

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

**PRÓPOLIS: FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA**

CRISTINA JANSEN

Pelotas, 2015.

CRISTINA JANSEN

**PRÓPOLIS: FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi

Co-orientador: Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Pelotas, 2015.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

J35p Jansen, Cristina

Própolis : fitoquímicos e atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica / Cristina Jansen ; Rui Carlos Zambiasi, orientador ; Eliezer Avila Gandra, coorientador. — Pelotas, 2015.

95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Câncer. 2. Compostos fenólicos. 3. Escherichia coli. 4. Listeria monocytogenes. 5. Staphylococcus aureus.. I. Zambiasi, Rui Carlos, orient. II. Gandra, Eliezer Avila, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

Cristina Jansen

PRÓPOLIS: FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19 de fevereiro de 2015.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi (Orientador).
Doutor em Food and Nutricional Science pela University of Manitoba.

.....
Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra.
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

.....
Prof.^a Dr.^a Giana de Paula Cognato
Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....
Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso
Doutor em Sciences Agronomiques pelo Institut National Polytechnique de Toulouse

Dedico este trabalho aos meus pais por todo amor, dedicação e apoio recebido.

Agradecimentos

A Deus por me guiar e me dar forças em todos os momentos.

À minha família por todo amor recebido, em especial aos meus pais João Carlos Jansen e Claudete Hartwig Jansen por tudo que fizeram por mim, serei eternamente grata. Ao meu irmão Gabriel pelos momentos de descontração e por sempre torcer pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Gilson Alves Júnior pelo amor, paciência e incentivo durante essa caminhada.

Aos meus colegas e professores da Pós-graduação em Nutrição e Alimentos pela boa convivência nestes dois anos, especialmente à Virginia de Jesus e à Scharlise Diovanella que foram minhas parceiras em todos os momentos.

À Fernanda Demoliner e Greici Bergamo por toda atenção e auxílio prestado nas análises de atividade antimicrobiana.

Às meninas do laboratório de cromatografia do DCTA, que me receberam de braços abertos e com as quais aprendo diariamente, agradeço pela amizade e contribuições a este trabalho: Josiane Rutz, Michele Crizel, Roseane D'Avila, Fernanda Krumreich, Suzan Freda, Janice Moura, Suzane Luz, Mariângela Bruscatto, Francine Costa, Helene de Abreu, e às estagiárias Tailize Zimmer, Suzana Treptow, Naralice Hartwig, Cinara Sousa e Bruna Böhmer pela ajuda com as análises.

A professora Giana Cognato, ao Carlus Couto e a estagiária Nathalia Pedra pela ajuda na realização da atividade citotóxica.

Ao meu orientador Rui Carlos Zambiasi pela oportunidade de realização deste trabalho, pelos conselhos e ensinamentos prestados.

Ao meu co-orientador Eliézer Ávila Gandra pela paciência, amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos integrantes da banca pela disponibilidade.

À UFPEL, PPGNA, CCQFA e DCTA pela oportunidade para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

“Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa.”

(Isaías 41:10)

Resumo

JANSEN, Cristina. **Própolis: fitoquímicos e atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A colmeia constitui-se em uma fonte de geração de produtos de alto valor nutritivo e com grandes potencialidades farmacológicas. A própolis é um dos produtos obtidos da colmeia, que é produzida pelas abelhas através da coleta de resinas e gomas de árvores, de plantas e de flores, materiais que são parcialmente digeridos e acrescentados de cera e pólen. As propriedades biológicas da própolis são atribuídas principalmente ao conteúdo de fitoquímicos. Dentre estes compostos, os que estão presentes em maior proporção são os compostos fenólicos, majoritariamente os da classe dos flavonoides. Porém, vários são os fatores que interferem na composição química da própolis, o que acaba refletindo no conteúdo e proporção dos diferentes fitoquímicos, e, portanto, em suas propriedades. O Brasil, sendo um país com grande diversidade de vegetação, favorece ampla variação na composição da própolis, contribuindo para dificultar a padronização deste produto no país. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição de fitoquímicos em amostras de própolis oriundas do Sul do Rio Grande do Sul, afim de testar suas propriedades biológicas. Parte das amostras de própolis foram analisadas quanto aos principais parâmetros físico-químicos, e de outra parte foram preparados extratos hidroalcoólicos concentrados. Os extratos foram submetidos à determinação química de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, e da análise de espectroscopia Ultravioleta-Visível. Também foram avaliados quanto à capacidade antioxidante, através dos métodos de DPPH, ABTS e FRAP; quanto à atividade antibacteriana frente a cepas de bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*); e quanto ao efeito citotóxico, o qual foi realizado através do método de redução do MTT em células da linhagem melanoma B16F10. Dentre os parâmetros físico-químicos, apenas uma amostra apresentou conteúdo de umidade acima do permitido pela legislação brasileira. A cor foi definida como amarela para as amostras oriundas de Rio Grande e de Canguçu, e castanho claro para as amostras oriundas de Pelotas e de Pedro Osório. Todas as amostras apresentaram alto teor dos fitoquímicos analisados (compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides); porém, houve variação significativa no conteúdo destes compostos entre as diferentes amostras. Pelo espectro UV observou-se absorção máxima entre 290 e 400 nm, região característica da absorção dos flavonoides. As amostras de própolis de Pelotas e de Rio Grande apresentaram alta capacidade antioxidante determinada pelos métodos com o radical DPPH e FRAP, sendo comparáveis aos obtidos com o padrão quercetina. Constatou-se uma relação positiva entre as amostras com maior teor de fitoquímicos e a elevada ação antioxidante. Todas as amostras apresentaram atividade antibacteriana frente às cepas testadas; porém, os resultados foram superiores na inibição das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) do que para a bactéria Gram-negativa (*E. coli* O157:H7), sendo que as amostras de Pelotas e Rio Grande tiveram alta ação bactericida. Todas as amostras de própolis analisadas demonstraram ação citotóxica em 48h no combate às células de câncer de melanoma de camundongo, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após 72h a própolis causou citotoxicidade

na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Amostras oriundas de Pelotas e de Rio Grande apresentaram resultados promissores no combate à linhagem testada.

Palavras-chave: câncer, compostos fenólicos; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*.

Abstract

JANSEN, Cristina. **Propolis: phytochemicals and antioxidante, antibacterial and cytotoxic activity**. 2015. 95 f. Dissertation (Master of Nutrition and Food). Graduate Program in Foods and Nutrition. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

The beehive is a source of nutritious high-value products and with great pharmacological potential. Propolis is one of the products obtained from the beehive, produced by honey bees by collecting resin and gum trees, plants and flowers, which are partially digested and added of wax and pollen. Its biological properties are mainly attributed to phytochemicals. Among these, the highest contend are phenolic compounds, mainly the class of flavonoids. However, there are several factors that influence the chemical composition of propolis, which ends up reflecting on their properties. The Brazil is a country with great diversity of vegetation that enhances the variations in the composition of propolis, contributing to hinder its standardization in the country. Therefore, the aim of this study was to evaluate the composition of phytochemicals of propolis samples of South of Rio Grande do Sul, and test their biological properties. Part of the propolis samples were analyzed for major physical and chemical parameters and another part was used to obtain the etanolic extracts. The extracts were subjected to determination of phenolic compounds, flavonoids and carotenoids, and analysis of Ultraviolet-visible spectroscopy. Also it was determined the antioxidant capacity that was measured by the methods DPPH, ABTS and FRAP. The antibacterial activity was evaluated against strains of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*). The cytotoxic effect was performed using the MTT reduction method melanoma cell line B16F10. For the physico-chemical parameters, only one sample showed humidity values above those permitted by brasilian legislation. The color was defined as yellow for the Rio Grande and Canguçu samples, and light brown to Pelotas and Pedro Osorio samples. The samples showed high concentration of the analyzed phytochemicals (phenolics, flavonoids and carotenoids), but there was significant variation between samples. The UV spectrum showed absorption maxima between 290 and 400 nm, characteristic of the region flavonoids. Propolis from Pelotas and Rio Grande showed the highest antioxidant capacity by method with DPPH radical and FRAP, comparable to those obtained with the standard quercetin. It was found a positive relationship between the samples with higher levels of phytochemicals and antioxidant effects. All samples showed antibacterial activity against all tested strains, but the results were better in the inhibition of Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) than for Gram-negative (*E. coli* O157: H7), and samples of Pelotas and Rio Grande had high bactericidal action. The propolis samples analyzed showed cytotoxic action in 48 hours in fighting cells of mouse melanoma cancer at concentrations of 250 and 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. After 72h propolis caused decrease in carcinogenic lineage in concentrations 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Samples of Pelotas and Rio Grande showed promising results in combating tested lineage.

Key-words: cancer; phenolic compounds. *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*.

Lista de figuras

Figura 1	Diferentes tipos de própolis: a) própolis verde; b) própolis vermelha; c) própolis marrom.....	21
Figura 2	Estrutura química dos carotenoides mais encontrados em alimentos.....	25
Figura 3	Estruturas químicas de compostos fenólicos presentes em própolis.....	26
Figura 4	Estrutura química básica dos flavonoides e suas subclasses.....	27
Figura 5	Estrutura química da quercetina, flavonoide presente na própolis.....	27
Figura 6	Estrutura química dos ácidos fenólicos: a) ácido hidroxibenzóico: ácido gálico (R1 = R2 = OH), ácido p-hidroxibenzóico (R1 = R2 = H), ácido vanílico (R1 = OCH3, R2= H), ácido siríngico (R1 = R2 = OCH3). b) ácido hidroxicinâmico: ácido p-cumárico (R1 = R2 = H), ácido cafeico (R1 = OH, R2 = H), ácido ferúlico (R1 = OCH3, R2 = H).....	29
Figura 7	Diferenças na parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	32
Figura 8	Parede celular das bactérias Gram-negativas.....	32
Figura 9	Imagem de um melanoma da epiderme que se apresenta como uma mancha de coloração escura.....	36
Figura 10	Mapa do Rio Grande do Sul, dividido em sete mesorregiões.....	39
Figura 11	Sistema de cor CIELAB.....	51
Figura 12	Fotografia da coloração de amostras de própolis após trituração.....	52
Figura 13	Gráfico do espectro de absorção no UV-visível de extratos hidroalcoólicos de própolis de diferentes regiões.....	59

Figura 14	Gráfico da viabilidade das células de linhagem de melanoma de camundongo B16F10 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos de própolis, após 48h.....	70
Figura 15	Gráfico da viabilidade das células de linhagem de melanoma de camundongo B16F10 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos de própolis, após 72h.....	72

Lista de tabelas

Tabela 1	Classificação da própolis brasileira de acordo com as características físico-químicas.....	20
Tabela 2	Teor de umidade, análise de condutividade e rendimento das amostras de própolis.....	49
Tabela 3	Coloração da própolis bruta de cidades do sul do RS obtidas em 2013, pelo sistema CIELAB.....	52
Tabela 4	Teor total de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides de extratos de própolis oriundos de diferentes cidades do RS.....	54
Tabela 5	Porcentagem e IC50 de extratos de própolis através da capacidade de sequestro do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	61
Tabela 6	Capacidade antioxidante dos extratos de própolis pelos métodos ABTS e FRAP.....	63
Tabela 7	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos hidroalcoólicos de própolis de cidades do Sul do RS.....	65

Lista de abreviaturas e siglas

ABTS	2,20-azino-bis (ácido 3 ethylbenzthiazoline-6-sulfônico)
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Analisy of variance (Análise de Variância)
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CAPE	Ester fenilil do ácido cafeico
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EEP	Extrato etanólico de própolis
EHP	Extrato hidroalcoólico de própolis
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (capacidade redutora de ferro)
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IC ₅₀	Concentração Inibitória média
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio
NCI	National Cancer Institute
OH	Hidroxila
PA	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
p53	Proteína tumoral 53
SFB	Soro fetal bovino
STEC	<i>Escherichia coli</i> Shiga Toxigênica
TPTZ	2,4,6- tripiridil-1,3,5-triazina
TROLOX	2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Hipóteses.....	18
4. Revisão bibliográfica.....	19
4.1 Própolis.....	19
4.2 Influência da origem botânica.....	22
4.3 Fitoquímicos da própolis.....	24
4.4 Propriedades biológicas da própolis.....	29
4.4.1 Capacidade antioxidante.....	29
4.4.2 Atividade antimicrobiana.....	31
4.4.3 Efeito citotóxico.....	35
5 Materiais e métodos.....	38
5.1 Materiais.....	38
5.1.1 Amostras de própolis.....	38
5.2 Métodos.....	40
5.2.1 Determinação da cor.....	40
5.2.2 Condutividade.....	40
5.2.3 Umidade.....	41
5.2.4 Preparação dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP).....	41
5.2.5 Potencial hidrogeniônico (pH).....	41
5.2.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	42
5.2.7 Determinação do teor de flavonoides	42
5.2.8 Determinação de carotenoides.....	43

5.2.9 Espectroscopia de absorção na região Ultravioleta-visível.....	43
5.2.10 Capacidade antioxidante.....	43
5.2.10.1 Ensaio de sequestro de radicais DPPH.....	43
5.2.10.2 Capacidade redutora de ferro (FRAP).....	44
5.2.10.3 Capacidade de remoção do radical ABTS.....	45
5.2.11 Atividade antibacteriana.....	46
5.2.12 Ensaio citotóxico.....	47
5.2.12.1 Tratamento celular.....	47
5.2.12.2 Ensaio de viabilidade celular.....	47
5.2.13 Análise estatística.....	48
6. Resultados e discussão.....	49
6.1 Análises físico-químicas.....	49
6.2 Análise colorimétrica.....	51
6.3 Fitoquímicos.....	54
6.4 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível.....	58
6.5 Capacidade antioxidante.....	60
6.5.1 Sequestro do radical DPPH.....	60
6.5.2 Capacidade antioxidante através do ABTS e FRAP.....	63
6.6 Atividade antibacteriana.....	64
6.7 Atividade citotóxica.....	70
7. Considerações finais.....	77
Referências.....	79
Apêndices.....	93

1. Introdução

A colmeia é fonte de produtos de alto valor nutritivo e com grandes potencialidades farmacológicas, como o mel, a própolis, o pólen, a cera, a geleia real e a apitoxina (LOPES, 2014). A própolis é um dos produtos apícolas que têm alcançado destaque internacional devido a sua composição química e propriedades biológicas e, apesar disso, ainda é pouco explorada em algumas regiões (CASTALDO, CAPASSO, 2002; PEREIRA et al., 2002).

A própolis é um produto elaborado pelas abelhas através de substâncias resinosas e gomosas, que são coletadas de brotos, flores e exsudados de plantas. As abelhas digerem parcialmente estes materiais através da ação das enzimas contidas nas suas secreções salivares, e após acrescentam ainda cera e pólen, formando assim a própolis (MARCUCCI, 1995; BRASIL, 2001; SILVA et al., 2012).

O significado da palavra própolis vem do Grego, pro “em defesa” e polis “a cidade”, ou seja, o material é utilizado como defesa para a colmeia, servindo para cobrir frestas, protegendo assim da entrada de invasores; no preparo de alvéolos assépticos para a postura da abelha rainha; para mumificação de insetos invasores quando estes não podem ser removidos, evitando a proliferação de micro-organismos patogênicos; além de atuar como isolante térmico para a colmeia (BARDANA, 1998; CASTALDO, CAPASSO, 2002; SALATINO et al., 2005; SILVA et al., 2006; TOSI et al., 2007).

A própolis vem sendo utilizada desde as civilizações antigas no tratamento de diversas doenças, devido as suas propriedades biológicas e terapêuticas (BANKOVA, 2005; MOREIRA et al., 2008; CARDOSO et al., 2010). Propriedades, como a antimicrobiana (MARCUCCI et al., 2001; UZEL et al., 2005; TOSI et al., 2007), anti-inflamatória (SILVA et al., 2012), antitumoral (FROZZA et al., 2013), cicatrizante (PARK et al., 1998), no combate à bactérias causadoras de cáries (ISHIDA, NEGRI, SALATINO, 2011), anestésica (MARCUCCI, 1995) e antioxidante (BANKOVA, 2005; MOREIRA et al., 2008), são atribuídas à complexa composição química, principalmente pela presença de fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, incluindo majoritariamente os

compostos fenólicos. Os benefícios atribuídos ao uso da própolis e de seus produtos têm sido considerados devido à presença de alguns compostos isolados e ao sinergismo entre compostos presentes (BANKOVA, DE CASTRO, MARCUCCI, 2000; MOREIRA et al., 2008).

A própolis é constituída basicamente por 50% de resina, 30% de cera e 5% de pólen, além de 10% de óleos essenciais e outros 5% de compostos diversos (BURDOCK, 1998; PARK et al., 2002). Pesquisas realizadas em diferentes países identificaram mais de 300 diferentes compostos em amostras de própolis (BANKOVA, DE CASTRO, MARCUCCI, 2000). Os compostos fenólicos presentes na própolis tem atraído muita atenção devido a sua relação com a atividade antioxidante, aos efeitos na proteção contra doenças coronárias, cardíaca e câncer, e recentemente, pelas evidências do efeito de inibição da invasão tumoral e da metástase (MIGUEL, ANTUNES, 2011; WENG, YEN, 2012).

