconversão, bioeficácia e bioeficiência. A bioconversão diz respeito à quantidade de determinado nutriente que foi consumido e que estará biodisponível para sua conversão bioativa no organismo. A bioeficácia é a quantidade de determinado nutriente consumido que foi de fato convertido em sua forma bioativa. E por fim, a bioeficiência é a proporção em que o composto bioativo, convertido do nutriente consumido, foi absorvido e atingiu seu sítio de ação (COZZOLINO, 2016).

Estudos apontam que a biodisponibilidade de nutrientes está diretamente associada com a bioacessibilidade destes. Esta última se relaciona com a eficiência em que a matriz alimentar pode ser quebrada e hidrolisada por enzimas durante o processo de digestão a fim de favorecer a forma de absorção desses nutrientes (MARZE, 2017). Assim, a estrutura da matriz alimentar é um importante fator na consideração da bioacessibilidade, transformação e excreção dos nutrientes que a constituem, tornando-os efetivamente biodisponíveis em seus sítios ativos (CĂLINOIU; VODNAR, 2018).

Valores de componentes nutricionais e bioativos presentes em matrizes alimentares comumente encontrados em bancos de dados podem se apresentar de forma superestimada. Portanto, devem ser realizados estudos para validação e determinação da proporção em que esses compostos estarão biodisponíveis ou ao menos bioacessíveis após o consumo (BARBA et al., 2017). Esses valores determinarão a bioatividade do composto em questão, que representa o efeito dessa substância em contato com seu sítio ativo, permitindo a interpretação da resposta fisiológica que será desenvolvida, como por exemplo, atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014).

Em relação à biodisponibilidade de compostos fenólicos presentes em matrizes alimentares, sabe-se que é necessário haver hidrólise por enzimas digestivas ou por atuação da microflora intestinal para que estes possam ser eficientemente absorvidos (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). Entretanto diversos outros fatores devem ser levados em consideração ao se tratar da biodisponibilidade, como por exemplo, o tamanho das moléculas, o equilíbrio em meios hidrofílicos e lipofílicos, transformações em relação às mudanças de pH durante o processo digestivo, e a interação entre os diferentes compostos presentes na matriz alimentar (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020).

Estudos de biodisponibilidade podem ser realizados utilizando modelos de cultura de células (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007), amostras de urina, sangue, entre outros (CĂLINOIU; VODNAR, 2018). Já os estudos de bioacessibilidade podem ser realizados *in vitro* através da simulação dos processos digestivos, utilizando modelos estáticos ou dinâmicos (BRODKORB et al., 2019; CĂLINOIU; VODNAR, 2018; MARZE, 2017).

Em relação ao uso de culturas celulares para ensaio de biodisponibilidade, a linhagem de células Caco-2, obtidas de adenocarcinoma de cólon humano, vêm sendo proposta como um promissor modelo de transporte epitelial de compostos por diversos autores (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007; LI et al., 2021; VILLALVA et al., 2018). Por se tratarem de células que quando cultivadas em monocamadas possuem a

funcionalidade de se diferenciarem em células semelhantes aos enterócitos, com microvilosidades na região apical, as células Caco-2 se comporta como potenciais células absorptivas (LI et al., 2021).

Assim como os enterócitos (Figura 2), as células Caco-2 apresentam juntas oclusivas intercelulares que também influenciam no processo de absorção. Quanto mais próximas as células estão, mais estreitos se tornam os espaços paracelulares e, conseqüentemente, a permeabilidade absorptiva de compostos que atravessam os espaços intermembranas diminuí, favorecendo o transporte transcelular e a integridade da membrana (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007; JOCHEMS et al., 2018).

Figura 2: Esquema de transportes Paracelular e Transcelulares para absorção de substâncias por enterócitos que constituem a parede do intestino delgado (Arquivo próprio).

Geralmente as células Caco-2 desempenham quatro tipos de transporte celular de nutrientes para serem absorvidos, são eles: difusão passiva, transporte paracelular, transporte transcitose e endocitose (IFTIKHAR et al., 2020).

Para a condução do ensaio de transporte celular de compostos obtidos na fase bioacessível, utiliza-se um modelo de cultivo de monocamada celular em placas com membranas porosas e semipermeáveis do tipo Transwell®. Essa membrana porosa funciona como mediadora do efluxo de compostos da fase apical (fase bioacessível) para a fase basolateral (compostos absorvidos pela parede celular) (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007). Este ensaio é considerado adequado para a avaliação da manutenção da capacidade antioxidante de alimentos funcionais e produtos naturais após o processo de digestão e transporte celular (IFTIKHAR et al., 2020).

Entretanto, existem algumas limitações no uso de células Caco-2 para estudos de absorção, como por exemplo, o fato das células serem estáticas quanto comparadas à parede intestinal, que está sempre realizando o movimento de peristaltismo; o espaço intercelular apresentado pelas juntas oclusivas é relativamente menor ($5\text{\AA}$) que o real espaço tido entre os enterócitos ($8\text{-}13\text{\AA}$); demasiado tempo para estabilizar a diferenciação da célula em modelos de enterócitos (21 dias) e o tempo de integridade relativamente curto das células (7 dias), considerando que seu fenótipo é alterado a cada dia (TAVELIN, 2003). Entretanto, algumas dessas limitações podem ser evitadas de acordo com as condições de cultivo.

Sendo assim, apesar de algumas limitações, o modelo de transporte epitelial *ex vivo* utilizando células Caco-2 se demonstra conveniente para estudos das propriedades funcionais apresentadas por extratos de alimentos e produtos naturais (IFTIKHAR et al., 2020).

2.6. *Galleria mellonella* como um bioindicador

Experimentos para a predição de doses resposta, toxicidade de compostos, e estudos farmacológicos com mamíferos estão se tornando cada vez mais restritos e burocráticos por diversas razões éticas e sociais. Sendo assim, novos modelos alternativos estão sendo desenvolvidos como potenciais propostas para substituição do uso de mamíferos, com exceção aos camundongos (FREIRES et al., 2017).

Assim, o modelo experimental *in vivo* utilizando larvas da espécie *Galleria mellonella* está sendo utilizado para diversos testes como de toxicidade, farmacocinética de antimicrobianos, virulência e patogenicidade (ALLEGRA et al., 2018; DA CUNHA et al., 2020; FREIRES et al., 2017; MOYA-ANDÉRICO et al., 2021; SARDI et al., 2017).

As larvas de *G. mellonella* são uma importante ferramenta de estudo devido ao fato de possuírem alguns aspectos de complexidade similares aos de mamíferos, como por exemplo, a imunidade inata, e também por não necessitarem de aprovação de comitês de ética para uso (ALLEGRA et al., 2018; FREIRES et al., 2017). Além de que, são de fácil manejo, não necessitam de infraestruturas complexas para seu cultivo e desenvolvimento, e são de baixo risco no que se diz respeito a biossegurança do manejo e uso em experimentos (MOYA-ANDÉRICO et al., 2021).

Estudos têm sido feitos para a determinação da dose letal que mata 50% dos organismos (DL_{50}) de extratos de frutas e própolis, o que possibilita a extrapolação dos resultados obtidos para valores em humanos (DA CUNHA et al., 2020; LAZARINI et al.,

2018; NANI et al., 2020; SOARES et al., 2019). Deste modo, a adoção do modelo experimental com *G. mellonella* tem se mostrado promissor para ensaios *in vivo* que resultem em dados relevantes para as pesquisas de toxicidade de alimentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma abaixo (Figura 3) representa um resumo das atividades realizadas neste trabalho, as quais estão na sequência descritas em detalhes.

Figura 3: Fluxograma das atividades desenvolvidas no estudo da PO1.

3.1. Coleta de amostras de Própolis Orgânica

A amostra de própolis orgânica do tipo 1 (PO1), classificadas de acordo com Tiveron et al. (2016), foi coletada na região do Sul do Paraná. Esta própolis atende as normas de certificação internacional NOP (USDA) e CEE (europeia) (processo nº 23511) e Brasil Orgânico (processo nº 11-0030.11). Após chegar ao laboratório a amostra foi limpa manualmente para remoção de impurezas, trituradas utilizando um moinho analítico e, então, armazenada em freezer à -18°C.

|3.2. Preparo de extrato etanólico de Própolis Orgânica

Foram pesados 10 gramas da própolis triturada e acrescidos à 125 ml de etanol 80% (etanol/água) em balão volumétrico de 250 ml. Em sequência a amostra foi submetida ao tratamento com temperatura em banho-maria à 70°C, com agitação, por 30 minutos. As amostras foram então armazenadas em freezer à -20°C, durante 12 horas, para a decantação das ceras, e em seguida, passaram por um processo de filtração.

O sobrenadante obtido foi denominado de extrato etanólico de própolis (EEP). Ao resíduo resultante foi feita mais uma extração, de acordo com as condições descritas acima. Os EEP das duas extrações foram reunidos, evaporados sob baixa pressão e na sequência liofilizados, para se obter o extrato liofilizado de própolis (ELP), o qual foi armazenado à -20°C e utilizado nas próximas etapas experimentais.

|3.3. Digestão gastrointestinal *in vitro*

A digestão gastrointestinal *in vitro* do extrato liofilizado da própolis (ELP) foi realizada de acordo o protocolo proposto pela rede COST Action INFOGEST FA1005 (BRODKORB et al., 2019). Este modelo consiste de 3 fases: oral, gástrica e intestinal, as quais utilizam respectivamente, os fluidos sintéticos salivar (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF), além de suas respectivas enzimas (Figura 4).

Figura 4: Esquema da digestão *in vitro* da própolis orgânica utilizado no estudo (Arquivo próprio).