O comércio da própolis no mercado nacional e internacional tem alcançado lugar de destaque, em parte devido ao grande número de pesquisas que revelam atividades biológicas atribuídas à sua composição química. Devido aos possíveis benefícios que a própolis proporciona à saúde, seu uso aumentou consideravelmente, passando inclusive a ser adicionada em alimentos e bebidas, e utilizada como um suplemento alimentar, fatores que auxiliaram para o aumento do valor agregado deste produto (SILVA, 2009).

Estudos demonstraram que amostras de própolis oriundas de regiões tropicais, especialmente brasileiras, apresentam diferenças na composição química em relação à própolis oriunda da zona temperada. O Brasil possui clima e vegetação que torna possível às abelhas produzirem uma própolis de alta qualidade, o que pode ser um diferencial dentre os países produtores. Mesmo a própolis brasileira apresenta variações na sua composição química e, portanto, nas suas propriedades biológicas, de acordo com as diferentes regiões do país onde são coletadas, e esta variação ocorre em virtude da grande biodiversidade de plantas encontradas no Brasil (PEREIRA et al., 2002). Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos pesquisadores de todo o mundo (TRUSHEVA et al., 2006).

Todavia, em comparação com outros países, como Argentina, China, Austrália e Bulgária, a produção de própolis no Brasil é muito baixa, por ser ainda

pouco explorada e incentivada, e faltam estudos sobre os diferentes tipos de própolis brasileira. Para valorizar economicamente o produto e torná-lo mais explorável industrialmente, é essencial assegurar a padronização química, qualidade e segurança deste produto (BANKOVA, 2005).

Diversos fatores externos proporcionam alterações nas características físicas, químicas e sensoriais da própolis, influenciando diretamente nas suas propriedades químicas e biológicas. Os principais agentes causadores desta variação são: as espécies vegetais e sua origem botânica; a localização geográfica; a época do ano; a espécie de abelha (no caso brasileiro também o grau de "africanização" da *Apis mellifera*); e da forma de coleta e extração do produto (SFORCIN et al., 2000; MURAD et al., 2002; TRUSHEVA et al., 2006; SILVA, 2009; CARDOSO et al., 2010; FROZZA et al., 2013).

Por esta razão, se tornam muito importantes pesquisas que caracterizem a própolis de diferentes microrregiões brasileiras, distinguindo a composição e a atividade biológica das amostras, e assim, sua melhor aplicação. Em função disso, este estudo visa à caracterização química de amostras de própolis oriundas da região Sul do Rio Grande do Sul, avaliando sua capacidade antioxidante, ação antibacteriana e efeito citotóxico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar o teor dos principais fitoquímicos e testar a atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica de extratos hidroalcoólicos de própolis oriundas da região Sul do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a própolis bruta quanto à coloração, condutividade e teor de umidade;
- Caracterizar os extratos hidroalcoólicos das própolis quanto ao teor de compostos fenólicos, de flavonoides e de carotenoides;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das própolis através dos métodos: capacidade redutora de ferro (FRAP), capacidade de remoção do radical 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico) (ABTS) e capacidade de sequestro do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DDPH);
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos das própolis frente às bactérias patogênicas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e Gram-negativa *Escherichia coli*, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Avaliar o efeito citotóxico dos extratos hidroalcoólicos das própolis na linhagem de melanona (B16F10) através do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) nos tempos de 48 e 72h.

3. Hipóteses

Amostras de própolis procedentes de cidades do sul do estado do Rio Grande do Sul apresentam alto teor de fitoquímicos, principalmente compostos fenólicos da classe dos flavonoides, e por isso possuem alta capacidade antioxidante, atividade antibacteriana frente à bactérias patogênicas e efeito citotóxico em células de melanona.

4. Revisão bibliográfica

4.1 Própolis

Produtos apícolas têm despertado grande interesse em todas as partes do mundo, não somente pela produção de mel, mas também de própolis, geleia real, cera, pólen e apitoxina (SILVA et al., 2012). No Brasil, a atividade apícola está presente em todos os estados (IBGE, 2014), sendo que na produção e exportação de própolis destacam-se os Estados de Minas Gerais e São Paulo (SEBRAE, 2013). No entanto, não se tem dados oficiais sobre a quantidade de própolis produzida anualmente no Brasil.

Dentre os desafios para tornar a apicultura uma atividade profissional e alcançar maior competitividade no mercado nacional, destaca-se a melhor organização da cadeia produtiva, uma maior utilização de tecnologias que aumentem a produtividade, investimento em tecnologia nos apiários e qualificação do apicultor, implantação de gestão técnica e financeira nos apiários, adequação às normas de produção de qualidade, e a necessidade de pesquisas e estudos sobre a flora apícola das diferentes regiões do Brasil (SEBRAE, 2013).

Este produto natural vem sendo utilizado há séculos para diversas finalidades: os egípcios a utilizavam para embalsamar os mortos, os gregos na cicatrização de ferimentos e os romanos para amenizar dores e diminuir inchaços (CASTALDO, CAPASSO, 2002; PEREIRA et al., 2002). Atualmente, a própolis tem grande importância para uso veterinário no tratamento de mastite bovina e na cicatrização de cortes; na agricultura, no combate à doenças pós-colheita dos frutos; na produção de cosméticos vem sendo utilizada em cremes, xampu e sabonetes; na indústria de alimentos aplicada em bebidas, alimentos saudáveis e suplementos nutricionais; e na indústria farmacêutica na forma de xaropes, pastilhas, cápsulas e extratos (CASTALDO, CASSAPO, 2002; ORDÓÑEZ et al., 2011; ALVES, KUBOTA, 2013).

Park et al. (2000) classificaram a própolis brasileira em 12 grupos, de acordo com suas características físico-químicas (Tabela 1), destacando a maior diversidade entre as amostras das regiões Nordeste (6) e Sul (5) e em razão da variação na vegetação. Em 2007 um novo tipo de própolis, denominada de

“própolis vermelha”, foi encontrada em manguezais no litoral da região Nordeste, sendo classificada como grupo 13, tornando-se uma importante fonte de pesquisas nacionais e internacionais, inclusive alcançando altos valores comerciais (SILVA, 2009; FROZZA et al., 2013).

Tabela 1. Classificação da própolis brasileira de acordo com as características físico-químicas.

Extrato etanólico de Própolis			
Grupos	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem Geográfica
1 (RS 5)	Amarelo	63,0	Sul
2 (RS 1)	Castanho claro	57,5	Sul
3 (PR 7)	Castanho escuro	65,0	Sul
4 (PR 8)	Castanho claro	54,5	Sul
5 (PR 9)	Marrom esverdeado	58,7	Sul
6 (BA 11)	Marrom avermelhado	45,9	Nordeste
7 (BA 1)	Marrom esverdeado	43,8	Nordeste
8 (PE 5)	Castanho escuro	41,3	Nordeste
9 (PE 3)	Amarelo	46,7	Nordeste
10 (CE 3)	Amarelo escuro	24,1	Nordeste
11 (PI 1)	Amarelo	23,1	Nordeste
12 (SP, MG 12)	Verde/marrom esverdeado	61,0	Sudeste
13 (AL, BA, PB 13)	Vermelha		Nordeste

(RS: Rio Grande do Sul; PR: Paraná; BA: Bahia; PE: Pernambuco; CE: Ceará; PI: Piauí; SP: São Paulo; MG: Minas Gerais; AL: Alagoas; BA: Bahia; PB: Paraíba).

Fonte: adaptado de PARK et al., 2000.

Os compostos encontrados na própolis são variáveis de acordo com as plantas utilizadas pelas abelhas para a polinização o que acaba interferindo na sua aparência, tanto em termos de coloração quanto de textura (Figura 1). Em períodos de difícil coleta de resinas nas plantas, as abelhas acrescentam maior quantidade de cera, o que confere maior maleabilidade à própolis. Uma consistência mais rígida é indicativa de maior presença de resinas, sendo desejável, pois as atividades biológicas verificadas na própolis têm sido atribuídas às substâncias contidas nas resinas (BARDANA, 1998).



Figura 1. Diferentes tipos de própolis: a) própolis verde; b) própolis vermelha; c) própolis marrom. Fonte: adaptado de SILVA, 2009.

A cera é composta por uma mistura de ácidos graxos, ceroleína, vitamina A e outras substâncias, que conferem as propriedades bactericidas, emolientes, cicatrizantes e anti-inflamatórias deste produto, sendo muito empregada na indústria cosmética e farmacêutica pelas suas propriedades (LOPES, 2014).

A coleta da própolis, normalmente, é feita através de raspagem da tampa da caixa que contém a colmeia, mas atualmente já existem técnicas que visam aumentar o rendimento e diminuir o risco de contaminação, como o uso de telas coletoras, que facilitam a retirada da própolis e preservam sua qualidade (MENDONÇA, 2011). As épocas de maior produção de própolis são registradas na primavera e no outono (LOPES, 2014).

Após a coleta, a própolis bruta passa por um processo de purificação, para que fique isenta de compostos que não sejam solúveis em solventes orgânicos ou que não sejam digeríveis (CASTALDO e CAPASSO, 2002). Alguns autores afirmam que a extração com água pode originar um produto com um baixo teor em espécies alergênicas (ALIBONI et al., 2011), e segundo Park et al. (1998) com baixo teor de flavonoides, não apresentando atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. De acordo com Silva et al. (2012), o uso de solventes muito polares como a água, reduz sua solubilidade, pois a própolis possui compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo mais apropriado o uso de solventes de polaridade intermediária, como o álcool. Segundo Cabral et al. (2009), a escolha do solvente têm influência nos extratos de própolis, incluindo o teor de compostos fenólicos e a atividade biológica.

Misturas de etanol e água têm sido mais comumente utilizadas para dissolver a resina e remover as ceras presentes na própolis bruta (PARK et al.,

1998; ALIBONI et al., 2011). Dos Santos et al. (2003), determinaram a melhor concentração alcoólica para se obter extratos de própolis com maior atividade antimicrobiana, de 50 a 90% de etanol. Park et al. (1998), realizaram a extração de flavonoides em extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) com diferentes concentrações de etanol, e testaram sua atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatório, encontrando os melhores resultados com a concentração de etanol 80%.

No Brasil a legislação que regulamenta e aprova os produtos apícolas (Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis) através de suas características físico-químicas, é a Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A legislação estabelece para a própolis valores padrões para a quantidade de flavonoides, compostos fenólicos, características sensoriais (aroma, cor, sabor, consistência e granulometria), além do teor de cinzas, ceras e de sólidos solúveis, entre outros critérios (BRASIL, 2001).

4.2 Origem botânica da própolis

A origem botânica da própolis confere ao produto variações na composição físico-química. A fonte vegetal utilizada pelas abelhas em países da América do Sul, especialmente no Brasil, é muito diferente da encontrada em outros países, o que torna a composição química da própolis brasileira diferenciada das demais (BANKOVA, DE CASTRO, MARCUCCI, 2000; MARCUCCI et al., 2001). No entanto, o Brasil por apresentar ampla diversidade vegetal tem a correlação do tipo de própolis com a origem botânica dificultada, o que fez com que até o presente momento apenas alguns tipos de própolis tivessem sua origem botânica identificada (PARK et al., 2002).

A própolis produzida no Brasil possui como principais fontes botânicas a *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim), *Eucalyptus citriodora*, *Araucaria aungustifolia*, *Hyptis divaricata* (família *Lamiaceae*), *Populus nigra* e a *Dalbergia ecastophyllum*. A própolis oriunda da região Sul do Brasil caracteriza-se pela riqueza em

flavonoides, tendo como a principal origem botânica identificada a *Myrceugenia eurosma* (Myrtaceae), sendo seu cultivo encontrado em maior abundância em regiões da fronteira com o Uruguai (DAUGSCH et al., 2007). Segundo Marcucci e Bankova (2000), a própolis oriunda da região Sudeste do Brasil possui como principal resina o gênero *Baccharis dracunculifolia*, cuja origem botânica é o alecrim-do-campo, que é encontrada exclusivamente no Estado de Minas Gerais, no leste de São Paulo, norte do Paraná e regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro.

A própolis vermelha pode ser encontrada no Brasil, em Cuba e no México, sendo coletada a partir das espécies de jacarandá (*Dalbergia spp.*); este produto caracteriza-se pela presença de flavonoides em sua composição (LOPES, 2014). A origem botânica da própolis vermelha oriunda do estado de Alagoas é a *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como rabo-de-bugio (MENDONÇA, 2011).

Nos países da Europa, América do Norte e oeste da Ásia encontra-se como principal fonte vegetal para a própolis o choupos (*Populus sp.*), espécie que não é nativa em países tropicais como o Brasil (LUSTOSA et al., 2008). Mesmo não sendo nativa, esta espécie já foi identificada como a principal fonte vegetal em pesquisas com amostras de própolis marrom de regiões Sul do Brasil, Venezuela, Argentina e Uruguai. A justificativa ocorre porque a *Populus alba* mesmo não sendo nativa dos trópicos pode ser encontrada em regiões de clima ameno, e as abelhas acabam preferindo este tipo de resina, o que pode ser atribuída as características genéticas de cada espécie de abelha (Park et al., 2002). No entanto, estudos da composição das resinas utilizadas pelas abelhas na Venezuela e no Brasil demonstraram uma composição química diferenciada, por não apresentarem os flavonoides presentes na choupos (MARCUCCI et al., 2001; ISHIDA, NEGRI, SALATINO, 2011).

Espécies vegetais como a aroeira, alecrim, assa-peixe, acácia e eucalipto também são utilizadas pelas abelhas na produção da própolis em regiões brasileiras (MENDONÇA, 2011).

De acordo com pesquisas, alguns fitoquímicos encontrados na própolis estão presentes em todos os tipos de própolis, mas outros somente são encontrados em própolis coletadas de determinadas espécies vegetais (VARGAS

et al., 2004). Por isso é muito importante elucidar quais são as plantas utilizadas como fonte de resinas na elaboração da própolis.

4.3 Fitoquímicos da própolis

Os fitoquímicos são um grande grupo de substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, exercendo importante ação na interação com o meio ambiente, além dos impactos positivos proporcionados à saúde. A grande maioria destes compostos possui ação antioxidante, protegendo as células dos danos causados por radicais livres e, prevenindo contra algumas doenças como câncer, doenças inflamatórias, degeneração neurológica e doenças cardiovasculares (FRAGA et al., 2010).

O metabolismo secundário pode ser dividido em três grandes classes de compostos: alcaloides, terpenos e compostos fenólicos. A classe dos alcaloides é derivada de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) e inclui alguns compostos que atuam na defesa das plantas contra os parasitas e herbívoros (MITHEN et al., 2000).

Os terpenos são derivados do ácido malônico ou do piruvato 3-fosfoglicerato, exercendo função no crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesta classe estão os carotenoides, que atuam como pigmentos para absorção de luz durante a fotossíntese devido às duplas ligações conjugadas, conferindo as colorações amarela, laranja ou vermelho, sendo responsáveis pela pigmentação de grande número de frutas, folhas e flores (UENOJO, MAROSTICA JUNIOR, PASTORE, 2007). Os carotenoides atuam também como fotoprotetores contra danos oxidativos, interagindo e inativando eletronicamente os radicais livres através da absorção de energia do oxigênio singlete, formando oxigênio na forma fundamental ($^3\text{O}_2$) e carotenoide na forma excitada ($^3\text{CAR}^*$), o qual pode facilmente voltar ao estado fundamental, dissipando a energia absorvida na forma de calor (UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007).

Estes compostos possuem oito unidades de isoprenos unidos por ligações duplas conjugadas, e devido ao alto grau de insaturação da molécula tornam-se instáveis quando expostos a luz, calor, pH ácido e O_2 . A isomerização torna os

carotenoides trans (forma habitual) para as formas cis, resultando em perdas de cor e atividade de provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA,1999). Esses compostos são classificados em dois grupos: os carotenos que são exclusivamente compostos por hidrocarbonetos; e as xantofilas, que possuem oxigênio em sua molécula. Alguns carotenoides são precursores da vitamina A, ou seja, apresentam pelo menos 1 anel β -ionona ligado a uma cadeia poliênica de 11 carbonos. O carotenoide com maior potencial pró-vitâmico A é o β -caroteno (Figura 2), que pode ser convertido em 2 moléculas de vitamina A. Os carotenoides α -caroteno e a β -criptoxantina podem ser convertidos em uma molécula de vitamina A, porém a luteína, a zeaxantina e o licopeno não possuem atividade provitamina A (Figura 2) (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

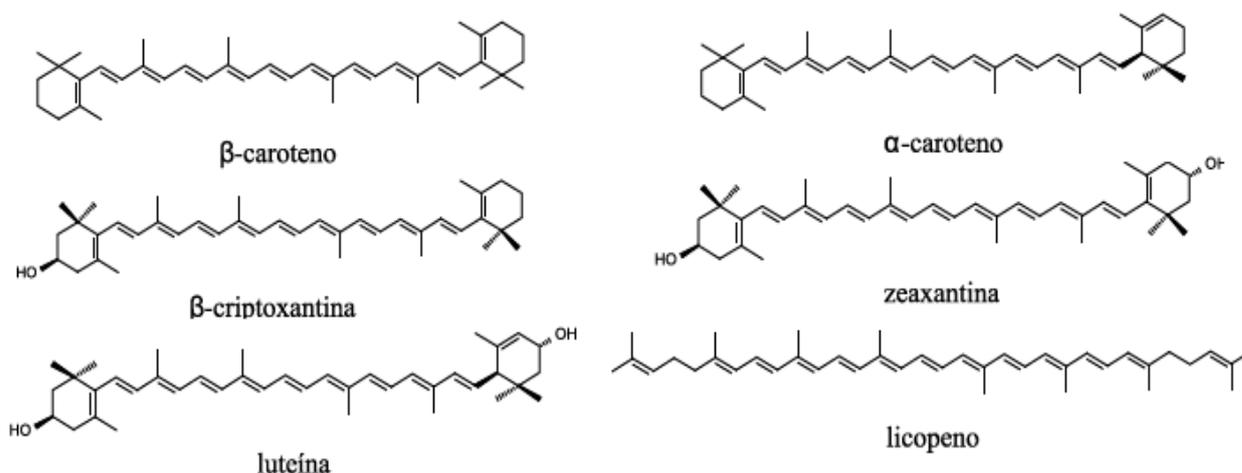


Figura 2. Estrutura química dos carotenoides mais encontrados em alimentos.
Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008.

No entanto, dentre os principais fitoquímicos presentes na própolis, os compostos fenólicos são o grupo mais importante. São sintetizados pelas plantas durante seu desenvolvimento, e participam de diferentes processos como lignificação, pigmentação, crescimento, resistência em situações de estresse, radiação Ultravioleta, micro-organismos patogênicos, além de atuarem como atrativos para animais polinizadores, como as abelhas (MARCUCCI, 1995). Diversos estudos investigaram os compostos fenólicos presentes na própolis, e entre os mais comumente encontrados estão: quercetina, kaempferol, pinocembrina, ácido cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeíco e seus

ésteres, ácido cinâmico, galangina, apigenina, crisina, tectocrisina e luteolina (Figura 3) (MARCUCCI et al., 2001; CHAILLOUA, NAZARENO, 2009; GÜLÇİN et al., 2010).

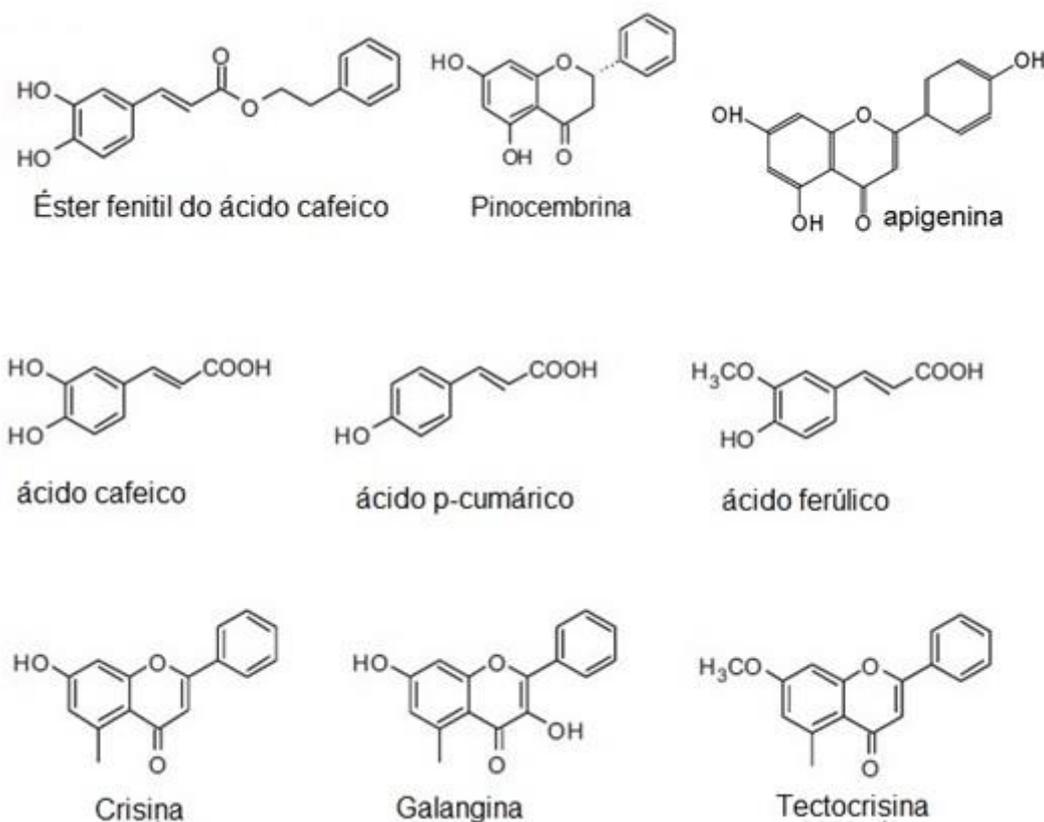


Figura 3. Estruturas químicas de compostos fenólicos presentes em própolis.
Fonte: Adaptado de Miguel, Antunes (2011).

Estas substâncias são obtidas a partir de hidratos de carbono através da via do acetato e do chiquimato (fenilpropanóide), apresentando diferentes estruturas, porém todas tem em comum um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila (OH). Estes compostos são classificados de acordo com a sua estrutura básica (Figura 4) em flavonoides (flavonas, flavonois, flavanonas, flavanonais, flavanois, antocianidinas, isoflavonas, e chalconas) e não flavonoides (ácidos fenólicos) (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; FRAGA, 2010). Podem ser encontrados nos vegetais na forma livre ou ligados a proteínas e açúcares (ANGELO; JORGE, 2007).

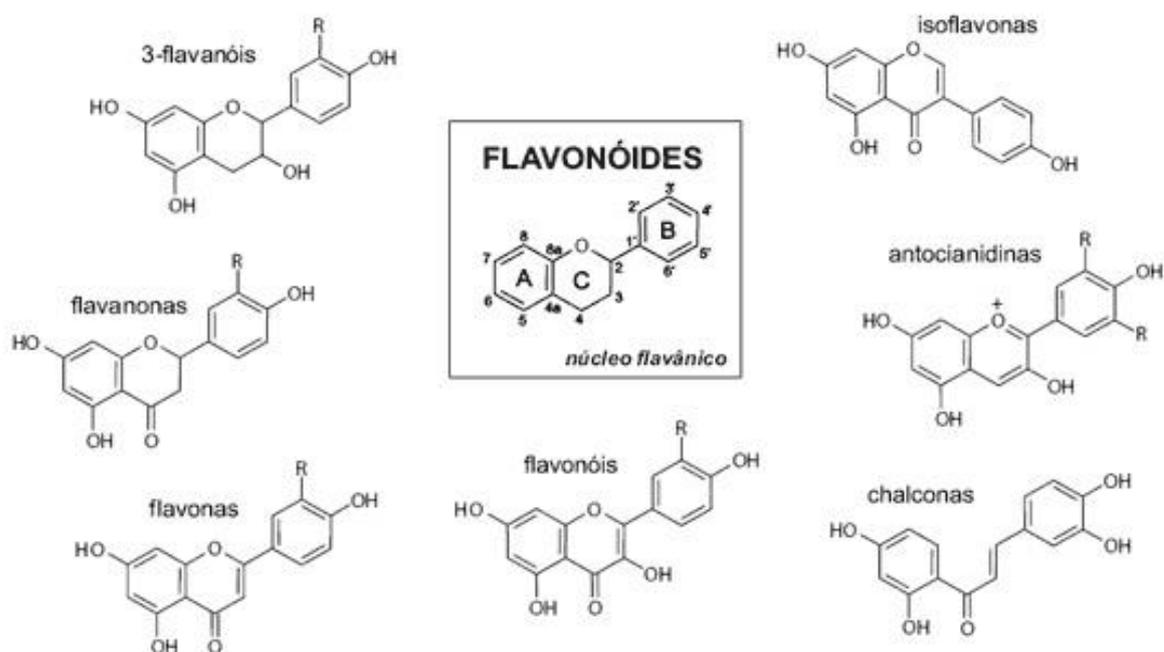


Figura 4. Estrutura química básica dos flavonoides e suas subclasses.
Fonte: ÂNGELO; JORGE, 2007.

A síntese dos compostos fenólicos inicia com a produção de aminoácidos com anel aromático, como a fenilalanina, produzida durante a via do ácido chiquímico (Figura 5), que posteriormente, recebe uma cadeia lateral de três carbonos, o qual é sintetizado a partir da fenilalanina na primeira etapa na biossíntese de fenilpropanóides. (AKATSU, 2009).

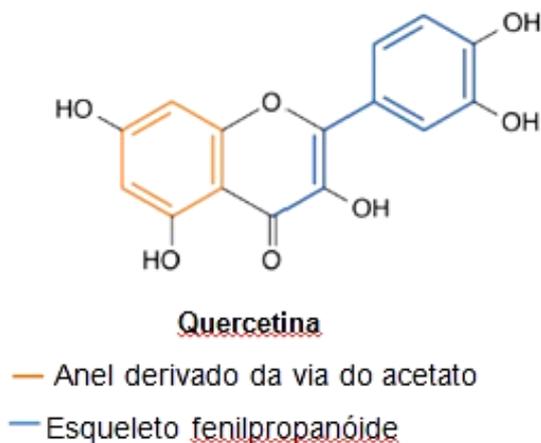


Figura 5. Estrutura química da quercetina, flavonoide presente na própolis.
Fonte: adaptado de de la ROSA, ALVAREZ-PARRILLA, GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010.

Os flavonoides compreendem uma subclasse de compostos fenólicos muito encontrados nas resinas utilizadas para a produção da própolis, apresentando-se como o maior grupo de substâncias isoladas da própolis. Sua estrutura básica é composta por 15 carbonos (C6-C3-C6) com 2 anéis aromáticos (A e B), unidos por três carbonos, formando um anel heterocíclico (C) (ANGELO; JORGE, 2007). O anel C dos flavonoides apresenta uma dupla ligação entre as posições 2 e 3, uma cetona na posição 4 e um grupamento OH na posição 3 do segundo anel. Dentre os flavonoides agliconas, os mais comuns são a quercetina e o kaempferol (FRAGA, 2010). As flavononas, grupo pertencente aos flavonoides, se caracterizam pela falta de um açúcar (aglicona), têm origem nos exsudatos de plantas, e ligadas às flavonas são considerados como parte responsável pela atividade biológica da própolis (ALVES, KUBOTA, 2013).

Estudos têm indicado os flavonoides como os responsáveis pela ação antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória da própolis (MENDONÇA, 2011). Segundo Park et al. (1998), durante a coleta da própolis, onde as abelhas acrescentam à cera suas secreções salivares contendo a enzima β -glicosidase, ocorre a hidrólise dos flavonoides glicosilados em flavonoides agliconas. Segundo Kuskoski et al. (2004), a eficácia dos flavonoides é atribuída ao grau de hidroxilação, e portanto, diminui com a substituição das hidroxilas por açúcares, e por isso os glicosídeos possuem menor atividade antioxidante que suas agliconas correspondentes.

Os ácidos fenólicos pertencem à classe dos não flavonoides caracterizam-se pela presença de um anel aromático, um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila e um grupamento carboxílico. São subdivididos em dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Dos ácidos hidroxibenzóicos derivam o ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico com estrutura disposta na configuração C6-C1 (Figura 6a), derivado do ácido benzóico. Como derivados do ácido hidroxicinâmico tem-se o ácido caféico, ferúlico e p-cumárico, dispostos estruturalmente na configuração C6-C3 (Figura 6b) (TAIZ; ZEIGER, 2004; ANGELO; JORGE, 2007).

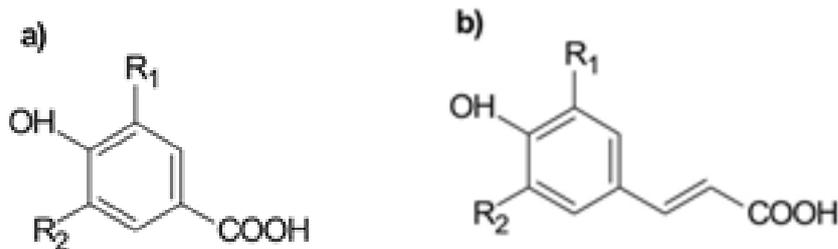


Figura 6. Estrutura química dos ácidos fenólicos: a) ácido hidroxibenzóico: ácido gálico ($R_1 = R_2 = OH$), ácido p-hidroxibenzóico ($R_1 = R_2 = H$), ácido vanílico ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$), ácido siríngico ($R_1 = R_2 = OCH_3$). b) ácido hidroxicinâmico: ácido p-cumárico ($R_1 = R_2 = H$), ácido cafeico ($R_1 = OH$, $R_2 = H$), ácido ferúlico ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$).

Fonte: ÂNGELO; JORGE, 2007.

4.4 Propriedades biológicas da própolis

4.4.1 Capacidade antioxidante

Os radicais livres são formados pela perda ou ganho de elétrons, apresentando ao menos um elétron não pareado na sua camada externa (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2000). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante que pode causar uma série de mudanças fisiológicas, denominadas de estresse oxidativo (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2000).

O estresse oxidativo origina um excesso de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), causando redução da velocidade de remoção destas espécies. Este desequilíbrio provoca uma série de reações envolvidas no desenvolvimento de várias doenças crônicas, como câncer, doenças cardíacas, diabetes e envelhecimento, com início na oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (SHAMI, MOREIRA, 2004; DIAS, MOURA, D'ANGELIS, 2011).

O radical OH é o mais potente oxidante entre as EROs, com um tempo de vida muito curto e alta reatividade a diversas moléculas orgânicas, devido a falta de um elétron para sua estabilização (DIAS, MOURA, D'ANGELIS, 2011). Porém, apesar das EROs causarem a oxidação de macromoléculas e estarem envolvidas em diversas patologias, elas também atuam na defesa contra a infecção,

estimulando os fagócitos a produzirem as EROs para a destruição dos micro-organismos (DIAS, MOURA, D'ANGELIS, 2011).

A própolis contém diversas substâncias com capacidade antioxidante, dentre as quais destacam-se as do grupo dos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (DEGASPARI, WASZCZYNSKYJ, 2004; SILVA, 2009). Vários estudos relatam uma correlação positiva entre a presença destes compostos e a atividade antioxidante (LOPES, 2014). Chailloua e Nazareno (2009), relacionaram a alta atividade antioxidante da própolis com o teor de quercetina, ácido siríngico, kaempferol, ácido caféico, ácido clorogênico e ácido 3-4 dihidroxibenzóico (RUSSO et al., 2002).

Estes compostos minimizam a peroxidação lipídica, interferindo não apenas na propagação e formação dos radicais livres, mas quelando metais, inibindo enzimas envolvidas no início da reação, e podem ainda inibir o dano oxidativo resultante da reação de Fenton (RUSSO et al., 2002; FROZZA et al., 2013). A reação de Fenton consiste na reação entre Fe^{2+} e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conhecida como a reação de Fenton, que gera os radicais OH que possuem elevado potencial de oxirredução, atacando indistintamente todas as espécies presentes no meio reacional (AGUIAR et al., 2007).

Alguns compostos fenólicos possuem a capacidade de quelar metais de transição, evitando que radicais livres se formem na presença de metais. Eles podem inibir a oxidação por metais e a formação de radicais de oxigênio, por coordenação com Fe^{2+} , aumentando a auto-oxidação de Fe^{2+} , ou formando complexos inativos, com interação mais fraca. O desencadeamento dessas reações de oxidação ocorre quando íons metálicos ativos como Cu^+ ou Fe^{2+} interagem com o H_2O_2 para formar o radical OH^* (JOMOVA, VALKOB, 2011). O ferro e o cobre são metais de transição que possuem a capacidade de catalisar a formação de lesões oxidativas decorrentes da produção do radical OH (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 2000).

A atividade antioxidante dos flavonoides e ácidos fenólicos é determinada por suas estruturas, particularmente pelo deslocamento do elétron do núcleo aromático. O deslocamento do elétron ganha e a estabilidade conferida pelo efeito da ressonância do núcleo aromático previnem a continuação da reação em cadeia do radical livre (TSAO, DENG, 2004).