Para início do ensaio de digestão *in vitro* foram adicionados 2.5 gramas de ELP em 9 tubos de ensaio para digestão em triplicata de cada fase (oral, gástrica e intestinal). Foram também utilizados tubos controles, sendo três contendo a amostra de ELP com os respectivos fluidos digestivos de cada fase sem as enzimas e os outros três de controle negativo, contendo apenas os fluidos digestivos de cada fase com as respectivas enzimas (sem amostra). Os tubos controle foram submetidos às mesmas condições experimentais que os respectivos tubos das fases da digestão.

Inicialmente, em cada tubo de ensaio foi adicionado fluido salivar (SSF), CaCl_2 e amilase salivar (com exceção aos controles de amostra sem enzima, em que se adicionou água destilada no mesmo volume da enzima). O pH foi corrigido para 7,0 e os tubos foram incubados à 37°C, com agitação leve, por 2 minutos. Foram retirados 5 tubos ao final dessa etapa, sendo denominados digeridos da Fase Oral (triplicata) com seus respectivos controles (sem enzima e sem amostra).

Em seguida, foi adicionado fluído gástrico nos tubos que seguiram o processo de digestão, juntamente com CaCl_2 e pepsina (com exceção aos 2 tubos de controle de amostra sem enzima, que receberam água destilada no mesmo volume). O pH foi corrigido para 3,0 e os tubos foram incubados à 37°C, com agitação leve, por 2 horas. Foram retirados 5 tubos ao final dessa etapa, incluindo seus respectivos controles, sendo denominados digeridos da Fase Gástrica (triplicata).

Por fim, nos últimos 5 tubos que seguiram o ensaio de digestão, foram adicionados fluído intestinal, CaCl_2 , sais de bile e pancreatina (com exceção ao controle de amostra que ao invés de sais de bile e pancreatina recebeu água destilada no mesmo volume). O pH foi corrigido para 7,0 e os tubos foram incubados à 37°C, com agitação leve, por 2 horas.

Após a digestão, os tubos correspondentes às fases gástrica e intestinal (fração bioacessível) foram centrifugados à 10.000 xg por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes coletados foram armazenados a temperatura de -80°C, até o momento das análises subsequentes. Somente a fração bioacessível (fase intestinal) foi utilizada para a etapa seguinte de transporte epitelial em células Caco-2.

|3.4. Avaliação do transporte epitelial em sistema de células humanas Caco-2

|3.4.1. Cultivo de células Caco-2

Células humanas intestinais de adenocarcinoma de cólon, Caco-2, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC® HTB-37™) foram cultivadas de acordo com o protocolo de Hubatsch; Ragnarsson; Artursson (2007).

Para o cultivo foi utilizado o meio Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium (DMEM), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (solução 100x) e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (estreptomicina (10.000U/mL estreptomicina- 10mg/mL penicilina – solução 100x), em uma atmosfera com 5% de CO_2 , à 37 °C. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas durante período de tempo para que as células atingissem 70-80% de confluência. Quando essa porcentagem de ocupação da garrafa de cultivo era atingida, tornava-se necessária a realização de subcultivos através do processo de tripsinização. Esse processo foi realizado para obtenção da passagem adequada das células e diminuição na formação de multicamadas celulares, para torná-las adequadas ao cultivo em placas *transwell* que foram utilizadas no ensaio de transporte epitelial.

3.4.2. Cultivo de células para ensaio de transporte

Para o ensaio de transporte, as células Caco-2 cultivadas de acordo com o tópico anterior, com passagem 20, foram semeadas em poços de placas *Transwell*® (poro de 0,4 µm, inserts de 24 mm diâmetros, Corning Life Sciences, Acton, USA). Foi utilizada uma densidade de 3×10^5 células por *insert*, contendo meio DMEM nos compartimentos (apical e basolateral) e mantidas em incubação a 37°C e umidade relativa de 90%, por um período de 21 dias, até a formação de monocamadas celulares (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

3.4.3. Teste de viabilidade celular

A concentração da fase intestinal aplicada no compartimento apical da placa *Transwell*, para o ensaio de transporte transepitelial, foi pré-determinada pelo ensaio de viabilidade celular utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), de acordo com a metodologia proposta por Shappell (2003).

Células Caco-2 cultivadas previamente foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 10^4 células/poço e incubadas por um período de 21 dias à 37°C, com trocas de meio a cada 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi completamente removido e substituído por um novo meio contendo DMEM sem soro bovino fetal, sendo então as células tratadas com a fração bioacessível (fase intestinal) em diferentes concentrações. Na sequência as placas foram incubadas por 4 h a 37°C. Os controles foram preparados seguindo o mesmo procedimento. Em seguida, 20µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados e as placas incubadas a 37°C por 3 horas, na ausência de luz. Após isto, o meio contendo MTT foi removido completamente e o composto formazan produzido foi solubilizado em DMSO (100µL/poço). Na sequência foi realizada a medida da absorbância em espectrofotômetro à 570 nm, para a determinação da porcentagem de viabilidade celular em função das diluições feitas a partir da fase intestinal.

3.4.4. Ensaio de transporte em células Caco-2

O estudo de transporte foi realizado de acordo com Hubatsch; Ragnarsson; Artursson (2007).

No 21º dia de cultivo em placas *Transwell*, as células Caco-2 foram lavadas com a solução balanceada de Hank's (HBSS), suplementada com 25 mM de HEPES (tampão de permeabilidade), pH 7,4 a 37°C. Neste momento houve também a medição da resistência elétrica transepitelial (RET), sendo considerados adequados para o experimento os poços que apresentaram resistência acima de 165 Ω/cm^2 (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

Com o resultado da análise de viabilidade celular (MTT), uma alíquota de 1,5 mL da fase intestinal obtida no ensaio de digestão *in vitro*, diluída em HBSS foi adicionada ao compartimento apical. Uma alíquota de 2,6 mL de HBSS foi também adicionada ao compartimento basolateral. A placa *transwell* foi então incubada à 37°C, sob leve agitação por um período de 4 horas. Após o período de 4 horas de transporte, as fases apical e basolateral foram coletas e armazenadas separadamente em tubos falcon à -80°C para uso nas análises posteriores. Ao final do experimento o valor de RET foi reavaliado para verificar a integridade da monocamada celular. O experimento foi conduzido em triplicata com 6 repetições.

3.5. Análises química e biológicas do extrato de própolis, fases da digestão e frações do transporte epitelial

3.5.1. Espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS)

O Extrato etanólico de própolis (EEP) foi submetido à análise de composição fenólica por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS). O sistema utilizado foi composto por um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Co, Tokyo) equipado com uma bomba quaternária LC-30AD, detector de arranjo de fotodiodos (PDA) SPD-20 A e um auto injetor SIL-30AC. Foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução (MAXIS 3G – Bruker Daltonics; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI) no modo negativo (SOARES et al., 2019). A análise dos dados foi realizada utilizando o software MAXIS 3G – Bruker Daltonics 4.3, e a identificação dos compostos foi feita por comparação das massas exatas, espectro de massas MS/MS e fórmulas moleculares encontradas, com referências disponíveis na literatura.

3.5.2. Teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Al-Duais et al. (2009), adaptado para micro volumes. Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 μL da amostra a ser testada, sendo elas EEP, fases da digestão (gástrica e intestinal) e frações do transporte epitelial (apical e basolateral). Em seguida, 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu 10% em água foi adicionado e, após 5 minutos, 75 μL da solução de carbonato de potássio 7,5% foi acrescido aos poços. Após a incubação por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em leitora de microplacas, à 740 nm. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expresso em equivalentes ao ácido gálico (EAG), calculado utilizando uma curva de calibração de 20 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e expressas em mg de EAG/g de extrato de própolis.

3.5.3. Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi feita de acordo com o procedimento descrito por Al-Duais et al. (2009). Para geração da solução-mãe do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, foi acrescentado 88 μL de persulfato de potássio 140mM em 5ml de solução ABTS 7mM, deixando reagir ao abrigo de luz por 24 horas. Após esse período, a solução trabalho do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi preparada com a diluição da solução mãe em tampão fosfato de potássio (75mM e pH 7.4) corrigida para uma absorbância de 0.7 ± 0.02 à 734nm. Na sequência, em cada poço da microplaca foram adicionados 220 μL da solução-trabalho $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e 20 μL dos extratos a serem analisados (EEP, fases da digestão e frações do transporte epitelial). Na sequência, a placa foi agitada e mantida ao abrigo de luz durante 6 minutos. A absorção foi medida em uma leitora de microplacas à 734 nm. Foi feita uma curva analítica padrão utilizando diluições de Trolox (12,5-200mM) e os resultados de cada amostra foram feitos em triplicata e expressos em mg TEAC/g de extrato de própolis.

3.5.4. Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power)

A atividade antioxidante pelo método de redução do ferro foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Kukic et al. (2008), com algumas modificações para análise em leitora de microplacas. A análise consiste em através dos compostos antioxidantes (redutores) presentes na amostra a ser testada, reduzirem o complexo Fe^{3+} /TPTZ (tripiridiltrazina) formado na reação da análise, em Fe^{2+} /TPTZ com condições de meio acidificado. Essa reação resulta em uma coloração azul intensa podendo ser detectada por absorbância à 595nm em leitora de microplacas. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise através da mistura de 25 ml de tampão acetato (300mM e pH 3.6), 2.5ml da solução TPTZ (10mM de TPTZ em 40mM de HCl) e 2.5ml de FeCl_3 (20mM) em solução aquosa. Em cada poço da microplaca foram adicionados 20 μL da amostra a ser testada, sendo elas EEP, fases da digestão (gástrica e intestinal) e frações do transporte epitelial (apical e basolateral), 30 μL de água destilada e 200 μL do reagente FRAP. A placa foi incubada à 37°C por 30 minutos e então realizada a leitura de absorbância à 595nm. Para realização de uma curva analítica padrão utilizou-se diluições de sulfato ferroso (SF) (100-700 μM) e os resultados das amostras, feitos em triplicata, foram expressos em mg de SF/g de extrato de própolis.

3.5.5. Atividade antioxidante online por CLAE-FR com o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

A análise foi realizada de acordo com a metodologia proposta por (Koleva; Niederlander; Van Beek (2001), com algumas modificações. O método consiste em analisar de forma online e momentânea os compostos separados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) quanto as suas capacidades de sequestrar o radical livre $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Para a realização da análise, foi utilizado o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ 7mM previamente preparado e diluído em metanol 100% para ajuste de absorbância de 0.70 ± 0.02 à 734nm. O radical reagiu com os compostos presentes nas amostras analisadas, separados pós-coluna cromatográfica durante aproximadamente 1 minuto. As amostras submetidas à essa análise foram o EEP, fases gástrica e intestinal e frações apical e basolateral. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,22 μm antes da injeção de alíquotas de 40 μL no cromatógrafo.

A reação ocorreu da seguinte forma: os compostos separados por cromatografia líquida de alta eficiência foram primeiramente detectados pelo detector de arranjo de fotodiodo (DAD – SPD-M10AVp, Shimadzu Co). Após a eluição desses compostos da coluna cromatográfica ODS – A (Fase Reversa-18, de 4,6 x 250mm, com partículas no tamanho de 5 μm) a reação com o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ocorreu no *coil* (15m x 0.25mm i.d. PEEK tubing). A

análise da perda da coloração azul do radical, em consequência da intensidade do sequestro destes pelos compostos, foi detectada por um detector de UV-Vis (SPD-20 AV, Shimadzu Co) à 734nm, resultando na formação de picos negativos. O método utilizado para realização do perfil cromatográfico foi proposto por Tiveron (2015) e consistiu no uso da fase móvel A: água/ácido acético (95,5%/0,5% v/v) e fase móvel B: metanol 100%. A corrida teve o total de 120min e o gradiente de eluição aumentou gradativamente conforme a tabela 1:

Tabela 1: Gradiente de eluição utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência – fase reversa

Gradiente Fase A	Gradiente Fase B	Tempo inicial	Tempo final
70%	30%	0 min	15 min
60%	40%	15 min	30 min
50%	50%	30 min	45 min
40%	60%	45 min	65 min
25%	75%	65 min	95 min
10%	90%	95 min	105 min
70%	30%	105 min	120 min

Os resultados obtidos foram analisados pelo software Class-VP e expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox, por meio da utilização de uma curva de calibração com concentrações entre 12,5 a 200mM.

3.5.6. Sequestro do radical peroxila (ROO[•])

A capacidade de sequestro do radical peroxila (ROO[•]) foi determinada monitorando-se o efeito dos extratos no decaimento da fluorescência, gerada pela oxidação da sonda “fluoresceína” induzida pela presença do radical ROO[•], de acordo com a metodologia descrita por Melo et al. (2015). Inicialmente foi preparada uma solução da sonda fluoresceína 508,25nM em tampão fosfato de potássio (75mM e pH 7.4), e solução de 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 76mM também em tampão fosfato de potássio (75mM e pH 7.4).

Para a reação, em cada poço da microplaca foram adicionados 20μL da amostra a ser analisada (EEP, fases gástrica e intestinal e fração basolateral), 60μL da solução de fluoresceína 508,25nM e 110μL de AAPH 76mM. A leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) foi ajustada a 37°C para realização da

leitura. A mesma foi ajustada para o modo cinética, sendo as leituras realizadas a cada minuto, durante duas horas, em modo fluorescência, com emissão de 528nm e excitação de 485nm. Foi utilizada uma curva padrão de Trolox (12,5-400mM), sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol Trolox/mg extrato}$. As amostras foram analisadas em triplicata.

3.5.7. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos sobre a oxidação de dihidrorodamina (DHR) para rodamina 123, induzida pelo ácido hipocloroso, como o descrito por Melo et al. (2015). Inicialmente foi preparado o HOCl utilizado na reação com uma solução de 1% de cloreto de sódio (NaOCl) ajustada para um pH 6.2 através do uso de ácido sulfúrico 10% (H_2SO_4). Para correção da concentração da solução de HOCl, utilizou-se tampão fosfato (100mM e pH 7.4) e a medida de absorbância à 235nm utilizando a absorbtividade molar de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para cálculo, objetivando a obtenção de uma solução de 5 μM de HOCl (solução trabalho) pela lei de Lambert-Beer. A sonda de DHR foi diluída no momento da análise para a concentração de 1.25 μM utilizando tampão fosfato (100mM e pH 7.4). Para a análise, foram testadas diversas diluições das amostras (EEP, fases gástrica e intestinal e fração basolateral) adicionadas aos poços da microplaca, juntamente com tampão fosfato (100mM e pH 7.4), DHR 1.25 μM e HOCl 5 μM . Por meio da leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), com temperatura ajustada à 37°C, no modo fluorescência e comprimentos de onda de emissão 528nm e excitação 485nm, a leitura foi feita imediatamente após a adição de todas as soluções nos poços da microplaca, totalizando 300 μL por poço. Os resultados, em triplicata, foram expressos em IC_{50} (mg/mL).

3.5.8. Ensaio de sequestro do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

O radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi gerado pelo sistema NADH/PMS. A capacidade de sequestro do $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos sobre a redução do nitroazul de tetrazólio (NBT), formado pelo radical superóxido, de acordo com Melo et al. (2015). Inicialmente foi preparada uma solução tampão fosfato de potássio (19mM e pH 7.4). Os seguintes reagentes, nas determinadas concentrações, foram diluídos no tampão fosfato de

potássio para uso no ensaio de sequestro do radical superóxido: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (166 μ M), NBT (107,5 μ M), fenazina metassulfato (PMS) (2,7 μ M). As amostras analisadas (EEP, fase gástrica, intestinal e fração basolateral) também foram diluídas em tampão fosfato de potássio em diferentes concentrações. Os reagentes e as amostras foram pipetadas em microplaca totalizando 300 μ L por poço. Utilizando uma leitora de microplacas SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA), com temperatura ajustada à 25°C, e após 5 minutos de reação dos compostos na microplaca ao abrigo de luz, foi feita a leitura no modo de absorbância à 560nm. Os resultados, em triplicata, foram expressos em IC₅₀ (mg/mL).

3.6. Ensaio de Toxicidade com *Galleria mellonella*

Os ensaios de toxicidade utilizando o modelo *in vivo* de *G. mellonella* foram conduzidos de acordo com o descrito por Sardi et al. (2017). Para determinação da dose letal que mata 50% dos organismos (DL₅₀), foram selecionadas 5 diluições do extrato etanólico liofilizado de própolis (diluídas em etanol 57,5%), nas seguintes concentrações: 10, 20, 25, 35 e 40 mg/ml e também a fase intestinal da digestão sem diluição. Para cada diluição do EEP (5 diluições), fase intestinal (bruta) e controle (etanol 57,5%), foram selecionadas aleatoriamente 10 larvas de *G. mellonella* com pesagem entre 0.2 e 0.3g, sem sinais de melanização. O experimento foi conduzido em triplicata.

Foram injetados 10 μ L dos extratos analisados ou controle de etanol na hemocele abdominal (cavidade corporal presente em insetos da ordem Lepidoptera, onde ocorre o fluxo sanguíneo) das larvas de *G. mellonella* através da última pseudopata esquerda, com o auxílio de uma seringa Hamilton de 25 μ L (Hamilton, Reno, NV). As larvas foram incubadas em estufa à 30°C e monitoradas para contagem de sobrevivência após 24h, 48h e 72h. As larvas que não apresentavam movimentos ao toque, e que estavam completamente melanizadas, foram consideradas mortas.

3.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software R Core Team (2020) x64 versão 4.0.3. Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação de médias, ao nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Composição química do EEP da PO1

Foram identificados 10 compostos fenólicos no extrato etanólico bruto da PO1, por meio da técnica de espectrometria de massas LC-ESI-QTOF-MS (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos identificados por LC-ESI-QTOF-MS do extrato de própolis orgânica do tipo 1 não digerido.

Composto	Identificação	Tr (min)	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS fragmentação iônica	Fórmula molecular	Referências
1	Balajaponina D	21,2	359,1531	296 (100); 311 (83); 159 (27); 281 (24)	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	Zhou et al., 2011
2	Álcool Coniferil	9,8	179,0729	146 (100); 145 (47); 147 (32); 164 (29);	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	Dai et al., 2017
3	Aldeído Coniferil	13,9	177,0571	162 (100); 134 (27); 161 (9)	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Tsugawa et al., 2019
4	(-)-Secoisolariciresinol	19,6	361,1684	165 (100); 122 (78); 361 (71); 179 (46)	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	Seukep et al., 2020; Milder et al., 2004; Eklund et al., 2008
5	(+)-Lariciresinol	18,4	359,1529	160 (100); 175 (85); 329 (53); 192 (53)	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	Eklund et al., 2008; MoNA Eklund et al., 2008;
6	Matairesinol	26,3	357,1375	122 (100); 357 (90); 137 (66); 342 (56)	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	Hanhineva et al., 2012; MoNA Moreno-González; Juan; Planas, 2020
7	(+)-Pinoresinol	24,4	357,1378	151 (100); 136,01 (92,5); 121 (10)	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	Rini Vijayan; Raghu, 2019
8	Ácido Cafeico	7,4	179,0368	135 (100); 134 (30); 136 (8)	C ₉ H ₈ O ₄	Castro et al., 2014; Gardana et al., 2007
9	Ácido <i>p</i> -cumárico	11,5	163,0415	119 (100)	C ₉ H ₈ O ₃	
10	Pinobanksina-3- <i>O</i> -acetato	49,5	313,074	253 (100); 143 (15); 271 (5)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Falcão et al., 2012

Dentre os compostos identificados, cinco fazem parte da classe das lignanas (Balajaponina D, (-)-secoisolariciresinol, (+)-lariciresinol, matairesinol e (+)- pinoresinol), dois caracterizam-se como sendo precursores de lignanas (álcool coniferil e aldeído coniferil), dois ácidos fenólicos (ácido cafeico e ácido *p*-cumárico) e um flavonoide (pinobanksina-3-*O*-acetato).