Diversas técnicas são encontradas para avaliar a atividade antioxidante de compostos e misturas. Os métodos mais comuns para determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível envolvem um radical cromóforo que simula as EROs, e se à presença de antioxidantes leva ao desaparecimento da cor destes radicais (ARNAO, 2000).

4.4.2 Atividade antimicrobiana

Atualmente, o uso indiscriminado de antibióticos tem propiciado a seleção de bactérias resistentes, e ainda tem tornado possível a transferência de genes de resistência em bactérias ainda não expostas aos medicamentos (ANDRADE, 2010).

A conscientização por parte dos consumidores para uma alimentação sem o uso de conservantes sintéticos, fez com que se tornassem necessárias mais pesquisas para agentes antimicrobianos mais eficientes e com menos efeitos adversos na saúde humana (FRANCO et al., 2007). Esta realidade atual despertou o interesse de pesquisas para a descoberta de novas substâncias conservantes com efeito antimicrobiano, menos agressivo, e os compostos naturais, elaborados a partir de matérias-primas como a própolis podem ser uma alternativa futura para utilização como antimicrobiano.

O efeito inibitório da própolis de diversas regiões está sendo amplamente estudado contra uma variedade de bactérias, apresentando até o momento maior efetividade nas espécies Gram-positivas na tentativa de substituir drogas convencionais (Figura 7) (CARDOSO et al., 2010). Estes resultados têm sido atribuídos às diferenças na estrutura celular das bactérias Gram negativas em comparação das Gram positivas, como a presença do lipopolissacarídeo nas Gram-negativas.

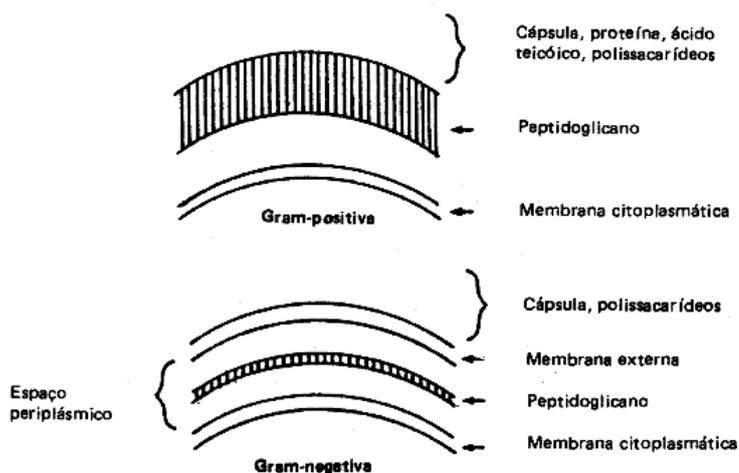


Figura 7. Diferenças na parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Fonte: FOX, 2010.

O lipopolissacarídeo é composto por três partes: um antígeno O, uma parte central contém alguns açúcares (heptoses e cetodeoxioctanato), não encontrado em outro lugar na natureza e uma região interna de lipídio A contendo ácidos graxos β -hidroxílicos (incomuns na natureza) (figura 8) (VARGAS et al., 2004; JÚNIOR et al., 2006).

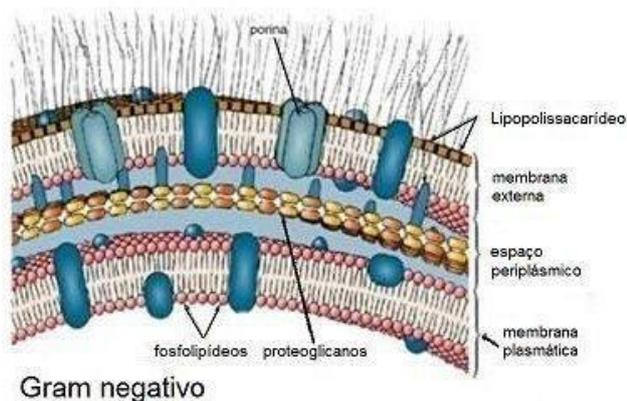


Figura 8. Parede celular das bactérias Gram-negativas

Fonte: Fox, 2010.

Pesquisas evidenciam ação inibitória da própolis contra as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus* sp. e *Micobacterium* sp., e as Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Klebsiella*. No entanto, a maior parte dos estudos que

avaliaram a atividade antibacteriana da própolis frente a bactérias Gram-negativas encontrou baixa atuação dos extratos testados (VARGAS et al., 2004; FERNANDES JR et al., 2006).

A atividade fungicida deste produto também foi investigada *in vitro*, sendo efetiva em vários fungos, como por exemplo, contra o *Candida albicans* (LUSTOSA et al., 2008).

A ação antibacteriana e antifúngica da própolis é atribuída principalmente à presença de flavonoides, como à flavona pinocembrina, o flavonol galangina e ao éster feniletil de ácido caféico (CAPE), juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas (UZEL et al., 2005).

A sinergia entre a própolis e alguns antibióticos como benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, foram relatadas em algumas pesquisas, evidenciando seu uso como uma alternativa no combate à micro-organismos resistentes a drogas (LUSTOSA et al., 2008).

Segundo um estudo realizado por Park, Alencar e Aguiar (2002), com própolis de diversos estados do Brasil, a própolis oriunda do Rio Grande do Sul é uma das que apresentou melhor ação antimicrobiana, juntamente com a própolis encontrada nos estados da Bahia e Minas Gerais.

Staphylococcus aureus é um patógeno Gram-positivo, produtor de enterotoxinas e causador de intoxicação alimentar, sendo um dos agentes etiológicos mais envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's). Sua presença em plantas de processamento de alimentos é indicativa de contaminação por manipuladores (TORTORA, 2005). Também possuem capacidade de adquirir resistência genética a antimicrobianos e metais pesados, devido à capacidade de adaptação e resistência a antibióticos, tornando-se uma das espécies de maior importância em infecções hospitalares (SANTOS et al., 2007). Segundo Kujumgiev et al. (1999), *S. aureus* é uma das estirpes bacterianas mais resistentes e, por isso é amplamente utilizada na análise de resistência antibacteriana.

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, causadora de Listeriose responsável por casos de meningite e septicemia, encefalite e infecção cervical em gestantes, podendo causar até mesmo o aborto. Está amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada em vários tipos de alimentos,

principalmente em produtos lácteos, até mesmo após tratamentos térmicos ou químicos (TORTORA, 2005). Estas bactérias possuem a habilidade de sobreviver em ambientes extremos, com ocorrência em áreas rurais e urbanas (SILVA et al., 2006).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, habitante comum do trato intestinal dos seres humanos e causador de diarreia, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos. É um indicador de contaminação fecal quando presente em água e alimentos, e por não apresentar muita resistência ao calor, sua presença em alimentos processados indica falhas no processamento ou ocorrência de contaminação cruzada. Apesar de normalmente não ser patogênica, pode causar infecção do trato urinário, além de que cepas produtoras de enterotoxinas podem causar DTA's (TORTORA, 2005).

Há seis principais grupos de *E. coli* patogênicas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC ou EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC), as quais são responsáveis por um amplo conjunto de doenças, que variam de diarreias brandas à colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU), que causa falência dos rins, podendo levar à morte (FRANCO, LADGRAF, 1996).

A *E. coli* O157:H7 é uma bactéria enterohemorrágica que compõe o grupo das STEC, e um dos mais importantes micro-organismos responsáveis pelas DTA's, gerando um número considerável de vítimas, principalmente pacientes imunodeprimidos. O principal reservatório é o bovino e o meio de transmissão mais comum é o consumo de alimentos contaminados, como carne cruas ou mal cozidas e o leite cru. O grande número de casos em alimentos frescos de origem animal é indicativo de manipulação em condições de higiene precária ou armazenamento inadequado (BARROS et al., 2013).

A concentração inibitória mínima (CIM) é um método quantitativo de atividade antimicrobiana, que consiste na concentração mínima da substância testada capaz de inibir o micro-organismo de interesse. A técnica utiliza diferentes concentrações do extrato em uma placa de microdiluição contendo uma suspensão padronizada do micro-organismo a ser testado. A partir das diluições do extrato que não apresentam crescimento, pode-se repicar para placa de ágar e

verificar a concentração bactericida mínima (CBM) que é a concentração de extrato capaz de inibir o crescimento, mas também inativar o micro-organismo (BISCAIA, 2007). Esta técnica tem sido utilizada em diversos estudos (JÚNIOR et al. 2006; FERNANDES et al., 2007; LONGHINI et al. 2007; TUKMECHI; OWNAGH; MOHEBBAT, 2010).

4.4.3 Efeito citotóxico

O câncer representa a segunda causa de morte no Brasil, somente perdendo para as doenças cardiovasculares. Fatores ambientais, alimentares e/ou estilo de vida têm sido associados ao aumento do risco da doença (BARROS, OPPERMAN, 2014; INCA, 2014). A formação do câncer é um processo complexo, ocorrendo em várias etapas com diferentes alterações celulares, apresentando como características o crescimento celular desordenado e acelerado (MATSUZAKI et al., 2006). Segundo Barros, Oppermann (2014), a incidência de câncer deve crescer mais de 75% até o ano de 2030 nos países desenvolvidos, e mais de 90% nos países em desenvolvimento. Por isso, há uma crescente busca por alternativas eficazes para prevenção e tratamento do câncer.

De acordo com vários estudos, a própolis, devido principalmente aos compostos fenólicos presentes, exercem um efeito protetor contra várias linhagens celulares, principalmente o câncer de pele, mas também de cólon, pâncreas, colo do útero, pulmão, entre outros. Dentre os mecanismos de ação já relatados incluem-se a parada do ciclo celular, a indução de apoptose e inibição da proliferação de células cancerígenas e do crescimento do tumor (LOPES, 2014).

O câncer de pele é um dos tipos mais comuns de câncer humano, e de grande preocupação devido a sua incidência aumentar a um ritmo acelerado, representando atualmente o correspondente a 25% de todos os tumores malignos registrados no País (INCA, 2015). É mais comum em indivíduos com mais de 40 anos, sendo relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles que apresentam doenças cutâneas prévias. Indivíduos de pele clara, sensíveis à ação dos raios solares, ou com doenças cutâneas prévias, são as principais vítimas do

câncer de pele (NORA et al., 2004). Esse tipo de câncer pode apresentar neoplasias de diferentes linhagens, sendo que os mais frequentes são o carcinoma basocelular (70% dos casos), o carcinoma epidermóide (25% dos casos) e o melanoma (4% dos casos). O carcinoma basocelular é o menos agressivo, e juntamente com o carcinoma epidermóide são chamados de câncer de pele não melanoma, enquanto o melanoma e outros tipos, com origem nos melanócitos, são denominados de câncer de pele melanoma (MELNIKOVA, ANANTHASWAMY, 2005). O câncer de melanoma apesar de representar apenas 4% das neoplasias malignas desse órgão, é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2015).

O câncer de melanoma apesar de não ser o tipo mais comum de câncer de pele, é o mais agressivo e com elevada propensão para metástase. Este tipo de câncer ocorre nos melanócitos, células que produzem a melanina e são encontrados na epiderme (Figura 9) (NORA et al., 2004; KUDUGUNTI et al., 2010).

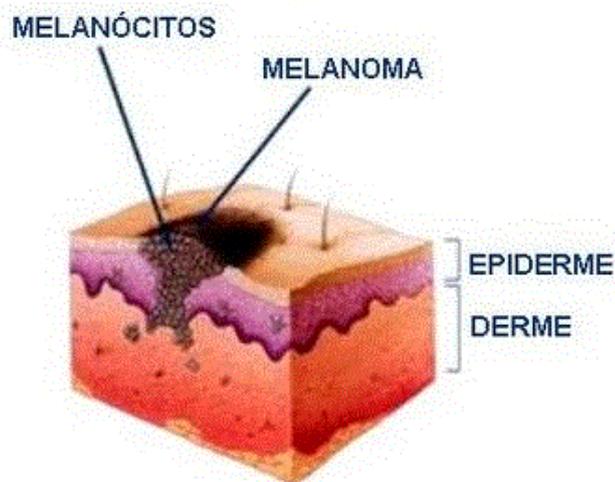


Figura 9. Imagem de um melanoma da epiderme que se apresenta como uma mancha de coloração escura.

Fonte: <http://cancer-de-pele.blogspot.com.br/>

Estudos epidemiológicos relatam um aumento significativo na incidência de câncer de melanoma nos países ocidentais, sendo que o número de casos mundiais dobrou nas últimas décadas (VALENTE et al., 2011). Novas fontes

naturais para produção de agentes quimioterápicos para o tratamento de melanoma tem se tornado alvo de pesquisas (KUDUGUNTI et al., 2010).

Segundo Castaldo, Capasso (2002), o consumo da própolis aumenta a resistência natural do corpo contra infecções, além de auxiliar no tratamento de úlceras gástricas. Sua aplicação direta sobre a pele também ameniza vários tipos de dermatite de origem bacteriana e fúngica. Gregoris et al. (2011) aplicaram amostras de própolis provindas da Itália em protetores solares, e os resultados demonstraram que a própolis e alguns de seus fitoquímicos podem ser utilizados em formulações de protetores solares devido as suas propriedades antioxidantes, atribuídas aos flavonoides, além de ter apresentado um amplo espectro de fotoproteção ultravioleta A (UVA) e ultravioleta B (UVB).

Dentre os flavonoides, a quercetina é um dos mais encontrados, estando presente em frutas, vegetais e em própolis. A quercetina possui uma ampla gama de propriedades farmacológicas, dentre as quais a capacidade de inibir sistemas enzimáticos de mamíferos e a capacidade de se ligar a ATP de um grande número de proteínas (CONSEIL et al., 1998). Estudos têm encontrado excelentes resultados utilizando este composto no combate ao câncer, inclusive o câncer de pele. Segundo Formica e Regelson (1995), este flavonoide conseguiu bloquear as etapas iniciais da formação do câncer de melanoma quando aplicado em ratos.

Braganhol et al (2006) analisou o efeito da quercetina na linhagem tumoral de células de glioma humano (U138MG), e os resultados demonstraram que este flavonoide teve um efeito antiproliferativo, induzindo a morte celular através da ativação de apoptose e paragem na barreira G2 do ciclo celular. A quercetina também regula muitos sistemas enzimáticos, e segundo os resultados de Braganhol et al. (2007) a quercetina em baixas concentrações (30 e 100 μM) inibiu a atividade da enzima ecto-5'-NT/CD73 em células de glioma humano após 72 h de exposição. Esta enzima participa da motilidade celular e a sua atividade e expressão está relacionada com a maturação, migração e crescimento das células tumorais, ou seja, a quercetina tem capacidade de impedir a migração e invasão tumoral (STEFANOVIC, MANDEL, ROSENBERG, 1976).

5. Materiais e métodos

5.1 Materiais

Para as análises de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides foram utilizados ácido gálico (Fluka[®], ≥ 98,0%), reagente Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich[®]), quercetina (Sigma[®], ≥98,0%) e β-caroteno (Bio Chemika[®], ≥ 98,0%). Os demais reagentes foram com grau de pureza para análise (P.A.) para análises realizadas em espectrofotômetro.

Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (Sigma Aldrich[®]); ABTS 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (Sigma Aldrich[®]); ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox) (Sigma-Aldrich[®]) e 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) (Fluka[®]).

Para as análises de atividade antibacteriana foram utilizados Ágar Infusão Cérebro e coração (BHI) (Fluka[®]), caldo Infusão Cérebro e coração (BHI) (HIMEDIA[®]) e corante Resazurina (Sigma Aldrich[®]).

Para a realização do efeito citotóxico utilizou-se Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO[®]), Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich[®]), e brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich[®]).

5.1.1 Amostras de própolis

Cinco amostras de própolis foram coletadas por apicultores na primavera, entre os meses de setembro a novembro de 2013, a partir de quatro cidades da região Sul (Figura 10) do Estado do Rio Grande do Sul do Brasil: Pelotas 1, Bairro Três Vendas (Zona Norte) (31°42'10.3''S e 52°22'34.9''W) e Pelotas 2 do 5º Distrito – Cascata (Zona Rural) (31°35'55.0''S e 52°31'06.0''W); Rio Grande (32°02'06.2''S e 52°05'56.4''W); Canguçu, localizada na Zona Rural (31°23'33.8''S e 52°39'58.8''W); e Pedro Osório, Zona Rural (31°52'37.4''S e 53°01'25.2''W). As amostras contendo cerca de 1 kg foram obtidas em cada localidade logo após a extração do mel, pelo raspamento das paredes e quadros das caixas que

continham as colmeias. Cada amostra foi inspecionada a fim de remover fragmentos de abelhas e de madeira, dentre outras impurezas sólidas. Após a remoção das principais impurezas visíveis, a própolis foi pesada, acondicionada em embalagens plásticas e congeladas (-20°C) até o momento das análises. Para cada amostra foram realizadas três repetições.