4.1.1. Lignanas e precursores de lignanas

O composto **1** gerou o íon precursor m/z 359,1531 $[M-H]^-$ e foi caracterizado como Balajaponina-D de acordo com o padrão obtido do composto nas mesmas condições em que o extrato de própolis foi submetido ao espectrômetro de massas (LC-ESI-QTOF-MS). A identificação foi realizada a partir da fragmentação do composto que gerou o fragmento iônico de m/z 296 no espectro MS^2 . O composto balajaponina-D é proveniente da espécie de planta *Balanophora japonica*, que assim como outras plantas do mesmo gênero, demonstram efeitos na inibição do HIV, tratamento de hemorroidas, hemoptise e dores de estômago. Além disso, apresentam-se como potenciais antioxidantes na presença de radicais livres (WANG et al., 2012).

O álcool coniferil (composto **2**) foi caracterizado pelo íon molecular m/z 179,0729 $[M-H]^-$ e fragmento majoritário m/z 146 no espectro MS^2 (DAI et al., 2017). Aldeído coniferil (composto **3** com $[M-H]^-$ m/z 177,0571) foi caracterizado por tentativa através do fragmento majoritário m/z 162 (TSUGAWA et al., 2019). Ambos os compostos precursores de lignanas demonstraram alta atividade antioxidante contra os radicais ABTS conforme elucidado em Tiveron et al. (2020). O composto álcool coniferil, estudado por Lee et al. (2004) apresentou alto potencial em sequestrar o radical livre superóxido. Sendo assim, estes são importantes compostos para representarem o notório caráter antioxidante proveniente do extrato etanólico de própolis orgânica do tipo 1.

O composto (-)-secoisolariciresinol (composto **4**, $[M-H]^-$ m/z 361,1684) foi identificado por tentativa através do fragmento majoritário m/z 165 (EKLUND et al., 2008; EKPO et al., 2020; SEUKEP et al., 2020). (+)-lariciresinol (composto **5**, $[M-H]^-$ m/z 359,1529) foi identificado por tentativa através do fragmento majoritário m/z 160 (EKLUND et al., 2008). Matairesinol (composto **6**, $[M-H]^-$ m/z 357,1375) foi identificado por tentativa pelo fragmento majoritário m/z 122 (EKLUND et al., 2008; HANHINEVA et al., 2012). E por fim, o composto (+)-pinioresinol (composto **7**, $[M-H]^-$ m/z 357,1378) foi também identificado por tentativa através do fragmento majoritário m/z 151 (MORENO-GONZÁLEZ; JUAN; PLANAS, 2020).

Estudos apresentaram resultados bastante promissores em relação aos efeitos protetivos desenvolvidos pelo consumo de alimentos ricos em lignanas (SOLEYMANI et al., 2020). De acordo com Bajpai et al. (2017), o composto (+)-lariciresinol possui o mesmo mecanismo antioxidante para sequestro de radicais livres do composto secoisolariciresinol,

pois ambos possuem similaridades nas posições químicas dos anéis benzênicos responsáveis pelo desenvolvimento dessas atividades (Figura 5).

Figura 5: Estruturas Químicas das lignanas (1) (+)-lariciresinol e (2) (-)-secoisolariciresinol. Fonte: PubChem

Os compostos balajaponina D, (-)-secoisolariciresinol, (+)-lariciresinol e matairesinol são considerados marcadores da própolis orgânica PO1, pois nunca foram encontrados em nenhum outro tipo de própolis, segundo Tiveron et al. (2020).

4.1.2. Ácidos Fenólicos

O ácido cafeico (composto **8**, $[M-H]^-$ m/z 179,0368) foi caracterizado por tentativa através do fragmento majoritário em MS^2 m/z 135, referente à perda de um grupo CO_2 ($[M-H-44]^-$)(RINI VIJAYAN; RAGHU, 2019). O ácido *p*-cumárico (composto **9**, $[M-H]^-$ m/z 163,0415), foi caracterizado por tentativa através do fragmento majoritário m/z 119 no espectro MS^2 , que se refere à perda do grupo CO_2 da porção do ácido carboxílico (CASTRO et al., 2014; GARDANA et al., 2007).

O ácido *p*-cumárico possui a capacidade de se diferenciar em outros ácidos hidroxicinâmicos (como o ácido cafeico) em decorrência de reações químicas como metilação e hidroxilação, podendo com isso aumentar o potencial antioxidante da matriz alimentar. Esse aumento está diretamente relacionado com o número de hidroxilas presentes na estrutura

química do composto, sendo assim, o ácido cafeico, que possui 2 hidroxilas ($\text{OH}^\cdot$), apresenta maior potencial antioxidante que o ácido *p*-cumárico, que possui apenas uma (MASEK; CHRZESCIJANSKA; LATOS, 2016)

Outra característica do ácido *p*-cumárico é a de gerar monolignóis que ao se dimerizarem formam lingnanas como por exemplo o pinoresinol e matairesinol (PETERSON et al., 2010), compostos que também foram encontrados no extrato etanólico de PO1.

4.1.3. Flavonoides

O composto Pinobanksina-3-*O*-acetato (composto **10**, $[\text{M-H}]^-$ m/z 313,0740), foi identificado por tentativa através do fragmento majoritário m/z 253 no espectro MS^2 (FALCÃO et al., 2013). Esse mesmo composto foi observado por Sun et al. (2015) em grande quantidade em uma própolis chilena, representando cerca de um terço do total de compostos fenólicos presentes no perfil. Também pôde ser identificado por Park et al. (2004) na própolis verde e em extratos da matriz vegetal *Baccharis dracunculifolia* que produz a resina que origina esse perfil de própolis. Também foi relatado por Bankova; De Castro; Marcucci (2000) em própolis de álamo (*Populus ssp.*) de regiões da Europa, Ásia e América do Norte. Sendo assim, pode-se afirmar que a Pinobanksina-3-*O*-acetato é um composto comumente encontrado em diversos tipos de própolis.

4.2. Transporte epitelial de fenólicos da PO1 em monocamadas de células Caco-2

O ensaio de transporte epitelial foi realizado utilizando uma diluição de 1:50 da fração bioacessível (fase intestinal obtida na digestão *in vitro*), que mostrou ser a maior concentração que não afetou a viabilidade celular, segundo o resultado do ensaio do MTT (item 3.4.3.).

O experimento foi validado através da medição da resistência da monocamada das células Caco-2, antes e após o transporte ($\text{TER} > 165 \, \Omega \, \text{cm}^2$) (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007). As resistências obtidas antes do experimento apresentaram em média TER de $288,20 \pm 31,01 \, \Omega \, \text{cm}^2$ e após o experimento uma média de TER de $249,06 \pm 19,93 \, \Omega \, \text{cm}^2$.

4.3. Análises Químicas do extrato da própolis e frações digeridas

As análises de composição fenólica, perfil cromatográfico e atividades antioxidantes foram realizadas com o extrato não digerido da própolis orgânica do tipo 1, frações gástrica, bioacessível (intestinal) e do transporte epitelial. Sendo assim, foi possível observar o comportamento da matriz alimentar durante o processo digestivo, no que diz respeito à estabilidade dos compostos e manutenção da atividade antioxidante.

4.3.1. Perfil Cromatográfico e Atividade Antioxidante *on-line*

Conforme se pode observar nos cromatogramas obtidos por HPLC do extrato de própolis não digerido (Figura 6), os compostos **2**, **3**, **4** e **8** (álcool coniferil, aldeído coniferil, (-)-secoisolariciresinol e ácido cafeico) apresentaram picos negativos, os quais correspondem a capacidade para desativar o radical ABTS^{•+}.

Figura 6: Cromatograma do EEP obtido em HPLC-DAD com ABTS online acoplado (picos negativos), com compostos identificados por comparação com o LC-ESI-QTOF-MS, à 260nm. (1) balajaponina D; (2) álcool coniferil; (3) aldeído coniferil; (4) (-)-

secoisolariciresinol; (5) lariciresinol; (6) matairesinol; (7) (+)-pinoresinol; (8) ácido cafeico; (9) ácido *p*-cumárico; (10) pinobanksina-3-*O*-acetato.

Essa diferença na interação e atividade dos compostos com o radical ABTS^{•+} é decorrente da estrutura química destes. Ou seja, devido ao fato do radical ABTS^{•+} possuir carga positiva alguns compostos conseguem interagir mais facilmente, desenvolvendo maior atividade antioxidante de sequestro deste radical devido à afinidade elétrica desenvolvida entre as estruturas químicas (SPAGNOL et al., 2019). Entretanto, alguns compostos que não possuem a capacidade de interagir e sequestrar o radical ABTS^{•+} não são descartados quanto ao potencial antioxidante, pois estes podem interagir com outros tipos de radicais que tenham outras conformações químicas e consequentemente maior afinidade.

Na tabela 3 estão mostrados os valores de atividade antioxidante, calculadas por meio de curva de Trolox. Esses resultados corroboram com os observados por Tiveron et al. (2020), que ao analisarem cada composto isoladamente, concluíram que o aldeído coniferil, álcool coniferil e o (-)-secoisolariciresinol apresentaram altas atividades de sequestro do radical ABTS^{•+} (6.96 ± 0.07 ; 9.24 ± 0.36 e 3.53 ± 0.05 μmol de TEAC/mg respectivamente).

Tabela 3: Atividade antioxidante utilizando curva de calibração de padrões de Trolox.

Nº do Pico	Composto*	Concentração (μM)**	Concentração (μM) **
2	Álcool coniferil	4134,44	313,74
3	Aldeído coniferil	578,33	14,68
4	(-)-Secoisolariciresinol	188,16	14,42
8	Ácido cafeico	431,39	129,89

*composto identificado por tentativa (LC-ESI-QTOF-MS)

**valores obtidos por ABTS *online* na forma de picos negativos, com ajuste de área baseado na curva de calibração feita com Trolox e expressos em equivalente ao trolox (TEAC), μM . Número dos picos se refere a Figura 6.

Após a digestão e o transporte epitelial do extrato etanólico liofilizado da PO1, foram traçados os perfis cromatográficos de cada fase obtida para verificação dos compostos presentes e suas respectivas atividades antioxidantes de sequestro do radical ABTS^{•+} (Tabela 4).

Os compostos que apresentaram alta capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+} nas frações digeridas foram o ácido cafeico, álcool coniferil, aldeído coniferil e (-)-secoisolariciresinol, os quais foram identificados por tentativa. Entretanto, esses compostos

não puderam ser encontrados na fração basolateral obtida após o processo de transporte epitelial da fase bioacessível (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade antioxidante contra o radical ABTS^{•+} utilizando a técnica de HPLC *on-line* das diferentes fases obtidas no ensaio de digestão e transporte epitelial do extrato liofilizado da própolis orgânica do tipo 1.

Nº do pico	Composto	Fase gástrica	Fase intestinal	Fração Apical	Fração Basolateral
TEAC (mM)					
1	ni**	243,54±12,20	173,53±42,41	111,63±23,45	115,73±29,03
2	Ácido cafeico*	399,72±24,52	129,12±31,94	5,22±0,32	-
3	ni	69,36±35,56	151,89±31,58	12,58±1,36	18,81±2,79
4	Álcool Coniferil*	13,84±2,91	9,87±4,21	-	-
5	Aldeído Coniferil*	18,61±2,82	-	-	-
6	ni	11,76±3,17	9,44±6,06	-	-
7	ni	23,61±3,18	12,29±5,41	-	-
8	(-)-Secoisolariciresinol *	-	21,89±6,37	-	-
9	ni	50,69±2,42	45,99±22,20	-	-
10	ni	23,82±20,22	1,91±1,89	-	-
11	ni	28,92±14,36	5,83±2,52	-	-
12	ni	-	5,79±0,21	-	-
13	ni	20,20±4,53	-	-	-
14	n/I	-	5,89±0,72	-	-
15	ni	-	6,41±4,53	-	-
16	ni	-	3,18±0,08	-	-

*Compostos identificados tentativamente.

**Não identificado

- Abaixo de limite de quantificação

Apesar disto, foram observadas em todas as etapas da digestão *in vitro*, pelo método de atividade antioxidante *on-line*, a presença de outros compostos que apresentaram atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+} (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Cromatograma e ABTS online da Fase gástrica da digestão *in vitro* do extrato etanólico liofilizado de própolis orgânica do tipo 1. Numeração se refere a descrita na tabela 4.

Figura 8: Cromatograma e ABTS online da Fase Intestinal (bioacessível) da digestão *in vitro* do extrato etanólico liofilizado de própolis orgânica do tipo 1. Numeração se refere a descrita na tabela 4.

Apesar de estarem em menor concentração e ausentes no extrato de própolis, foi observada a presença de dois compostos não identificados com atividade antioxidante nas frações digeridas (compostos 1 e 3), os quais foram inclusive absorvidos e transportados pelas células Caco- (Figura 9 e Tabela 4).

Figura 9: Cromatograma e ABTS online da Fração basolateral do Transporte epitelial com Caco-2 da fração bioacessível obtida em ensaio de digestão *in vitro* do extrato etanólico liofilizado de própolis orgânica do tipo 1. Numeração se refere a descrita na tabela 4.

Uma possível justificativa para não terem sido identificados os precursores das lignanas (álcool coniferil e aldeído coniferil) e lignanas como a(-)-isosecularicresinol na fase basolateral do transporte epitelial é a de que a maior parte destes compostos são convertidos em enterolignanas, denominadas enterolactona e enterodiol (lignanas de mamíferos) pela microflora intestinal antes de serem absorvidas pelo cólon (SOLEYMANI et al., 2020). Ou seja, há uma mudança na conformação química dos compostos, e o modelo de digestão *in vitro* utilizado neste estudo não contempla a etapa de biotransformação e atuação dos microrganismos sob os compostos da matriz alimentar presentes na fase intestinal. O modelo de monocamada de células Caco-2 possui algumas limitações quando comparado aos enterócitos que constituem o epitélio intestinal. Entre as limitações está a baixa permeabilidade paracelular (IFTIKHAR et al., 2020), dificultando a absorção de compostos

que possuem esse tipo de transporte, como é o caso do ácido cafeico. No entanto, foi possível verificar que mesmo após o processo de digestão e transporte, alguns compostos presentes no extrato etanólico da PO1, e com atividade antioxidante, foram absorvidos.

Observa-se também que nem sempre os picos de maior atividade antioxidante correspondem aos picos majoritários do cromatograma. Assim alguns compostos, mesmo que em menor quantidade, mostraram maior capacidade de sequestrar o radical livre ABTS^{•+}, quando comparados a outros que estão presentes em maiores concentrações (Figuras 7, 8 e 9).

4.3.2. Teor de fenólicos totais do extrato de própolis e frações digeridas

Após o processo de digestão *in vitro* e transporte epitelial da fase intestinal obtida, foram feitos ensaios para caracterização das amostras (ELP, fases gástrica e intestinal, frações apical e basolateral) com o intuito de observar e comparar o potencial antioxidante de cada etapa da digestão do extrato de própolis (Figuras 10, 11 e 12). A fase oral não foi levada em consideração para estas as análises pelo fato do extrato de própolis não ser uma matriz rica em carboidratos, não tendo assim alteração pelas enzimas região sublingual (HUR et al., 2011).

Figura 10: Teor de compostos fenólicos totais do extrato de própolis antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Colunas acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Conforme apresentado na Figura 10, houve uma diminuição (aproximadamente 90%) no teor total de compostos fenólicos do extrato de própolis (20.52 ± 1.18 mgEAG/g) e a fração da digestão intestinal (2.16 ± 0.23 mgEAG/g). Entretanto, dentre os compostos fenólicos que

estavam biodisponíveis (fase intestinal), houve um transporte de aproximadamente 84% para a fração basolateral (1.82 ± 0.018 mgEAG/g).

Comportamento semelhante foi observado por Barak et al. (2019), em um estudo de bioacessibilidade com extrato de cranberry europeia, em que houve uma diminuição de aproximadamente 64% no teor de compostos fenólicos totais entre o extrato bruto e a fase intestinal. Cañas et al. (2020) constataram que o conteúdo de compostos fenólicos totais presentes na farinha e no extrato de casca de cacau também foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que nas respectivas frações digeridas. Seraglio et al. (2017) trabalhando com três tipos de melato de bracinga brasileira, e utilizando a mesma metodologia de digestão do presente estudo, também verificaram uma diminuição na quantidade de compostos fenólicos após a digestão das três amostras.

Entretanto, comportamento diferente já foi observado, em um estudo com própolis da Turquia (Ozdağ et al., 2019). Nesse trabalho os autores observaram um aumento do teor de compostos fenólicos totais de algumas amostras na fase intestinal em relação aos respectivos extratos não digeridos. Contudo, este estudo foi feito com própolis bruta ao invés do extrato etanólico, o que no caso o processo de digestão representa uma forma de extração da própolis bruta, justificando assim um possível aumento de fenólicos com o avançar do processo digestivo.

Gonçalves et al. (2019) observaram que após a digestão *in vitro* e transporte epitelial em modelo de células Caco-2, do extrato da fruta *Prunus avium* L., houve um declínio na concentração e presença de compostos na fração basolateral quando comparados com a fase intestinal. O mesmo comportamento foi observado por Toydemir et al. (2013), em um experimento com a fruta *Prunus cerasus* L. *in natura* e seu respectivo suco processado, que apresentou uma eficiência de transporte do composto epicatequina em torno de apenas 3-5% em relação conteúdo total.

O resultado obtido na digestão do extrato etanólico de própolis em relação à diminuição dos compostos fenólicos pode ser interpretado através de algumas considerações, como por exemplo, a diversidade na polaridade dos compostos presentes (ALMINGER et al., 2014). No extrato etanólico de própolis os compostos mais extraídos da matriz bruta são os menos polares (OLDONI et al., 2015), que apresentam baixa diluição em água e consequentemente baixa biodisponibilidade, como é o caso dos polifenóis (PARISI et al., 2013).

Outra consideração a ser observada a respeito da diminuição dos compostos fenólicos durante a digestão é que o modelo estático *in vitro* utilizado não considera a ação da

microflora intestinal e atividade destas no intestino grosso. Alguns compostos fenólicos precisam ser hidrolisados para serem eficientemente absorvidos, sendo que em torno de 42% dos polifenóis são hidrolisados e digeridos no intestino grosso pelas bactérias (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020).

4.3.3. Atividades antioxidantes do Extrato de PO1 e Frações Digeridas

Em relação às atividades antioxidantes pelos métodos FRAP e ABTS⁺⁺ foi observado um comportamento semelhante no que se diz respeito as amostras digeridas. Da mesma forma, em ambos os ensaios os extratos de própolis não digeridos foram os que apresentaram significativamente as maiores atividades (Figuras 11 e 12).

Os resultados de atividade por meio da redução de ferro (FRAP) apresentaram uma diminuição de aproximadamente 73% entre o extrato não digerido ($52.45 \pm 1.3 \text{ mg SF/g}$) e a fase intestinal ($14.01 \pm 0.39 \text{ mg SF/g}$). Observa-se também uma significativa redução de atividade na fase basolateral ($1,26 \pm 0,057 \text{ mg SF/g}$) (Figura 11). Entretanto, houve um aumento na capacidade de redução do ferro entre a fase gástrica ($9.9 \pm 0.57 \text{ mg SF/g}$) e a fase intestinal.