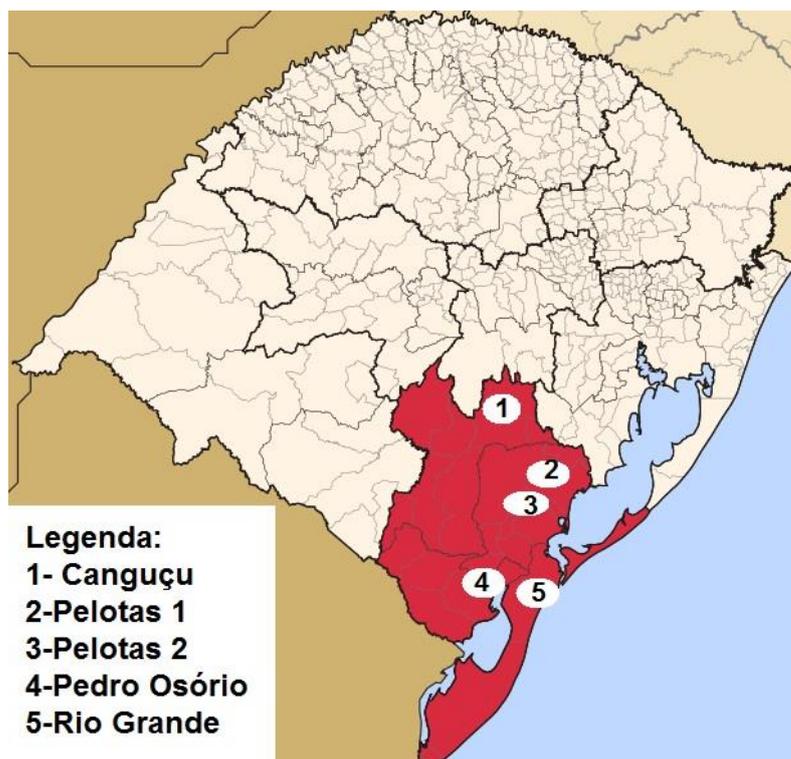


Figura 10. Mapa do Rio Grande do Sul, dividido em sete mesorregiões.
Fonte: adaptado de <http://www.ibge.gov.br/estadosat>

Segundo o IBGE (2015), o estado do Rio Grande do Sul é dividido em sete mesorregiões, trinta e cinco microrregiões e quatrocentos e noventa e sete municípios. O clima do Estado é subtropical úmido ou temperado, constituído por quatro estações bem definidas, com invernos moderadamente frios, verões quentes e chuvas bem distribuídas ao longo do ano. Quanto à vegetação dos municípios, a maior parte é composta por campos, com vegetação rasteira e herbácea, com árvores plantadas, como eucaliptos, pinhos e acácias. A vegetação nativa, tanto no domínio dos campos quanto no das matas, apresenta ocorrência de árvores como aroeiras, corticeiras e araucárias, inclusive a espécie *Araucaria angustifolia* (pinheiro).

5.2 Métodos

5.2.1 Determinação da cor

A determinação da coloração das amostras de própolis foi obtida após sua trituração em moinho de bola (MARCONI 350) com auxílio de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino, conforme metodologia de Kalogeropoulos et al. (2009).

A medida da cor foi realizada com o emprego do colorímetro Minolta (CR-300), com fonte de luz D 65, com 10 mm de abertura no padrão C.I.E. $L^*a^*b^*$, de acordo com metodologia de Pastor et al. (2011). O eixo L^* representa a luminosidade, e varia do preto (0) ao branco (100), o eixo a^* do verde ($-a$) ao vermelho ($+a$) e o eixo b^* do azul ($-b$) ao amarelo ($+b$). Através dos valores a^* e b^* calculou-se o ângulo Hue ($^\circ h^* = \text{tang-}1b^*.a^*-1$). O croma (C^*) corresponde à saturação ou intensidade da cor, e o ângulo de matiz (h°) indica a cor observável, sendo definido em graus e iniciando no eixo $+a^*$, em que 0° é $+a^*$ (vermelho), 90° é $+b^*$ (amarelo), 180° é $-a^*$ (verde), e 270° é $-b^*$ (azul).

5.2.2 Condutividade

A condutividade eléctrica de uma solução a 20% de própolis bruta (m/v) (com base na matéria seca) em metanol foi medida a 20°C em um condutivímetro (HANNA INSTRUMENTS HI 98311) previamente calibrado, de acordo com a metodologia descrita por Dias, Pereira e Estevinho (2012). Os resultados foram expressos em miliSiemens por centímetro ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$).

A condutividade indica a facilidade com a qual um material é capaz de conduzir uma corrente eléctrica, caracterizando a dissociação iônica através de uma diferença de potencial. Seus valores são diretamente proporcionais à concentração de íons dissolvidos, ou seja, quanto mais íons, maior será a corrente eléctrica conduzida pela amostra.

5.2.3 Umidade

A umidade foi determinada através do método gravimétrico, onde 2 g de amostra foram submetidas a secagem em estufa à 105°C (QUIMIS) até atingirem peso constante, sendo os resultados expressos em porcentagem (%) de umidade (A.O.A.C., 2005).

5.2.4 Preparação dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP)

Inicialmente as amostras de própolis bruta foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido (item 5.2.1).

Após preparou-se os extratos de acordo com Silva et al. (2012), pesando 10g de própolis e após diluindo com um volume 10 vezes maior de solução de etanol 80% para obtenção de um extrato a 10% (1:10 m/v). A extração foi realizada sob agitação em shaker (QUIMIS®) a temperatura ambiente por 3 horas. Após, os extratos foram filtrados em papel filtro Quali®, para remover as ceras e substâncias menos solúveis. O sobrenadante foi removido e mantido sob refrigeração *overnight*, e posteriormente centrifugado a 150rpm a 5°C por 15 minutos.

Os filtrados finais foram evaporados em evaporador rotativo (LABOROTA 4000) sob pressão reduzida a 40°C, e, em seguida, liofilizados (LIOBRAS L101). O material sólido (pós) resultante foi dissolvido novamente em etanol 80% e através da diferença de peso foram determinados os rendimentos da extração. Esta solução final corresponde ao extrato hidroalcoólico de própolis (EHP).

5.2.5 Potencial hidrogeniônico (pH)

O potencial hidrogeniônico corresponde a leitura do teor de íons hidrogênios efetivamente dissociados na solução, que foi realizada com o auxílio de pHmetro (HANNA INSTRUMENTS HI 2221), previamente calibrado com os tampões 4,0 e 7,0. A leitura foi realizada nos extratos hidroalcoólicos (A.O.A.C., 2005).

5.2.6 Determinação do teor de compostos fenólicos

Para a determinação do total de compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (ALVES, KUBOTA, 2013). As amostras foram diluídas na proporção de 1:10, com etanol 80%. Desta solução 500 µL foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N, e após cinco minutos foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após a incubação, à temperatura ambiente, no escuro por 2 horas, a absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis), tendo como branco o etanol (80%).

O ácido gálico nas concentrações de 30 a 500 µg.mL⁻¹ foi utilizado para construir a curva de calibração $y = 0,0109x - 0,0573$ e $R^2 = 0,9982$ (Apêndice A). O teor de compostos fenólicos foi expresso em mg equivalente de ácido gálico por g de matéria seca de própolis (mg EAG.g⁻¹).

5.2.7 Determinação do teor de flavonoides

O método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) foi utilizado para a determinação do teor de flavonoides, conforme metodologia descrita por Mello, Petrus e Hubinger (2010).

O teor do total de flavonoides foi determinado adicionando-se 100 µL de AlCl₃ a 10% , misturados com o mesmo volume da solução do extrato (diluído em etanol 1:10). Após 0,1 mL de acetato de potássio (1M) e 4,3 mL de etanol 80% foram adicionados. A mistura foi agitada em vortex e mantida à temperatura ambiente por 40 min. A absorbância da mistura foi determinada a 415 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.).

Para a curva de calibração, soluções de quercetina em etanol (80%), com concentrações variando de 10 a 100 µg.mL⁻¹ foram utilizados, obtendo-se a equação da reta $y = 0,0093x - 0,0243$ e $R^2 = 0,9977$ (Apêndice B). Os resultados foram expressos em termos de equivalentes de miligrama de quercetina por grama de matéria seca de própolis (mg EQ.g⁻¹).

5.2.8 Determinação do teor de carotenoides

A determinação do teor total de carotenoides foi realizada segundo o método descrito por Rodriguez-Amaya (1999), com adaptações. A leitura foi realizada diretamente dos EHP em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) a 450nm, usando etanol 80% como branco, sendo o teor total de carotenoides determinado pela equação 1, e os resultados foram expressos em μg de β -caroteno. g^{-1} de matéria seca de própolis.

$$C = \frac{\text{ABS} \times 50\text{mL} \times 1000000}{2620 \times 100 \times \text{g}} \quad (\text{eq. 1})$$

Em que: C= teor de carotenoides da amostra, ABS= absorvância, g= gramas de amostra.

5.2.9 Espectroscopia de absorção na região Ultravioleta-Visível

A determinação dos espectros de UV-visível dos extratos hidroalcoólicos foi realizada de acordo com Silva et al. (2012), com algumas modificações. Os espectros dos extratos a 10% (m/v) foram determinados no intervalo de comprimento de onda de 190 a 650 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.).

5.2.10 Capacidade antioxidante

5.2.10.1 Ensaio de sequestro de radicais DPPH

A atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH dos extratos foi realizada segundo o método descrito por Vicentino e Menezes (2007), com poucas alterações.

Preparou-se uma solução 0,3 mM de DPPH em etanol e, em 1,0 mL desta solução adicionou-se 2,5 mL das amostras de extratos de própolis diluídas em

etanol 80% com concentrações de 25-250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No branco, ao invés dos extratos, adiciona-se 2,5 mL de etanol 80% e 1 mL de DPPH. A quercetina foi utilizada como substância de referência, nas mesmas concentrações das amostras, por ser um flavonoide, principal classe de substâncias com propriedades antioxidantes presentes na própolis.

Posteriormente, as soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos, e as absorbâncias obtidas após 30 minutos de repouso na ausência de luz, em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) no comprimento de onda 517 nm.

O efeito bloqueador do DPPH foi calculado pela porcentagem de descoloração do DPPH usando a seguinte equação:

$$\% = [(Abs\ branco - Abs\ extrato)/Abs\ branco] \times 100 \quad (\text{eq. 2})$$

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o branco. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de 50% do extrato, sendo calculados a partir da construção de uma curva analítica para cada amostra, com a porcentagem da atividade antioxidante versus concentração do extrato. Através da equação de regressão linear resultante foi então calculada a concentração capaz de inibir 50% (IC 50) dos radicais livres de DPPH.

5.2.10.2 Capacidade redutora de ferro (FRAP)

A capacidade redutora de ferro (FRAP- ferric reducing antioxidant power) foi determinada de acordo com o método descrito por Silva et al. (2013), com algumas modificações. O ensaio consistiu em preparar uma solução complexante de Fe^{3+} (reagente FRAP) na proporção 1:1:10 misturando-se 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de solução de cloreto férrico 20 mM em 25,0 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,25 M, pH = 3,5. Foram misturados 100 μL do extrato de própolis na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 300 μL de água ultra-pura, em seguida adicionam-se 3,0 mL do reagente FRAP, homogeneizados em agitador de tubos e mantidos em banho-maria a 37°C por 30 minutos. A redução

do complexo de Fe^{3+} para Fe^{2+} foi obtida através da leitura da absorbância no comprimento de onda a 595 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.).

O procedimento foi realizado em triplicata e os valores de Fe^{+2} encontrados foram obtidos por meio da equação de regressão linear, que foi obtida pela construção da curva analítica do sulfato ferroso nas concentrações de 100 a 2000 μM (Apêndice C). Os valores de FRAP foram expressos em mmol de Sulfato ferroso por grama de matéria seca (Fe (II).g^{-1}).

5.2.10.3 Capacidade de remoção do radical ABTS

O experimento foi realizado de acordo com metodologia descrita por Gülçin et al. (2010). Neste método, um antioxidante é adicionado a uma solução de radical ABTS pré-formado, e após um período de tempo fixo, o restante ABTS do radical+ é quantificado espectrofotometricamente (JENWAY 6705 UV/Vis.) a 734 nm. O radical ABTS é produzido através da reação de ABTS com o persulfato de potássio, que após o armazenamento no escuro à temperatura ambiente durante 16 h, apresenta cor esverdeada.

A solução do radical ABTS foi diluída até se conseguir uma absorbância de $0,750 \pm 0,025$ a 734 nm. Em seguida, 3,9 mL da solução de ABTS diluída foram adicionadas a 0,1 mL do extrato hidroalcoólico na concentração de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 7 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 734nm (JENWAY 6705 UV/Vis.). Uma curva padrão com concentrações de 10-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Trolox 2 mM foi construída (Apêndice D). Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) por mL de extrato seco ($\mu\text{g.TEAC.mL}^{-1}$), a partir da curva de calibração do padrão antioxidante Trolox, determinado por regressão linear.

5.2.11 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 2913, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Estes micro-organismos eram mantidos sob congelamento em Caldo BHI e Glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3/1 (v/v). A partir da cultura congelada, as cepas foram reativadas em Caldo BHI com incubação a 37°C por 24h, após uma alçada de cada cepa foi transferida para placas de Ágar BHI. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e resuspendidas em uma solução de NaCl 0,89% estéril.

Após a homogeneização, a concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) para corresponder à turbidez de 0,5 da escala Mc Farland, sendo ajustadas para o valor de absorvância de 0,08 a 0,10 a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale entre $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas foi inoculado em 30 mL do caldo BHI, para se obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹.

A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de caldo BHI previamente inoculado. Em seguida, foram adicionados 100 µL do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) em concentrações que variaram de 0,1-12 mg/mL (diluição seriada de razão 2). Como controle negativo foi utilizado o etanol 80% (v/v), solvente utilizado para solubilizar o EHP. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram adicionados 30 µL do corante Resazurina (0,01%; m/v) para verificar os poços em que houve crescimento bacteriano. Após 3 h de incubação, nos poços em que não houve mudança na cor do corante, ou seja, permaneceu roxo, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração se considerou crescimento bacteriano.

Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 µL do meio de cultura dos poços considerados com efeito inibitório foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubados a 37°C por 24 h. A CBM foi considerada como a

menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

5.2.12 Ensaio citotóxico

5.2.12.1 Tratamento celular

As células ATCC B16F10, de melanoma de camundongo, foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC), EUA. O cultivo das células foi feito em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementadas com soro fetal bovino (SFB) a 10%. As células aderida as garrafas de cultivo foram lavadas com 0,25% de tripsina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,53 mM para remover todos os vestígios de soro que contém o inibidor da tripsina.

Adicionou-se 3,0 mL de solução de Tripsina-EDTA e observou-se as células sob um microscópio até que a camada de células se desprendem. Adicionou-se 8,0 mL de células do meio de crescimento para novos frascos de cultura, e incubou-se as culturas a 37°C e 5% de CO₂. Os meios foram renovados a cada 2 a 3 dias. O estudo de citotoxicidade foi realizado quando as células atingiram 70-80% de confluência.

5.2.12.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT, um sal que após ser clivado pelas desidrogenases presentes na mitocôndria das células, forma cristais de formazan, tornando-se solúvel em solventes orgânicos (MOSMANN, 1983). Em meio de cultura com células, após adição de DMSO, o MTT convertido em formazan é solubilizado e pode ser lido por espectrofotometria em função desta conversão, proporcionando uma medida quantitativa do número de células metabolicamente viáveis.

Após a tripsinação, as células foram suspensas em DMEM contendo 10% (v/v) de SFB e distribuídos 100µL em placas de 96 poços a uma densidade de

5×10^4 células/poço em DMEM e incubadas a 37°C, de acordo com Frozza et al. (2013).

Os EHP foram diluídos em DMSO em concentrações variadas (25-500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), para após 24 h as células serem tratadas com a própolis e incubadas a 37°C em 5% de CO_2 durante 48 h e 72h. O meio foi então removido e 50 μL do corante MTT foi adicionado aos poços. O controle utilizado foi DMSO (0,1%), na ausência do extrato de própolis. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 durante 2 h. Posteriormente a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan violeta foram solubilizados em 100 μL de DMSO.

A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, EUA) a 492 nm. Todas as leituras foram comparadas com o controle, o que representava 100% de viabilidade. A análise foi efetuada em triplicata. O resultado foi expresso em percentual de inibição celular (%) de acordo com a absorbância obtendo-se o percentual da viabilidade celular. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism®.

5.2.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias referentes às determinações realizadas em triplicata e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA), e para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$), através do programa estatístico SAS v.8.

O teste Dunnet ($p < 0,05$) foi utilizado na análise de capacidade antioxidante pelo método de capacidade de sequestro do DPPH, comparando a quercetina com as amostras.