Figura 11: Atividade antioxidante avaliada por meio do potencial de redução de ferro (FRAP) do extrato de própolis e frações gástrica, intestinal, apical e basolateral. Colunas acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Resultados semelhantes também foram observados na avaliação de potencial de redução de ferro de dois tipos de extratos (aquoso e metanólico) digeridos para a fruta *Sambucus ebulus* L. (Barak et al., 2020). Esses autores verificaram uma grande diminuição no potencial de atividade entre os extratos não digerido (0.66 ± 0.03 mM de SF/g de extrato metanólico e 0.51 ± 0.01 mM de SF/g de extrato aquoso) e a fração bioacessível (fase intestinal) (0.38 ± 0.01 mM de SF/g de extrato metanólico e 0.14 ± 0.01 mM de SF/g de extrato aquoso).

Em contraste, Celep et al. (2018) avaliaram a capacidade de redução de ferro em extrato e fração digerida de *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* e não foi observada diferença estatística entre a capacidade de redução do extrato não digerido em comparação com as fases da digestão, ao nível de 5% de significância. Entretanto, em ambos os trabalhos foi utilizado uma metodologia de digestão diferente do presente estudo, onde foi utilizada membranas de diálise que atualmente não são mais recomendadas. Seraglio et al. (2017), utilizando uma metodologia de digestão semelhante à deste estudo também observaram uma diminuição na capacidade redutora de ferro das três amostras de melato analisadas após o processo de digestão *in vitro* quando comparada com as amostras não digeridas, à 5% de significância pelo teste Tukey.

Para o método de sequestro do radical $ABTS^{*+}$ também foi verificada uma diminuição significativa ($p < 0.05$) entre o extrato não digerido e a fração intestinal (Figura 12). Em relação ao transporte dos compostos com capacidade para sequestrar o radical $ABTS^{*+}$, em torno de 60% podem ser absorvidos, sendo o restante (40%) retido na fração apical.

Figura 12: Atividade antioxidante através do potencial de sequestro do radical $ABTS^{•+}$ do extrato de própolis e frações gástrica, intestinal, apical e basolateral. Colunas acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey. TEAC= mg de equivalentes ao trolox.

Em um estudo com própolis marrom brasileira utilizando a metodologia de digestão através do uso de tubos de diálise, Seraglio et al. (2017) também observaram o mesmo comportamento entre a capacidade de sequestro do radical $ABTS^{•+}$, dos extratos brutos quando comparados as respectivas frações digeridas.

Cañas et al. (2020) utilizando a mesma metodologia de digestão utilizada no presente estudo verificaram que a farinha obtida de casca de cacau também diferiu estatisticamente na capacidade de sequestro do radical $ABTS^{•+}$ ($p < 0.05$) entre a amostra não digerida e a fase intestinal. Esses autores também observaram que a perda de atividade ocorria conforme a digestão acontecia. Por outro lado, quando foi feito um extrato aquoso da casca de cacau e também submetido ao mesmo ensaio de digestão *in vitro*, observou-se um aumento significativo na capacidade de sequestro do radical $ABTS^{•+}$ com o decorrer da digestão. Uma possível explicação para esse comportamento em ambos os ensaios realizados é a interferência da matriz alimentar e a interação dos polifenóis responsáveis com atividade antioxidante com outros compostos ou enzimas adicionadas durante o processo de digestão (SERAGLIO et al., 2017). Ressalta-se que em todos os ensaios foram descontados valores de atividade antioxidante dos respectivos controles enzimáticos de cada fase, para que estes não influenciassem nos valores obtidos de atividade da amostra de PO1.

4.3.4. Capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio (ERO) do extrato da própolis PO1 e frações digeridas

Apesar de existirem poucos trabalhos que avaliaram a capacidade antioxidante da própolis contra espécies reativas, estes ensaios apresentam resultados mais próximas do real, devido ao fato das ERO estarem presentes nos organismos vivos. Convém ainda mencionar que não foram encontrados trabalhos com espécies reativas em ensaios de transporte celular de própolis, bem como poucos trabalhos com outras matrizes alimentares. De acordo com os resultados das Figuras 13 e 14, foram observados comportamentos diferentes entre o extrato de própolis e as frações digeridas (gástrica e intestinal) e transportadas para os radicais peróxido (ROO[•]) e superóxido (O₂^{•-}) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Figuras 13 e 14). Da mesma forma que no sequestro do radical ABTS, também foi verificada uma grande redução da atividade do radical ROO[•] no decorrer do processo digestivo (Figura 13).

Figura 13: Desativação do radical ROO[•] do extrato de própolis antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Barras acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Pode-se constatar uma redução de 93,5% no potencial de sequestro do radical ROO[•] entre o extrato não digerido ($2,0 \pm 0,023$ μmol de TEAC/mg) e a fração intestinal digerida ($0,13 \pm 0,0159$ μmol de TEAC/mg). Também foi possível se observar uma diminuição na atividade antioxidante entre a fase intestinal e a fração basolateral ($0,06 \pm 0,0008$ μmol de TEAC/mg) (Figura 13).

Em estudo de comparação realizado com amostras de sucos de maracujás de diferentes regiões da China, foi verificado, após o processo de digestão *in vitro*, um comportamento distinto entre as amostras, onde houve redução do sequestro do radical $\text{ROO}^\bullet$ em algumas amostras, enquanto em outras houve um aumento quanto a capacidade de desativação do mesmo radical (XIE; CHEN; FU, 2021). Esse comportamento distinto entre as atividades antioxidantes das amostras de sucos pode ser devido à diferença entre as composições e concentrações de compostos fenólicos contidos nos diferentes perfis de maracujás utilizados no estudo.

Avaliando a capacidade de sequestro do $\text{ROO}^\bullet$, Francisco et al. (2020) também observaram uma redução significativa da atividade antioxidante durante as etapas de digestão *in vitro* com algas marinhas (*Fucus spiralis*), frescas e congeladas. Uma possível explicação para esse comportamento é a de que a capacidade antioxidante pelo método de sequestro deste radical está diretamente relacionada com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras analisadas (BAEZA et al., 2018). Conforme observado no ensaio de fenólicos totais (Figura 10), houve uma redução na concentração desses compostos com o decorrer do processo de digestão *in vitro* e transporte epitelial.

Os ensaios de potencial antioxidante de sequestro do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para os valores de IC_{50} do extrato não digerido (0.39 mg/ml), fase bioacessível (1,34 mg/ml) e fração basolateral (0.91 mg/ml). Assim, a atividade antioxidante para o radical superóxido se manteve mesmo após o processo de transporte epitelial (Figura 14). Foi verificado aumento de atividade entre a fração gástrica ($\text{IC}_{50} = 4,28$ mg/ml) e a fase intestinal ($\text{IC}_{50} = 1,34$ mg/ml). Assim, foi verificado que a etapa da digestão gástrica indisponibilizou temporariamente os compostos responsáveis pela desativação do HOCl.

Figura 14: Desativação do radical $O_2^{\bullet-}$ do extrato de própolis antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Barras acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey. Valores expressos em IC₅₀ de mg de extrato de própolis/ml de tampão fosfato de potássio.

Comportamento distinto em relação ao presente estudo foi verificado em extratos de própolis marrom brasileira (YEN et al., 2017). Neste trabalho, esses mesmos autores verificaram uma redução do potencial de sequestro do radical $O_2^{\bullet-}$ com o decorrer das fases de digestão, em todos os extratos avaliados. Observaram ainda que o extrato etanólico foi o que apresentou o maior potencial de sequestro do $O_2^{\bullet-}$. Corroborando com o estudo descrito anteriormente, Melo et al. (2020) avaliando a digestão de sementes de açaí também verificaram uma redução do potencial antioxidante da fase intestinal quando comparado ao extrato não digerido, no que se diz respeito a desativação do $O_2^{\bullet-}$.

Em relação a desativação do HOCl, pode-se verificar que não houve diferença estatística ($p < 0.05$) entre o extrato não digerido da própolis orgânica (IC₅₀ = 0,027±0,0024 mg/ml) e a fase bioacessível (IC₅₀ = 0,026±0,0017 mg/ml), obtidas após a digestão *in vitro* (Figura 15). Foi verificada uma redução na capacidade de sequestro do ácido HOCl na fase gástrica (IC₅₀ = 0,40±0,025 mg/ml), a qual voltou a aumentar significativa na fase intestinal (IC₅₀ = 0,026±0,0017 mg/ml). Entretanto, apesar da alta atividade na fase intestinal a mesma foi reduzida de forma expressiva após o processo de transporte epitelial para a fração basolateral (IC₅₀ = 0,63±0,14 mg/ml) (Figura 15). Este fenômeno pode ser resultado de uma dificuldade na absorção dos compostos que desempenham atividade antioxidante de sequestro do ácido HOCl, como por exemplo o ácido cafeico (SPAGNOL et al., 2019).

Figura 15: Desativação do HOCl do extrato de própolis antes e após a digestão *in vitro* e transporte epitelial. Barras acompanhadas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey. *Valores expressos em IC₅₀ de mg de extrato de própolis/ml de tampão fosfato de potássio.

O ácido HOCl é produzido por neutrófilos em excesso durante uma reação inflamatória, sendo caracterizado como um composto com alta capacidade bactericida, entretanto, quando em grande quantidade, pode ocasionar danos celulares, reagindo com proteínas e ácidos nucleicos (PIMENTEL et al., 2020). Ou seja, a capacidade dos compostos presentes na própolis e em suas respectivas fases da digestão, em reagir e sequestrar o ácido HOCl é de grande importância para proteger as células contra possíveis danos oxidativos causados por uma resposta inflamatória excessiva, pois não há via catalítica endógena de degradação desse composto. Sendo assim, é necessária a ação de compostos exógenos, para impedir também a formação de radicais altamente reativos, como por exemplo, o oxigênio singlete (SPAGNOL et al., 2019).

Melo et al. (2020) verificaram que o potencial de sequestro do HOCl pelas sementes de açaí não digeridas foi estatisticamente mais alto que da respectiva fase intestinal, demonstrando assim que há uma perda da capacidade antioxidante após o processo de digestão *in vitro*. Este resultado foi diferente do observado neste estudo, em que a capacidade antioxidante não diferiu entre o extrato não digerido da própolis e a fase intestinal (Figura 15).

A alteração da atividade antioxidante observada nos ensaios contra as espécies ROO[•], O₂^{•-} e HOCl entre as fases gástrica e intestinal podem, de certa forma, ser advinda da mudança do pH dessas fases, visto que alguns compostos fenólicos desempenham melhores

atividades antioxidantes em pH mais altos (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). O pH da fase gástrica é bastante baixo (pH=3), podendo assim afetar o desempenho desses compostos quanto a capacidade de sequestro determinadas EROS. Outra possível explicação é a de que com o decorrer da digestão, compostos com maior potencial antioxidante contra espécies $\text{ROO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e HOCl foram extraídos da matriz por ações enzimáticas, ou transformados em metabólitos mais ativos, fazendo com que a IC_{50} fosse reduzida durante as etapas da digestão *in vitro*.

Assim, foi observado um padrão específico quanto a capacidade de desativação das espécies $\text{ROO}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e HOCl após o transporte epitelial com o modelo de monocamada de células Caco-2. Neste caso, uma alta capacidade para desativar o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi verificado (Figura 14).

Considerando que o extrato de PO1 é rico em lignanas e precursores de lignanas, a perda de atividade antioxidante pode ser decorrente da capacidade em que as lignanas têm de se conjugar com glutathionas, sulfatos e ácido glucurônico, ocasionando uma perda no potencial bioativo desempenhado pelos compostos isolado (SOLEYMANI et al., 2020).

Sendo assim, estudos de digestão e absorção realizados com lignanas isoladas seriam de grande importância para observar o comportamento desses compostos no decorrer dos processos digestivos e pós-absorção celular.

4.4. Toxicidade por modelo *in vivo* com *Galleria mellonella*

Foram analisadas diferentes concentrações do extrato etanólico de PO1 diluídas em etanol 57,5% (maior concentração etanólica que não apresentou toxicidade para a condução do ensaio) e a fase bioacessível sem diluição, utilizando o modelo *in vivo* de larvas da espécie *Galleria mellonella*.

A partir da condução do estudo com diferentes concentrações do extrato de própolis (1,6 - 0,4 g/kg) foi possível calcular a concentração do extrato que mata 50% dos organismos (DL_{50}), sendo essa uma concentração de 1,10g/kg (Figura 16). Já a fração bioacessível (Fase intestinal) em sua concentração bruta sem passar por nenhuma diluição, não apresentou nenhuma mortalidade dos organismos, permanecendo as 72 horas com 100% de sobrevivência na triplicata ($p < 0,05$).

Figura 16: Gráfico de porcentagem de sobrevivência das larvas *G. mellonella* inoculadas com diferentes concentrações de extrato de própolis orgânica do tipo 1 e fração bioacessível, monitoradas por um período de 72 horas. Tratamentos acompanhados de mesma letra não possuem diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. *DL₅₀ determinada através de cálculo matemático.

Em um estudo com a própolis orgânica do tipo 6, Nani et al. (2020) encontraram valores de doses sem toxicidade aparente (100% de sobrevivência em 60 horas), equivalentes à 3g/kg, utilizando o mesmo modelo de *G. mellonella*. Portanto, a própolis orgânica do tipo 1 apresenta maior toxicidade quando comparada a própolis orgânica do tipo 6. De qualquer forma, o valor de DL₅₀ de 1,10g de extrato de própolis PO1/kg é uma dose muito maior do que a usualmente utilizada por humanos. Sendo assim, essa própolis pode ser considerada como de toxicidade muito baixa. A baixa toxicidade pode ser decorrente dos compostos que proporcionam a ela alta atividade antioxidante, os quais podem ser responsáveis por diminuir a toxicidade nesta matriz alimentar (LAZARINI et al., 2018; SARDI et al., 2017).

O modelo de estudos de toxicidade *in vivo* com larvas de *G. mellonella* aparenta ser confiável para o uso em compostos de baixa toxicidade (ALLEGRA et al., 2018), como é o caso do extrato etanólico de PO1, com destaque à fase intestinal da digestão, em que não apresentou toxicidade aparente. Quando comparado com o modelo de toxicidade celular (MTT) realizado com as células Caco-2, observou-se uma superestimação da toxicidade, em que para haver uma viabilidade de 80% das células, foi necessária uma diluição de 50 vezes da fase intestinal.

Como as larvas de *G. mellonella* apresentam um sistema de imunidade inata, com respostas inflamatórias mediadas por hemócitos que se assemelham aos macrófagos

encontrados no sistema imune de mamíferos, este modelo é promissor para a avaliação da toxicidade de matrizes alimentares sem limitações éticas (MOYA-ANDÉRICO et al., 2021).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos foi verificado que a digestão *in vitro* e o transporte epitelial utilizando o modelo de células Caco-2 influenciou no padrão final de compostos fenólicos da própolis orgânica do tipo 1.

Houve também uma diminuição no potencial antioxidante do extrato etanólico de PO1, em comparação com a matriz não digerida. Uma possível solução para um aumento na bioacessibilidade dos compostos e consequente transporte epitelial seria encapsular o extrato. Assim, os compostos poderiam ficar mais estáveis durante as etapas da digestão, mudanças no pH e interações substrato-enzima, que acabam degradando-os ou transformando-os em moléculas menos ativas.

Apesar dos experimentos de digestão *in vitro* e transporte epitelial com monocamada de células Caco-2 apresentarem algumas limitações em relação a testes em humanos, foi possível verificar que ao final o extrato digerido ainda continuava bioativo, o que dá subsídios para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais contendo esta própolis.

REFERÊNCIAS

- ACIKELLI, A. H. et al. Flavonoids isolated from Caribbean propolis show cytotoxic activity in human cancer cell lines. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, n. 1, p. 51–53, 2013.
- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
- AL-WAILI, N. et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* and *Candida Albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793–800, 2012.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALKADI, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 20, n. 1, p. 16–26, 2018.
- ALLEGRA, E. et al. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469–472, 2018.
- ALMINGER, M. et al. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413–436, 2014.
- ALVARENGA, L. et al. To bee or not to bee? The bee extract propolis as a bioactive compound in the burden of lifestyle disease. **Nutrition**, v. 83, p. 111094, 2020.
- AMOROS, M. et al. Article Activity of Propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231–240, 1992a.
- AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 12, p. 1732–1740, 1992b.
- ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523–524, p. 9–20, 2003.
- BAEZA, G. et al. Polyphenol content, in vitro bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 4, p. 1397–1406, 2018.

- BAJPAI, V. K. et al. Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2017.
- BANKOVA, V.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.
- BARAK, T. H. et al. Influence of in vitro human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus* L. (*European cranberry*) fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 131, n. January, p. 62–69, 2019.
- BARAK, T. H. et al. In vitro human digestion simulation of the bioavailability and antioxidant activity of phenolics from *Sambucus ebulus* L. fruit extracts. **Food Bioscience**, v. 37, n. July, 2020.
- BARBA, F. J. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 195–206, 2017.
- BERRETTA, A. A. et al. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease: Running title: Propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 131, n. June, 2020.
- BIAZOTTO, K. R. et al. Brazilian Biodiversity Fruits: Discovering Bioactive Compounds from Underexplored Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1860–1876, 2019.
- BODOIRA, R.; MAESTRI, D. Phenolic Compounds from Nuts: Extraction, Chemical Profiles, and Bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 927–942, 2020.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546–4550, 2013.
- BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in lipsoactivated macrophages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.
- BUENO-SILVA, B. et al. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

- CĂLINOIU, L. F.; VODNAR, D. C. Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2018.
- CAÑAS, S. et al. Bioaccessibility of Phenolic Compounds from Cocoa Shell Subjected to In Vitro Digestion and Its Antioxidant Activity in Intestinal and Hepatic Cells †. **The 1st International Electronic Conference on Antioxidants in Health and Disease**, n. December, p. 1–7, 2020.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155–171, 2014.
- CASTRO, C. et al. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. **Food Research International**, v. 64, p. 873–879, 2014.
- CCANA-CCAPANTINTA, G. C. et al. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2060–2067, 2020.
- CELEP, E. et al. Assessment of potential bioavailability of major phenolic compounds in *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. **Industrial Crops and Products**, v. 118, n. January, p. 111–117, 2018.
- CHAINY, G. B. N.; SAHOO, D. K. Hormones and oxidative stress: an overview. **Free Radical Research**, v. 54, n. 1, p. 1–26, 2020.
- CHEN, Y. W. et al. Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 761–768, 2018.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 5 ed. ed. [s.l.] Manole Ltda., 2016.
- DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial, anti-adherence and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of a 4-phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian geopropolis. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, n. May 2019, p. 103855, 2020.
- DAENEN, K. et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Renal Replacement Therapy**, v. 4, n. 1, p. 975–991, 2018.
- DAI, X. et al. Development of a sensitive LC–MS/MS method for quantification of coniferyl ferulate and its metabolite coniferyl alcohol in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 146, p. 201–205, 2017.