6. Resultados e discussão

6.1 Análises físico-químicas

Na tabela 2, estão representadas as médias das análises de umidade e condutividade elétrica realizadas na própolis bruta, e do rendimento e pH após a elaboração dos extratos hidroalcoólicos.

Tabela 2. Teor de umidade, análise de condutividade elétrica, rendimento de extração e pH das amostras de própolis.

Amostras	Umidade (%)	Condutividade (mS.cm⁻¹)	Rendimento (%)	pH
Canguçu	5,29 b	0,84 e	17,80 b	5,09 bc
Pedro Osório	9,90 a	1,35 c	18,33 b	4,95 c
Pelotas	5,89 b	2,10 b	15,00 c	5,44 a
Pelotas 2	3,83 c	1,23 d	12,38 d	5,31 ab
Rio Grande	5,78 b	2,45 a	26,62 a	5,55 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
mS.cm⁻¹ = miliSiemens por centímetro.

De acordo com a legislação vigente para própolis bruta (BRASIL, 2001), o máximo permitido para a umidade é 8%; portanto, a amostra oriunda de Pedro Osório é a única que não encontra-se de acordo com a legislação, pois apresentou 9,90%. As demais amostras tiveram seu teor de umidade variando de 3,83 a 5,89%, a amostra oriunda de Pelotas 2 apresentou menor percentual de umidade, diferindo significativamente das demais amostras. Sousa et al. (2006) analisou cinco amostras de cidades de São Paulo e uma de Minas Gerais, encontrando valores de 5,35 à 7,02 %. Dias, Pereira, Estevinho (2012) analisaram quatro amostras de própolis de quatro regiões de Trás-os-Montes em Portugal, encontrado valores semelhantes ao deste estudo, entre 3,4 à 5,3%.

A importância em se analisar a umidade da própolis está diretamente relacionada com a qualidade do produto, tornando-se possível identificar se houve adulteração e quais as melhores condições para o seu armazenamento (MARCUCCI, 1995). O baixo teor de umidade das amostras de própolis é uma característica benéfica, pois permite maior período de armazenamento, devido a

menor probabilidade de decomposição microbiana, principalmente por fungos (BOZAN, TEMELLI, 2008).

Para os valores de condutividade elétrica, todas as amostras diferiram significativamente entre si. A ordem decrescente de condutividade encontrada nas própolis foi de amostras de Canguçu < Pelotas < Pedro Osório < Pelotas < Rio Grande. Dias, Pereira, Estevinho (2012) encontraram valores semelhantes a este estudo, quando analisaram própolis Portuguesa, variando de 1,2 a 2,4 mS.cm⁻¹ entre amostras de cidades distintas.

Segundo Lopes (2014), valores elevados podem refletir diferenças na composição de sais minerais, ácidos orgânicos, pH e outras substâncias iônicas que podem estar presentes. O valor da condutividade elétrica encontrado neste estudo pode ser associado com a cor da própolis, onde amostras oriundas de Rio Grande e de Pelotas apresentaram coloração mais amarela, de acordo com a variável b* (Tabela 3), e também apresentaram as maiores condutividades.

O rendimento dos extratos foi calculado após a sua liofilização, ocorrendo variação de 12,38 a 26,62% (m/m). Houve baixo rendimento em relação ao descrito por outros autores, sendo a amostra oriunda de Rio Grande a que apresentou o maior rendimento, diferindo significativamente das demais amostras. As amostras oriundas de Pelotas diferiram significativamente entre si, evidenciando a existência de diferenças entre amostras da mesma cidade, porém coletadas de locais distintos. Kalogeropoulos et al. (2009) determinaram o rendimento dos extratos etanólicos de própolis da Grécia, encontrando variações de 23,9% a 61,2%, valores acima dos encontrados neste estudo.

Existem diversos métodos para a preparação dos extratos de própolis, variando em diversos parâmetros. Em relação ao tempo de imersão da própolis no solvente, os estudos demonstram que há grande variação, desde extratos obtidos em algumas horas (PARK et al., 1998; CABRAL et al., 2009), dias ou até meses (SFORCIN et al., 2000), o que influencia diretamente na solubilidade e conseqüentemente, no rendimento dos extratos. Segundo Jug, Koncic, Kosalec (2014), extratos obtidos pelo processo de maceração, o mesmo utilizado neste trabalho (descrito em 5.2.4), necessitam de aumento na temperatura de extração para aumentar o rendimento de extração. Neste estudo optou-se por utilizar

temperatura ambiente, sem aumento de temperatura na extração para que não houvesse degradação dos fitoquímicos presentes na própolis.

Os valores de pH não variaram muito entre as amostras, sendo que o maior valor foi de 5,55 para a própolis oriunda da cidade de Rio Grande e o menor foi da amostra de Pedro Osório (4,95). A legislação brasileira não inclui valores de pH entre os critérios de qualidade estabelecidos para própolis (BRASIL, 2001); porém, esta determinação é importante para estabelecer padrões microbiológicos e de conservação do produto. Resultados semelhantes a este estudo foram encontrados por Dias, Pereira, Estevinho (2012), ao avaliar o pH de amostras de própolis Portuguesa, com variações nos valores de acordo com as regiões analisadas de 4,7 à 5,3. Heinzen et al. (2012) encontraram o valor de 5,08 em amostras de própolis oriundas do Paraná, valor semelhante ao encontrado no presente estudo para a amostra oriunda de Canguçu.

6.2 Análise colorimétrica

Para avaliar o parâmetro da cor da própolis, recorreu-se ao sistema de cor C.I.E.L*a*b*. O sistema C.I.E.L*a*b* é uma escala de cor tridimensional (Figura 11), aproximadamente uniforme, amplamente utilizada para avaliar cor em alimentos (LOPES, 2014).

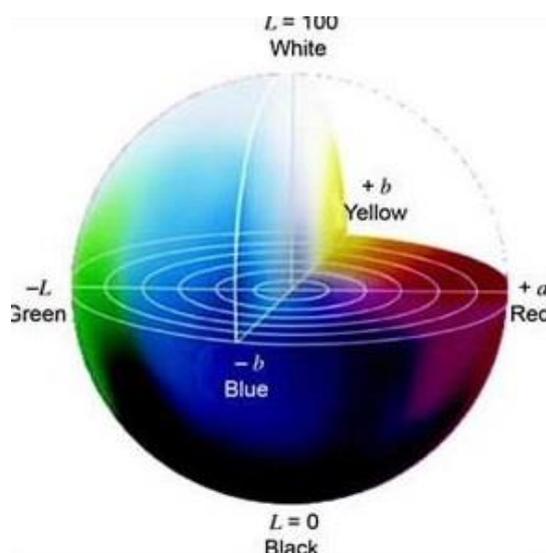


Figura 11. Sistema de cor CIELAB.
Fonte: LOPES, 2014.

Na tabela 3 estão os dados da coloração da própolis bruta oriunda de cidades do sul do RS obtidas em 2013. A variável L* apresentou grande variação, de 39,32 a 66,93, sendo que todas as amostras de própolis diferiram significativamente entre si. A amostra com maior luminosidade foi a oriunda da cidade de Canguçu, seguida da amostra de Rio Grande, demonstrando serem de coloração mais clara que as demais. Lopes (2014) analisou amostras da Guiné Bissau, onde o valor de L* foi de 36, valor próximo ao encontrado para a própolis oriunda de Pelotas.

Tabela 3. Coloração da própolis bruta de cidades do sul do RS obtidas em 2013, pelo sistema CIELAB.

Amostras	Cor				
	L*	a*	b*	Hue (°H)	Croma
Canguçu	66,93 a	2,23 c	15,93 b	82,57 b	15,80 b
Pedro Osório	51,46 d	4,18 a	11,51 c	70,51 e	12,06 c
Pelotas	39,32 e	4,42 a	16,13 b	74,89 d	16,72 b
Pelotas 2	55,28 c	3,18 b	16,95 b	80,04 c	17,23 b
Rio Grande	64,54 b	1,89 c	26,33 a	85,93 a	25,51 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ambas as amostras de própolis oriundas de Pelotas e de Pedro Osório apresentaram menor valor de L*, ou seja, coloração mais escura (Figura 12), porém diferiram significativamente entre si.



Figura 12. Fotografia da coloração de amostras de própolis após trituração. Fonte: Arquivos do autor (JANSEN, 2013)

À componente cromática a^* (tonalidade vermelha) variou de 1,89 a 4,42, enquanto o valor de b^* (tonalidade da cor amarela) variou de 11,51 para amostra oriunda de Pedro Osório a 26,33 para amostra de Rio Grande, ou seja, a amostra oriunda de Rio Grande foi a que apresentou coloração mais amarela, diferindo significativamente das demais. O valor encontrado para o parâmetro b^* já era esperado, pois Park et al. (2000) em estudos com amostras de própolis de todo Brasil, classificaram as própolis encontradas no Rio Grande do Sul com coloração de amarelo a castanho claro.

O ângulo hue expressa a intensidade da tonalidade ou a cor propriamente dita, constatando que a amostra oriunda de Rio Grande (85,93) e a amostra de Canguçu (82,57) são mais amarelas que as demais amostras, confirmando a indicação do parâmetro b^* , apesar das duas amostras diferirem significativamente entre si. A amostra oriunda de Pedro Osório apresentou 70,51 para o ângulo hue, corroborando com os resultados do parâmetro b^* , evidenciando a diferença de cor desta amostra para as demais, a qual apresentou coloração castanho claro. Pela definição, iniciando no eixo +a, em graus, 0° (+a) corresponde ao vermelho, 90° (+b) corresponde ao amarelo, 180° (-a) corresponde ao verde e 270° (-b) corresponde ao azul (BIBLE, SINGHA, 1997).

O croma expressa a relação entre os valores de a^* e b^* , assim se obtém a intensidade da cor ou a saturação. A amostra oriunda de Rio Grande foi superior às demais, diferindo significativamente, enquanto as duas amostras de Pelotas e Canguçu não diferiram entre si, e a amostra oriunda de Pedro Osório foi a que apresentou menor valor de croma, diferindo significativamente. Os resultados obtidos para esta variável evidenciam que a amostra oriunda de Rio Grande apresenta coloração amarela mais intensa que as demais, confirmando os valores de b^* e hue ($^\circ$), e também constata-se que a amostra oriunda de Pedro Osório apresenta coloração castanho claro opaco, conforme os valores obtidos em b^* , hue e croma.

Pode-se observar que as maiores variações entre as amostras ocorrem nos parâmetros L^* e ângulo Hue, onde todas as amostras diferiram significativamente entre si, ou seja, apresentam diferenças na luminosidade e na intensidade da cor, variando de amarela a castanho claro.

A coloração da própolis pode variar de amarelo, vermelho, verde, castanho claro ou escuro. Dias, Pereira e Estevinho (2012) relatam diferenças significativas na cor de quatro amostras de própolis de Portugal, o que foi atribuída à análise polínica que demonstrou ser composta por diferentes fontes botânicas.

6.3 Fitoquímicos

A importância dos resultados encontrados para os fitoquímicos consiste no fato de que as ações biológicas atribuídas à própolis têm sido diretamente relacionadas com a presença desses compostos.

Na tabela 4 estão os teores de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides presentes nos extratos hidroalcoólicos de própolis oriundas das cidades do Sul do estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 4. Teor total de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides de extratos de própolis oriundos de diferentes cidades do RS.

Amostras	Compostos fenólicos		Flavonoides		Carotenoides
	mg EAG.g ⁻¹	%	mg EQ.g ⁻¹	%	µg β-caroteno.g ⁻¹
Canguçu	56,92 c	1,39 c	10,04 e	0,25 e	8,72 d
P. Osório	60,08 c	1,24 c	16,70 d	0,33 d	22,20 c
Pelotas	122,52 b	3,43 b	60,40 c	1,59 c	44,08 b
Pelotas 2	189,81 a	3,57 a	102,87 b	2,68 b	24,90 c
Rio Grande	200,39 a	3,68 a	112,48 a	2,78 a	55,67 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). %- porcentagem de compostos fenólicos e flavonoides sobre a própolis bruta (m/m).

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, os quais variaram de 56,92 a 200,39 mg EAG.g⁻¹. As amostras oriundas de Rio Grande e de Pelotas 2 apresentaram valores superiores as demais, diferindo significativamente, apresentando teores três vezes superiores aos encontrado para as amostras de Pedro Osório e Canguçu. As amostras de própolis oriundas de Pelotas diferiram entre si, demonstrando que existe variação na composição química da própolis mesmo em amostras coletadas na mesma cidade.

Houve uma relação entre a componente cromática b^* (tonalidade da cor amarela) e o valor de croma (intensidade da cor) com o teor total dos fitoquímicos analisados, sendo que quanto mais intensa a coloração amarela das própolis, maior o teor total de compostos fenólicos e flavonoides.

Houve grande variação para o teor total de flavonoides, de 10,04 a 112,48 mg EQ.g⁻¹, sendo que estes conteúdos diferiram entre todas as amostras. Assim como para a análise de compostos fenólicos, a amostra oriunda de Rio Grande foi a que apresentou maior quantidade, diferindo significativamente das demais. O segundo maior teor de flavonoides foi encontrado na amostra de Pelotas 2, a qual diferiu da outra amostra de Pelotas. Amostras de própolis de Pedro Osório e de Canguçu apresentaram os menores teores de flavonoides, com 16,70 e 10,04 em mg EQ.g⁻¹, respectivamente.

De acordo com a normativa 03, de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2001), os extratos de própolis devem conter, no mínimo, 0,25% de flavonoides e 0,50% de compostos fenólicos. O teor de flavonoides para os extratos hidroalcoólicos de própolis oriunda de Pelotas, Canguçu, Rio Grande e Pedro Osório foi 1,59%; 2,68%; 2,78%; 0,25% e 0,33%; e para o teor de compostos fenólicos foi de 3,43%; 3,57%; 1,39%; 3,68% e 1,24%, respectivamente. Portanto, todas as amostras estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, apesar de diferirem significativamente entre si.

As amostras das cidades de Rio Grande e Pelotas apresentaram maior percentual de flavonoides em relação ao teor total de compostos fenólicos, e seus valores tiveram relação com o valor encontrado para o pH e para o croma (na análise de cor), ou seja, as amostras com maior percentual de flavonoides apresentaram pH maior e coloração mais intensa que as demais.

Silva et al. (2012) analisaram o teor de compostos fenólicos e de flavonoides de três cidades de Portugal, encontrando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de diferentes origens, assim como o ocorrido no presente trabalho. Moreira et al. (2008) analisaram o teor total de compostos fenólicos nos extratos de própolis de Portugal, encontrando diferenças de acordo com a região de procedência, de 151,00 mg EAG.g⁻¹ a 329,00 mg EAG.g⁻¹.

Alencar et al. (2007) encontraram 232 mg EAG.g⁻¹ para o teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos de própolis vermelha de Alagoas, no Brasil; resultados superiores ao presente estudo. Para flavonoides o valor foi de 43 mg EQ.g⁻¹, demonstrando que a própolis vermelha possui baixo teor de flavonoides. Porém, o autor relata que o fracionamento realizado com diferentes solventes resultou em frações com maior teor de fitoquímicos.

Frezza et al. (2013) em estudos com própolis vermelha do estado de Sergipe, encontraram 151,55 mg EAG.g⁻¹ de compostos fenólicos, valor inferior ao encontrado neste estudo para as amostras de Rio Grande e de Pelotas 2, e também inferior ao encontrado por Alencar et al. (2007) para própolis vermelha oriunda do Estado de Alagoas.

Lopez et al. (2014), caracterizaram própolis vermelha das regiões de Sergipe, Alagoas, Paraíba e Roraima, e os resultados indicaram que há, pelo menos duas espécies vegetais como principais fontes de resinas utilizadas pelas abelhas, e que a quantidade de cada espécie utilizada na produção da própolis varia de acordo com a região e possivelmente, com a sazonalidade, resultando em dois tipos de própolis vermelha brasileira.

Apesar da variação no teor de compostos fenólicos que ocorreu nas amostras analisadas no presente estudo, o conteúdo das amostras oriundas de Pelotas e de Rio Grande estão de acordo com os dados obtidos por Fernandes et al. (2014) para própolis marrom do Mato Grosso do Sul (194 mg EAG.g⁻¹EEP). Amostras de própolis da região Sudeste do Brasil, do Estado de Minas Gerais, apresentaram valores inferiores, entre 81,70 e 94,98 mg EAG.g⁻¹ e para flavonoides de 43,00 e 47,31 mg EQ.g⁻¹; e para a região Nordeste, na Bahia, de 22,03 à 39,38 mg EAG.g⁻¹ e 2,47 a 4,41 mg EQ.g⁻¹ (CASTRO et al., 2007).

De fato, os dados encontrados sugerem que a própolis de diferentes localidades apresentam diferentes conteúdos de compostos fenólicos, o que pode ser resultante dos diferentes métodos de extração, além da localização geográfica, a origem botânica das plantas, às grandes distâncias entre o local de origem e as diferentes práticas apícolas (FROZZA et al., 2013). Segundo Falcão et al. (2010), a diversidade de compostos fenólicos presentes na própolis está relacionada com a complexidade das resinas vegetais utilizadas pelas abelhas,

mas também pela combinação de várias espécies botânicas visitadas, principalmente em locais de grande diversidade de plantas.

Segundo Cabral et al. (2009), a escolha do solvente têm influência nos compostos que são extraídos da própolis, incluindo o teor de compostos fenólicos e conseqüentemente, influenciando a atividade biológica. De acordo com Silva et al. (2012), o uso de solventes muito polares como a água, reduz sua solubilidade, pois a própolis possui compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo mais apropriado o uso de solventes de polaridade intermediária, como o álcool etílico. Misturas de etanol e água têm sido utilizadas para dissolver a resina e remover as ceras presentes na própolis (PARK et al., 1998; ALIBONI et al., 2011). Além disso, extratos hidroalcoólicos apresentam a vantagem de não serem tóxicos ao consumo humano.

De acordo os resultados de Kalogeropoulos et al. (2009), as própolis Gregas e Chipriotas apresentam compostos individuais que as diferenciam das própolis europeias, como a presença de antraquinonas e terpenos em quantidades significativas, e baixo teor de ácidos fenólicos e seus ésteres. Quanto ao teor total de compostos fenólicos, os autores relatam conteúdos de 80,2 a 338,5 mg EAG.g⁻¹ em EEP; superiores aos encontrados no presente estudo.

Ahn et al. (2007) avaliaram EEP de própolis oriundos de diversas áreas da China, encontrando grande variação para o teor de compostos fenólicos e de flavonoides, de 42,9 a 302 mg EAG.g e de 8,3-188 mg EQ.g, respectivamente.

Para o teor total de carotenoides, a amostra de própolis oriunda de Rio Grande apresentou 55,67 µg de β-caroteno.g⁻¹, resultado significativamente superior as demais. A amostra oriunda de Pelotas apresentou 44,08 µg β-caroteno.g⁻¹, resultado superior ao de Pelotas 2 (24,90 µg β-caroteno.g⁻¹). Já as amostras de Pelotas 2 e Pedro Osório (22,20 µg β-caroteno.g⁻¹) não diferiram entre si, mas ambos apresentaram teores superiores à amostra de Canguçu (8,72 µg β-caroteno.g⁻¹).

Não foi observado uma relação direta entre os componentes cromáticos b* e croma com o teor total de carotenoides encontrado nos extratos de própolis (Tabela 4), o que indica que a coloração amarela também está relacionada à presença de outros compostos químicos que conferem essa coloração à própolis, e não apenas da presença dos carotenoides.

No entanto, houve uma relação positiva entre o teor de compostos fenólicos e de flavonoides com o teor de carotenoides, sendo que as amostras de Rio Grande e de Pelotas foram as que apresentaram maior teor desses fitoquímicos.

Pinto et al (2011) encontraram concentrações variadas de carotenoides em amostras de própolis coletadas no outono, que foram superiores na região Leste do Estado de Santa Catarina ($35,61 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}$), seguida da região Sul ($31,05 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}$), e menores teores destes pigmentos foram encontrados para as própolis das regiões Serrana, Oeste e Norte de Santa Catarina ($14,59$; $7,92$ e $6,79 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno.g}^{-1}$, respectivamente).

Os conteúdos de carotenoides encontrados em amostras de própolis oriundos de Santa Catarina se aproximaram aos encontrados para as amostras de própolis do Sul do Rio Grande do Sul, apesar das amostras de Rio Grande e Pelotas terem apresentados valores superiores. As diferenças no teor de carotenoides podem ser atribuídas a biossíntese de carotenoides, a qual passa por modificações durante todo o ciclo de vida da planta (RODRIGUEZ-VILLALON, GAS, RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2009).

Levando-se em conta a escassez de trabalhos que relatam o teor de carotenoides na própolis, em comparação com outras fontes alimentares, este produto se mostrou com uma fonte em potencial desses compostos.

6.4 Espectroscopia de absorção na região Ultravioleta-Visível

O espectro de absorção dos extratos hidroalcoólicos de amostras de própolis está representado na figura 13. As amostras apresentaram espectros semelhantes, com a absorção máxima entre 290 e 400nm. Apenas a amostra oriunda de Pedro Osório apresentou um espectro de absorção inferior, de 290 a 350nm, o que pode ser relacionado ao seu menor teor de compostos fenólicos e de flavonoides. O resultado é coerente com a absorção da maioria dos compostos fenólicos que é de 250 a 350 nm (MOURÃO, 2013).

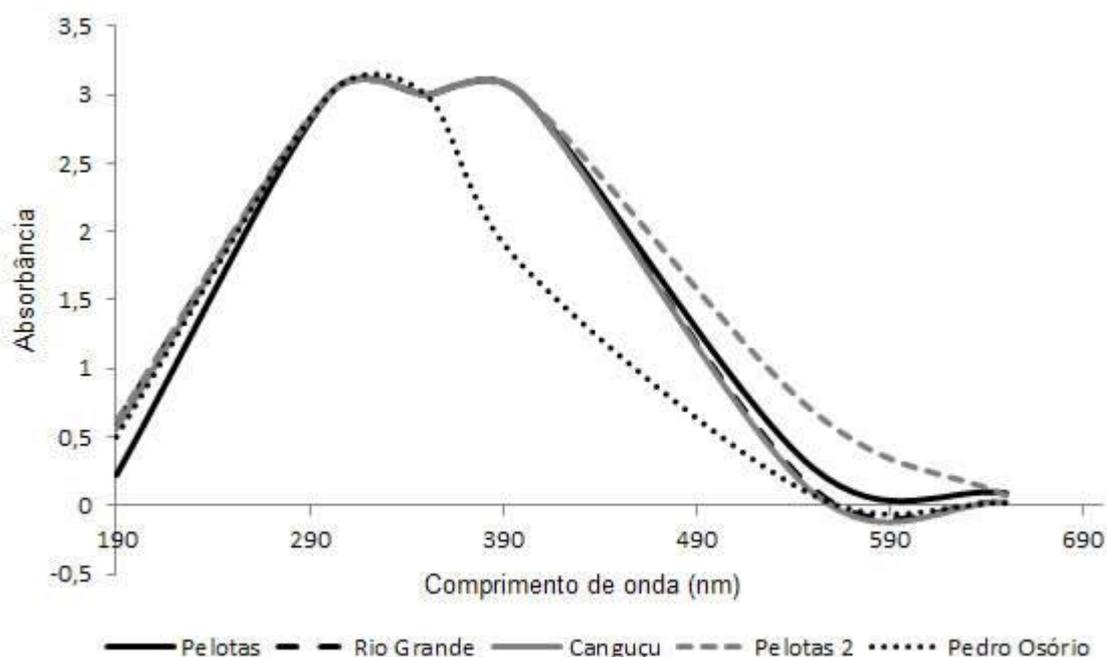


Figura 13. Gráfico do espectro de absorção no UV-visível de extratos hidroalcoólicos de própolis de diferentes regiões.

Os resultados encontrados estão de acordo à legislação Brasileira para extratos de própolis, o qual define que o extrato de própolis deve apresentar picos característicos das principais classes de flavonoides entre 200 nm e 400 nm (Brasil, 2001). Esta análise é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar os extratos de própolis, devido as suas atividades farmacológicas serem relacionadas ao conteúdo de compostos fenólicos, como os grupos dos flavonoides e dos ácidos fenólicos, os quais absorvem na região do ultravioleta.

Mourão (2013) encontrou absorbância máxima em 280 nm para EEP vermelha do Brasil. De acordo com Castro et al.(2007) as própolis dos tipos 6 (Nordeste) e 12 (Sudeste) do Brasil apresentam um perfil de absorção com absorbâncias máximas em 279 e 302 nm, respectivamente.

Silva et al. (2012) encontraram espectros semelhantes ao do presente estudo, com amostras de própolis Portuguesa, com absorção máxima entre 290 nm e 370 nm. Silva (2009), analisando extratos etanólicos e aquosos de própolis verde do Estado de Minas Gerais, constatou maiores espectros de absorção para o EEP (299 nm) do que o extrato aquoso (290 a 297 nm), sugerindo que a variação pode ser devido ao solvente extrator e que solventes muito polares,

como a água, não são indicados na extração dos compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis.

6.5 Capacidade antioxidante

São encontradas diversas metodologias para a determinação da capacidade antioxidante, porém cada uma pode estar sujeita à interferências, além de se basearem em fundamentos diferenciados (MOURÃO, 2013). Dessa forma, levando-se em consideração as diferenças existentes entre as técnicas e a aplicabilidade de cada ensaio, optou-se neste estudo em utilizar três técnicas para a análise da capacidade antioxidante.

6.5.1 Sequestro do radical DPPH

Dentre os métodos aplicados para avaliação do potencial antioxidante, o método de sequestro do DPPH é um dos mais utilizados. Este método é considerado simples e rápido, e é empregado em grande parte dos trabalhos que avaliam o potencial antioxidante de substâncias puras e de amostras complexas.

Na tabela 5, estão dispostos os resultados da análise de capacidade de sequestro do DPPH de extratos alcoólicos de própolis, expressos em IC50, ou seja, a concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres.

Tabela 5. Capacidade antioxidante de extratos de própolis através da capacidade de sequestro do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Amostras	25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	IC50
	(%)	(%)	(%)	($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Quercetina	40,87	95,86	97,14	74,11
Canguçu	7,38 c*	24,23 c*	36,06 b*	- **
Pedro Osório	4,55 c*	13,33 d*	36,34 b*	- **
Pelotas	21,03 b*	83,49 ab*	90,16 a	90,23 a
Pelotas 2	7,39 c*	79,03 b*	90,02 a	108,69 a
Rio Grande	38,32 a	90,66 a	91,35 a	50,35 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *Diferem na coluna do controle quercetina, pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$). - **Amostra não tingiu o IC50 nas concentrações testadas.

Analisando as diferentes concentrações de extratos testadas, pode-se observar que da menor até a maior concentração empregada, a amostra oriunda de Rio Grande apresentou capacidade antioxidante próxima ao valor do padrão quercetina utilizada como um controle. Na maior concentração testada, de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as duas amostras de própolis oriundas de Pelotas e a amostra de Rio Grande apresentaram valores próximos ao do controle, inibindo aproximadamente 90% dos radicais DPPH, enquanto a quercetina apresentou 97,14%. Porém, as amostras da cidade de Canguçu e de Pedro Osório, mesmo em concentrações maiores, não conseguiram inibir 50% dos radicais livres (IC50), inibindo somente 36,06 e 36,34%, respectivamente.

As amostras de Rio Grande e de Pelotas apresentaram maior capacidade antioxidante (IC50) dentre as amostras de própolis analisadas, não diferindo significativamente do controle de quercetina.

Não foi possível encontrar o valor de IC50 para as amostras de própolis oriundas de Canguçu e de Pedro Osório, sendo necessárias concentrações de extrato de própolis superiores das empregadas no presente estudo.

As amostras que apresentaram maior capacidade antioxidante (Rio Grande e Pelotas) também apresentaram altos teores de compostos fenólicos, de flavonoides e de carotenoides. As amostras com menores teores desses compostos (Canguçu e Pedro Osório) apresentaram ação antioxidante

significativamente inferior, sugerindo uma grande influência desses compostos na ação contra os radicais livres.

Campos et al. (2014) analisando EHP providas do Estado de Mato Grosso-Brasil, pelo método de DPPH, encontraram IC50 de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando que esta própolis apresenta capacidade antioxidante superior as amostras analisadas neste trabalho. No entanto, Frozza et al. (2013) encontraram um IC50 de 270,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para própolis brasileira da região Nordeste, valor este bem superior ao encontrado neste estudo para as amostras de Pelotas, Pelotas 2 e Rio Grande, demonstrando menor capacidade antioxidante que as amostras analisadas no presente estudo. Fernandes et al. (2014) avaliaram extratos de própolis marrom do Estado do Mato Grosso do Sul – Brasil, encontrando baixa capacidade antioxidante para os extratos com hexano, etanol e para a fração obtida com diclorometano (IC50 de >1000, 532, >1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente); para as frações de acetato de etila e n-butanol, as concentrações foram de 109,3 e 38,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, valores próximos ao encontrado para a amostra de Pelotas 2 e Rio Grande, respectivamente. O ácido caféico foi usado como padrão e seu IC50 foi de 3,47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, possuindo atividade antioxidante bem superior ao do padrão quercetina utilizado no presente estudo.

Laskar et al. (2010) encontraram capacidade antioxidante superior através do método de IC50 para extrato aquoso de própolis, de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para EEP, sendo que o padrão de ácido gálico utilizado apresentou IC50 de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os flavonoides isolados dessa própolis Indiana, apresentaram valores de IC50 de 8420 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de pinocembrina, e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de galangina. Essa última exibiu ação antioxidante superior ao da pinocembrina, e esta diferença entre os dois flavonoides podem ser atribuídos à presença do grupamento OH anel C que a galangina possui (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011).

As variações nos resultados da capacidade antioxidante entre os estudos com própolis podem ter ocorrido devido a diferentes técnicas de extração, bem como variações no período de coleta e localização.

6.5.2 Capacidade antioxidante através do ABTS e FRAP

São apresentados na Tabela 6 os valores médios para a capacidade antioxidante da própolis analisadas pelos métodos de ABTS e FRAP.

Tabela 6. Capacidade antioxidante dos extratos de própolis pelos métodos ABTS e FRAP.

Amostras	ABTS ($\mu\text{g TEAC.mL}^{-1}$)	FRAP (mmol de Fe(II).g⁻¹)
Canguçu	18,00 a	0,75 d
Pedro Osório	2,45 d	1,04 d
Pelotas	16,16 b	4,67 a
Pelotas 2	14,13 c	3,00 c
Rio Grande	14,30 c	3,83 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). $\mu\text{g TEAC.mL}^{-1}$ = μg equivalente ao Trolox por mL de extrato seco. $\text{mmol de Fe(II).g}^{-1}$ = mmol de Sulfato ferroso por grama de extrato seco.

Os resultados da capacidade antioxidante com o radical ABTS variaram de 2,45 a 18 $\mu\text{g TEAC.mL}^{-1}$, para as amostras de Pedro Osório e Canguçu, respectivamente. As amostras não seguiram a mesma tendência do obtido com o radical DPPH, sendo que neste ensaio a amostra oriunda de Canguçu apresentou resultado significativamente superior às demais. A amostra oriunda da cidade de Canguçu mesmo não apresentando os maiores teores de compostos fenólicos e de carotenoides, apresentou a maior capacidade antioxidante quando avaliada pelo método ABTS, o que sugeri a presença de outros compostos com capacidade de sequestro de radicais livres que não foram analisados neste estudo.

Miguel et al. (2014) analisou amostras de extratos metanólicos de própolis de Portugal, encontrando valores de IC50 entre 6 e 36 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Gülçin et al. (2010) encontraram valores para IC50 de 14,29 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para extrato aquoso de própolis da Turquia, e IC50 de 16,61; 6,11; 6,05 e 4,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os antioxidantes α -Tocoferol, Trolox, BHT e BHA, respectivamente, utilizando o ensaio com ABTS. O valor do extrato de própolis foi equivalente ao do carotenoide α -Tocoferol (vitamina E) e significativamente inferior aos antioxidantes sintéticos utilizados.

Os valores encontrados para o FRAP para as própolis analisadas variaram de 0,75 à 4,67 mmol de sulfato ferroso.g⁻¹ de extrato seco. A amostra oriunda de Pelotas demonstrou maior capacidade antioxidante, significativamente superior as demais amostras analisadas, com valor semelhante ao encontrado por Mourão (2013), de 4,26 mmol de Fe(II).g⁻¹ para própolis vermelha do Estado de Alagoas.

Mohammadzadeh et al. (2007b) encontrou valores entre 0,03 à 1,65 mmol.g⁻¹ de extrato etanólico de própolis Iraniana, valores inferiores ao encontrado neste estudo para as amostras das cidades de Pelotas e Rio Grande.

As amostras de Rio Grande e de Pelotas apresentaram valores bem superiores ao encontrado nas amostras de Pedro Osório e Canguçu, o que também foi constatado pelo método de capacidade de sequestro do DPPH. Essas amostras apresentaram altos teores de carotenoides e compostos fenólicos totais. Os compostos fenólicos por serem doadores de elétrons, possuem capacidade de converter o Fe³⁺ a Fe²⁺ e as amostras que continham significativas quantidades desses compostos demonstraram maior atividade de redução de FRAP (LASKAR et al., 2010).

Os resultados obtidos pelo método de FRAP foram equivalentes ao encontrados para a capacidade antioxidante pelo método de DPPH. Porém, pelo método de ABTS a amostra de própolis oriunda de Canguçu demonstrou maior ação antioxidante, resultado diferente dos métodos anteriores.