- DUTTA, S. et al. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, n. April, p. 240–255, 2019.
- EKLUND, P. C. et al. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 1, p. 97–107, 2008.
- EKPO, D. E. et al. High resolution UPLC-PDA-QTOF-ESI-MS/MS analysis of the flavonoid-rich fraction of *Lasianthera africana* leaves, and in vivo evaluation of its renal and cardiac function effects. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04154, 2020.
- FALCÃO, S. I. et al. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 309–318, 2013.
- FRANCHI, G. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- FRANCHIN, M. et al. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: Involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016.
- FRANCISCO, J. et al. Bioaccessibility of antioxidants and fatty acids from *fucus spiralis*. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 1–12, 2020.
- FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 2, p. 122–132, 2016.
- FREIRES, I. A. et al. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 681–686, 2017.
- GALÚCIO, J. M. et al. In silico identification of natural products with anticancer activity using a chemo-structural database of Brazilian biodiversity. **Computational Biology and Chemistry**, v. 83, n. June, p. 107102, 2019.
- GARDANA, C. et al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 390–399, 2007.
- GE, L.; LI, S. P.; LISAK, G. Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112913, 2020.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1979.

- GLASAUER, A.; CHANDEL, N. S. Ros. **Current Biology**, v. 23, n. 3, p. 100–102, 2013.
- GONÇALVES, J. et al. Assessment of the Bioaccessibility and Bioavailability of the Phenolic Compounds of *Prunus avium* L. by *in Vitro* Digestion and Cell Model. **ACS Omega**, v. 4, n. 4, p. 7605–7613, 2019.
- GRANATO, D.; MOCAN, A.; CÂMARA, J. S. Is a higher ingestion of phenolic compounds the best dietary strategy? A scientific opinion on the deleterious effects of polyphenols *in vivo*. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, n. December 2019, p. 162–166, 2020.
- HANHINEVA, K. et al. Identification of novel lignans in the whole grain rye bran by non-targeted LC-MS metabolite profiling. **Metabolomics**, v. 8, n. 3, p. 399–409, 2012.
- HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017.
- HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2111–2119, 2007.
- HUR, S. J. et al. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–12, 2011.
- IFTIKHAR, M. et al. Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review. **Food Research International**, v. 136, n. March, p. 109240, 2020.
- ISMAEEL, A. et al. Resistance training, antioxidant status, and antioxidant supplementation. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 539–547, 2019.
- ITO, J. et al. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1278–1281, 2001.
- JOCHEMS, P. G. M. et al. Evaluating human intestinal cell lines for studying dietary protein absorption. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2018.
- KOLEVA, I. I.; NIEDERLÄNDER, H. A. G.; VAN BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3373–3381, 2001.
- KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. Transepithelial Transport of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Their Colonic Metabolites in Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2518–2526, 2004.

- KORKMAZ, I. O.; BILICI, C.; KORKMAZ, S. Sensory, pH, syneresis, water-holding capacity, and microbiological changes in homemade yogurt prepared with maca (*Lepidium meyenii*) powder and propolis extract. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 23, n. June 2020, p. 100291, 2021.
- KUKIĆ, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861–868, 2008.
- KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019.
- LAZARINI, J. G. et al. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, n. December 2017, p. 132–139, 2018.
- LEE, J. Y. et al. Antioxidant activity of phenylpropanoid esters isolated and identified from *Platycodon grandiflorum* A. DC. **Phytochemistry**, v. 65, n. 22, p. 3033–3039, 2004.
- LI, X. et al. Influence of nutrients on the bioaccessibility and transepithelial transport of polybrominated diphenyl ethers measured using an *in vitro* method and Caco-2 cell monolayers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111569, 2021.
- LIU, Y. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity in red- and in green-fleshed kiwifruits. **Food Research International**, v. 116, n. August 2018, p. 291–301, 2019.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MARZE, S. Bioavailability of Nutrients and Micronutrients: Advances in Modeling and in Vitro Approaches. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. December 2016, p. 35–55, 2017.
- MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; LATOS, M. Determination of antioxidant activity of caffeic acid and *p*-coumaric acid by using electrochemical and spectrophotometric assays. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, n. 12, p. 10644–10658, 2016.
- MELO, P. S. et al. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, 2015.
- MELO, P. S. et al. Simulated gastrointestinal digestion of Brazilian açai seeds affects the content of flavan-3-ol derivatives, and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 2020.

- MORENO-GONZÁLEZ, R.; JUAN, M. E.; PLANAS, J. M. Profiling of pentacyclic triterpenes and polyphenols by LC-MS in Arbequina and Empeltre table olives. **Lwt**, v. 126, n. March, p. 109310, 2020.
- MOUHOUBI-TAFININE, Z.; OUCHEMOUKH, S.; TAMENDJARI, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 85–90, 2016.
- MOYA-ANDÉRICO, L. et al. Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. **Chemosphere**, v. 266, 2021.
- MULLER, A. G. et al. Delivery of natural phenolic compounds for the potential treatment of lung cancer. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 433–449, 2019.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; PINTÓ-MARIJUAN, M. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, v. 1, p. 16–19, 2016.
- NANI, B. D. et al. Anti-inflammatory and anti- *Candida* Effects of Brazilian Organic Propolis, a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2861–2871, 2020.
- NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687–704, 2019.
- 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.
- OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.
- OLDONI, T. L. C. et al. Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.
- OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 135–143, 2019.
- OZDAL, T. et al. Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. **Food Research International**, v. 122, n. May, p. 528–536, 2019.
- PARISI, O. I. et al. **Polyphenols and Their Formulations: Different Strategies to Overcome the Drawbacks Associated with Their Poor Stability and Bioavailability**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 1

- PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997–1003, 2002.
- PARK, Y. K. et al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 2004.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002.
- PETERSON, J. et al. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 10, p. 571–603, 28 set. 2010.
- PIMENTEL, F. B. et al. Contribution of in vitro simulated gastrointestinal digestion to the antioxidant activity of *Porphyra dioica* conchocelis. **Algal Research**, v. 51, n. 228, p. 102085, 2020.
- PINA, R. et al. cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.
- POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, n. November 2018, p. 53–62, 2019.
- POPRAC, P. et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.
- RAMAKRISHNA, W. et al. Anticancer Activities of Plant Secondary Metabolites: Rice Callus Suspension Culture as a New Paradigm. **Rice Science**, v. 28, n. 1, p. 13–30, 2021.
- REBOUÇAS-SILVA, J. et al. Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- REFAAT, H. et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, n. September 2020, p. 120028, 2020.
- RINI VIJAYAN, K. P.; RAGHU, A. V. Polyphenolic profiling of two *Embelia* spp. endemic to South Western Ghats of India by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry analysis. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.
- SANTOS-BUELGA, C. et al. **Plant phenolics as functional food ingredients**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 90

- SARDI, J. DE C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 280–287, 2017.
- SERAGLIO, S. K. T. et al. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benthham honeydew honeys. **Food Research International**, v. 99, n. June, p. 670–678, 2017.
- SEUKEP, A. J. et al. In vitro antibacterial and antiproliferative potential of *Echinops lanceolatus* mattf. (asteraceae) and identification of potential bioactive compounds. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 4, p. 1–14, 2020.
- SHAPPELL, N. W. Ergovaline toxicity on Caco-2 cells as assessed by MTT, alamarblue, and DNA assays. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 39, n. 7, p. 329–335, 2003.
- SIDDEEG, A. et al. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. xxxx, 2020.
- SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008.
- SILVA, M. P. et al. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, n. July 2020, 2021.
- SOARES, J. C. et al. Comprehensive characterization of bioactive phenols from new Brazilian superfruits by LC-ESI-QTOF-MS, and their ROS and RNS scavenging effects and anti-inflammatory activity. **Food Chemistry**, v. 281, n. September 2018, p. 178–188, 2019.
- SOLEYMANI, S. et al. The what and who of dietary lignans in human health: Special focus on prooxidant and antioxidant effects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 106, n. December 2019, p. 382–390, 2020.
- SPAGNOL, C. M. et al. *In vitro* methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 358–366, 2019.
- ŠTURM, L.; POKLAR ULRIH, N. Propolis flavonoids and terpenes, and their interactions with model lipid membranes: a review. **Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly**, v. 32, p. 1–28, 2020.

- SUN, C. et al. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 1–22, 2019.
- TAVELIN, S. **New Approaches to Studies of Paracellular Drug Transport in Intestinal Epithelial Cell Monolayers**. [s.l: s.n.]. v. 285
- TIVERON, A. P. **Caracterização e identificação de compostos com atividade antioxidante de própolis orgânica brasileira**. [s.l.] Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2015.
- TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–18, 2016.
- TIVERON, A. P. et al. Lignans as new chemical markers of a certified Brazilian organic propolis. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2020.
- TOYDEMIR, G. et al. Investigating the transport dynamics of anthocyanins from unprocessed fruit and processed fruit juice from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) across intestinal epithelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 47, p. 11434–11441, 2013.
- TSUGAWA, H. et al. A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 295–298, 2019.
- VILLALVA, M. et al. **Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities from the Basolateral Fraction of Caco-2 Cells Exposed to a Rosmarinic Acid Enriched Extract**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018.
- WANG, X. et al. Phytochemicals and biological studies of plants from the genus *Balanophora*. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 11–18, 2012.
- WOJTUNIK-KULESZA, K. et al. Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.
- WOŹNIAK, M. et al. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 301–308, 2019.

- XIE, X.; CHEN, C.; FU, X. Study on the bioaccessibility of phenolic compounds and bioactivities of passion fruit juices from different regions *in vitro* digestion. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 1, p. 1–13, 2021.
- YANG, C. S. et al. Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 3063–3068, 2018.
- YEN, C. H. et al. Beneficial efficacy of various propolis extracts and their digestive products by in vitro simulated gastrointestinal digestion. **Lwt**, v. 84, p. 281–289, 2017.
- YESILTAS, B. et al. Investigating the *in-vitro* bioaccessibility of propolis and pollen using a simulated gastrointestinal digestion System. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 1, p. 101–108, 2014.