6.6 Atividade antibacteriana

Os resultados para a atividade antimicrobiana das amostras estão expostos na tabela 7. Todas as amostras de própolis testadas apresentaram atividade antibacteriana, porém os resultados variaram de acordo com concentração e com a origem da amostra.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos hidroalcoólicos de própolis de cidades do Sul do RS frente a bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* ATCC 2913, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Amostras	<i>S. aureus</i> *		<i>L. monocytogenes</i> *		<i>E. coli</i> *	
	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
Canguçu	0,53 aB	3,13 bB	0,36 aB	3,13 bB	6,25 aA	12,50 aA
P. Osório	0,2 aC	6,25 aB	0,65 aB	6,25 aB	6,26 aA	12,50 aA
Pelotas	0,1 aA	1,25 cB	1,33 aA	1,56 cA	1,56 cA	1,56 cA
Pelotas 2	0,43 aA	1,25 cB	1,04 aA	1,56 cA	1,31 cA	1,56 cA
Rio Grande	0,2 aB	1,56 dB	0,91 aB	1,56 cB	3,13 bA	3,13 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *Concentração das bactérias utilizadas: $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹

Foram feitas comparações entre a CIM e a CBM de cada bactéria para cada amostra pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). No geral, todas as amostras apresentaram valores inferiores para *S. Aureus*, um pouco superiores para *L. monocytogenes*, e bem superiores para a *E. coli*, única bactéria Gram-negativa testada; portanto, foram menos efetivas contra esta bactéria.

Para a *E. coli*, as duas amostras de própolis de Pelotas foram as que apresentaram maior potencial inibitório, pois provocaram inibições bacterianas em menores concentrações de extrato, apresentando o menor CIM, com 1,31 e 1,56 mg.mL⁻¹ para Pelotas 2 e Pelotas, respectivamente. As amostras de própolis oriundas de Canguçu e de Pedro Osório necessitaram de maiores concentrações de própolis para causar a inibição de *E. coli* O157:H7, de 6,25 e 6,26 mg.mL⁻¹, respectivamente.

A concentração bactericida (CBM) dos extratos foi superior ao CIM na maioria das amostras, e em algumas foi à mesma concentração (Tabela 7). As amostras de própolis oriundas de Rio Grande e de Pelotas foram mais eficazes em todas as bactérias testadas, apresentando boa atividade bactericida em relação ao encontrado por outros autores, 3,1 mg.mL⁻¹ (CAMPOS et al., 2014), 12,5 mg.mL⁻¹ (JUG, KONCIC, KOSALEC, 2014) 13,3 mg.mL⁻¹ (CARDOSO et al., 2010). De acordo com Tosi et al. (2007), os efeitos bactericidas e bacteriostáticos

de extratos de própolis dependem da concentração adicionada e são influenciadas pelo método de extração.

Houve grande variação entre as CIM e as CBM, enquanto para a *S. aureus* e *L. monocytogenes* a CBM de algumas bactérias necessitou da concentração de própolis seis vezes superior a CIM. Para *E. coli* a concentração duas vezes superior foi suficiente para a CBM. No entanto os valores da CIM para *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram, na sua maioria, inferiores às necessárias à *E. coli*, diferindo significativamente.

Como esperado, a *E. coli* apresentou maior resistência ao extrato de própolis, sendo que sua CIM e CBM foram superiores as CIM e CBM necessárias para *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Vários autores têm estudado a atividade antimicrobiana da própolis, enquanto alguns trabalhos encontraram ação somente em bactérias Gram-positivas e alguns fungos, alguns outros encontraram atividade também contra as bactérias Gram-negativas, porém utilizando maior concentração do extrato de própolis, segundo o que ocorreu no presente estudo (MARCUCCI, 1995; KUJUMGIEV et al., 1999).

Júnior et al. (2006) avaliaram o efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas de extrato metanólico de própolis (EMP) dos estados de SP, SC e RN, e constataram que a CIM variou de acordo com a região de produção da própolis, sendo que as bactérias Gram positivas foram mais suscetíveis ao EMP, independente do local, o que corrobora com resultados de outros trabalhos.

Acredita-se que os compostos presentes na própolis, como flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos atuem na parede celular destas bactérias, e como as Gram-negativas possuem estrutura quimicamente mais complexa, apresentando a membrana externa contendo proteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos, reduz a efetividade desses compostos. Os lipopolissacarídeos promovem uma barreira à permeabilidade de substâncias hidrofóbicas, e são os responsáveis pela antigenicidade, toxicidade e patogenicidade das Gram negativas, o que as tornam mais resistentes à ação da própolis do que as bactérias Gram-positivas (VARGAS et al., 2004; FOX, 2010).

Kalogeropoulos et al (2009), testaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis de regiões distintas da Grécia e do Chipre. Ambas

as amostras exibiram atividade antibacteriana, inibindo as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (0,15-0,60 mg.mL⁻¹), *L. monocytogenes* (0,08-0,3 mg.mL⁻¹) e *B. cereus* (0,02-0,15 mg.mL⁻¹) em menores concentrações do que as Gram-negativas *E. coli* O157:H7 (5 mg.mL⁻¹) e *Salmonella Typhimurim* (2,50 mg.mL⁻¹). No entanto, os extratos não inibiram as bactérias ácido-láticas *L. delbrueckii subsp.*, *L. delbrueckii plantarum*, *L. bulgaricus* e *L. casei*. Esses resultados apontam para seu potencial para ser utilizado como conservante e antimicrobiano em alimentos, especialmente os fermentados, pois inibiu bactérias patogênicas e não causou inibição em bactérias ácido-láticas.

Os resultados encontrados pelo autor se aproximam aos encontrados neste estudo, sendo que o CIM do *S. aureus* foi superior, ou seja, possui menor atividade antibacteriana, para *L. monocytogenes* foi inferior e para *E. coli* foi semelhante. As variações encontradas na determinação da CIM podem ser atribuídas a fatores, como o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da amostra de própolis, a época da coleta, entre outros (FENNEL et al., 2004). Kalogeropoulos et al. (2009), atribuem a atividade antimicrobiana ao sinergismo entre os compostos da classe dos flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos e seus ésteres, o que poderia ser a razão para a alta atividade antimicrobiana da própolis de diferentes regiões.

No entanto, para Uzel et al. (2005) a atividade antimicrobiana é devido aos flavonoides, em especial à pinocembrina, à galangina e ao CAPE, agindo através do mecanismo de ação de inibição da RNA polimerase. Outros estudos revelam que o ácido caféico, ácido benzóico e ácido cinâmico causam danos à membrana citoplasmática e à parede celular, o que causaria perda dos íons potássio e posterior autólise. A quercetina é apontada por aumentar a permeabilidade da membrana, fazendo com que a célula perca a capacidade de produzir adenosina trifosfato (ATP) (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011).

Estudos têm relatado que *S. aureus* é uma das espécies bacteriana suscetível à própolis. Dias, Pereira e Estevinho (2012), analisaram cepas de *S. aureus* resistentes à metilina, que foram isolados a partir de fluidos biológicos de origem hospitalar e comparam com uma cepa de referência (ATCC 6538). A cepa de referência foi mais sensível à ação do EEP, quando comparados às cepas isoladas.

Mirzoeva, Grishanin, Calder (1997) verificaram efeito sinérgico da própolis com vários antibióticos. A adição de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aumentou a sensibilidade da bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* aos antibióticos ácido nalidíxico (1,2 vezes), tetraciclina (1,7 vezes), penicilina G (1,5 vezes) e ampicilina (1,4 vezes), e na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aumentou a sensibilidade da *E. coli* para a tetraciclina (1,3 vezes) e ácido nalidíxico (1,5 vezes). Um mutante de *E. coli* resistente à canamicina, neomicina e ampicilina não adquiriu sensibilidade aos antibióticos na presença de 200 ou $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de própolis. Dessa forma, o uso da própolis associado a um antibiótico, pode diminuir a resistências dos microorganismos, evitando o uso de antibióticos mais fortes (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011).

O estudo realizado por Marcucci et al. (2001), com própolis oriundos de diferentes regiões de Taiwan verificou que a CIM e a CBM dos extratos etanólicos para *S. aureus* variou de acordo com período e o local em que foi realizada a coleta com um CIM de $15 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e CBM variando entre 15 e $60 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Castro et al. (2007) também encontraram variações nos valores de CIM de acordo com os períodos de sazonalidade envolvendo as safras apícolas em amostras de própolis da região Sudeste e Nordeste do Brasil. No período de inverno houve diminuição da atividade antimicrobiana e aumento em períodos de seca, isto porque no inverno há uma menor concentração dos fitoquímicos no vegetal onde as abelhas coletam a resina. No entanto, os valores da CBM não foram alterados com as mudanças de clima.

Porém, o trabalho desenvolvido por Sforcin et al. (2000), não encontrou diferença significativa em amostras de própolis brasileira em diferentes sazonalidades para a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*. Os autores também verificaram que o crescimento de bactérias Gram positivas foi inibido por concentrações baixas de própolis (0,4%), e as bactérias gram negativas somente foram inibidas em concentrações mais elevadas (4,5% a 8,0%) do extrato.

Ordóñez et al. (2011) aplicaram extratos etanólicos de própolis oriundas da Argentina em bactérias fitopatogênicas. Os resultados demonstraram o efeito bactericida da própolis quando aplicada em tomates, sendo eficaz na prevenção de doenças pós-colheita.

No geral, as amostras de Pelotas e Rio Grande apresentam os melhores resultados para a atividade antibacteriana, havendo uma associação entre a concentração de fitoquímicos e atividade antimicrobiana, ou seja, quanto maior o teor de compostos fenólicos e de carotenoides, maior a ação antibacteriana, corroborando os resultados encontrados por Silva et al. (2012).

Observou-se que as amostras com maior capacidade antioxidante apresentaram também as melhores atividades bactericidas (método da CBM), porém essa relação não foi constatada para a CIM.

6.7 Atividade citotóxica

A figura 14 demonstra os resultados dos extratos hidroalcoólicos de própolis em concentrações variadas ($25-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), administrados à linhagem de melanoma (B16F10) após 48h do tratamento. Observa-se que os extratos de amostras de própolis Pelotas 1, Rio Grande e Canguçu demonstraram-se mais efetivas na atividade antiproliferativa frente a linhagem tumoral estudada, pois causaram redução de células viáveis na linhagem em que foram testadas. Com relação às demais amostras, houve baixa capacidade em inibir o crescimento das células tumorais, após 48h de exposição ao tratamento.

48h of treatment

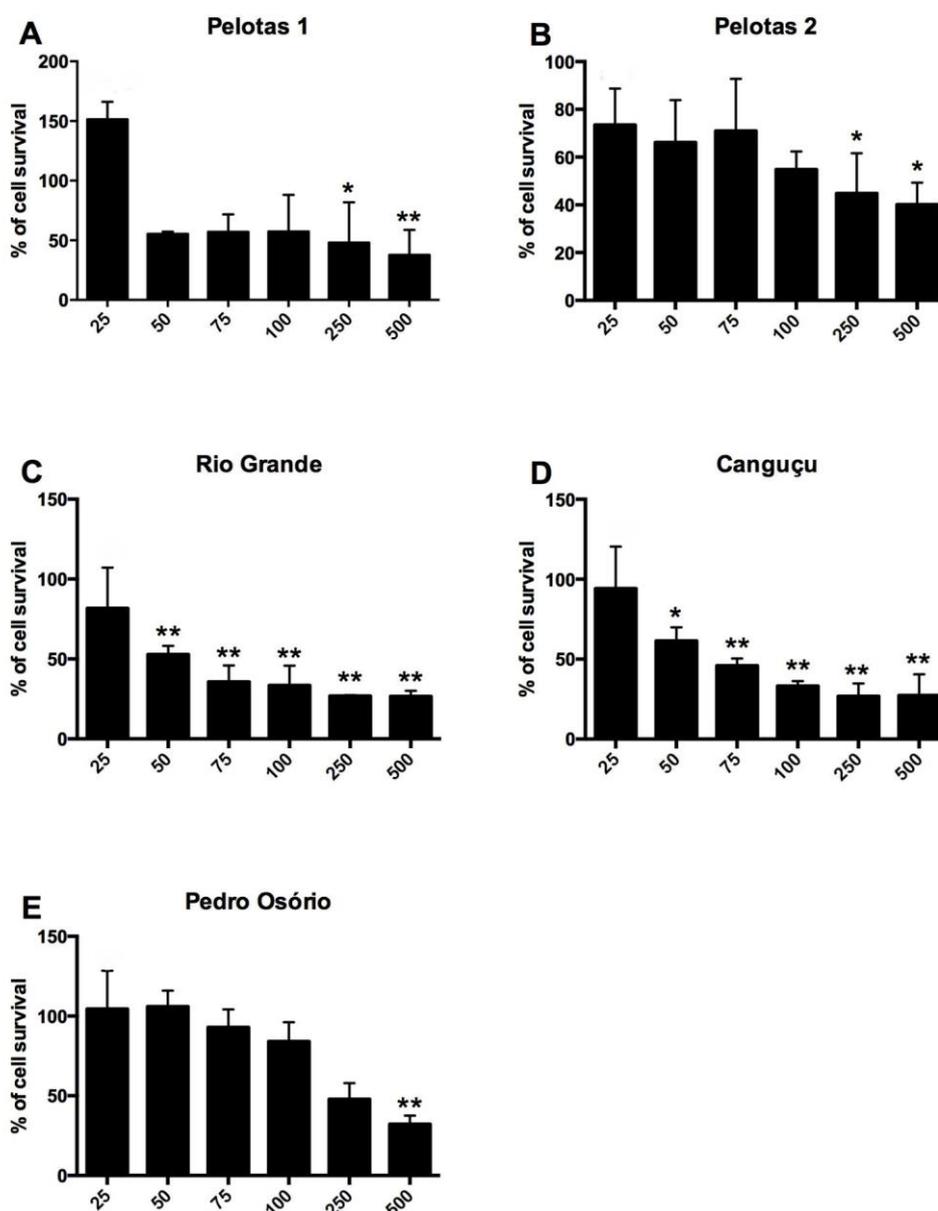


Figura 14. Gráfico da viabilidade das células de linhagem de melanoma de camundongo B16F10 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis após 48h. Os valores apresentados no eixo X são referentes á concentrações utilizadas e são expressas em $\mu\text{g.ml}^{-1}$. No eixo Y são apresentados os valores, em porcentagem, de viabilidade celular pelo ensaio do MTT após 48h em comparação com o grupo controle (DMSO). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de Tukey como teste post-hoc (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Analisando as concentrações testadas após 48hs, pode-se constatar que as duas amostras de própolis da cidade de Pelotas apresentaram comportamento

citotóxico diferentes, apesar de ambas terem diferido estatisticamente do controle (DMSO) quando aplicadas em concentrações a partir de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a amostra de Pelotas 1 demonstrou-se mais citotóxica. Na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ambas as amostras fizeram com que restasse em média 35% de células viáveis, e aproximadamente 30% na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Porém nas concentrações de 50, 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a amostra de Pelotas 1 demonstrou-se mais efetiva na inibição das células viáveis do que a amostra de Pelotas 2.

No entanto, o extrato da própolis oriunda da cidade de Pedro Osório somente diferiu significativamente do controle na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, restando 33% de células viáveis.

As amostras de própolis oriundas das cidades de Rio Grande e Canguçu diferiram do controle a partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando maior capacidade citotóxica que as própolis oriundas das demais cidades, com resultado de 53% e 64% de células viáveis, respectivamente. Estas mesmas amostras testadas na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ possibilitaram somente 30% de viabilidade celular na linhagem de melanoma. O extrato da amostra de própolis oriunda de Rio Grande apresentou elevado teor de fitoquímicos e alta capacidade antioxidante (Tabelas 4 e 5); e portanto, sendo esperado seu efeito citotóxico.

Entretanto, o extrato da amostra de própolis de Canguçu não apresentou altos teores de flavonoides e de compostos fenólicos, sugerindo que a atividade citotóxica desta própolis não está somente relacionada com a presença deste grupo de fitoquímicos tradicionalmente presentes em outros tipos de própolis brasileira. Ainda, que esta amostra possua algum composto específico da classe geral destes compostos que não esteja presente nas demais amostras; e isto poderia ser justificado devido a grande variedade de vegetação que as abelhas podem utilizar no preparo da própolis.

Após 72h de tratamento observou-se que todas as amostras são termoestáveis em temperaturas de 37°C , pois permaneceram agindo contra as células tumorais, mesmo após este período à temperatura de incubação (37°C).

O extrato da amostra da cidade de Rio Grande causou inibição no crescimento da célula de melanoma, restando 44,14% de viabilidade celular, mesmo na menor concentração testada ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 15). O extrato da amostra de Pelotas 1 apresentou resultados mais efetivos após 72h do que em

48h de exposição ao EHP, permanecendo 55,55% de células de melanoma viáveis na concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

72h of treatment

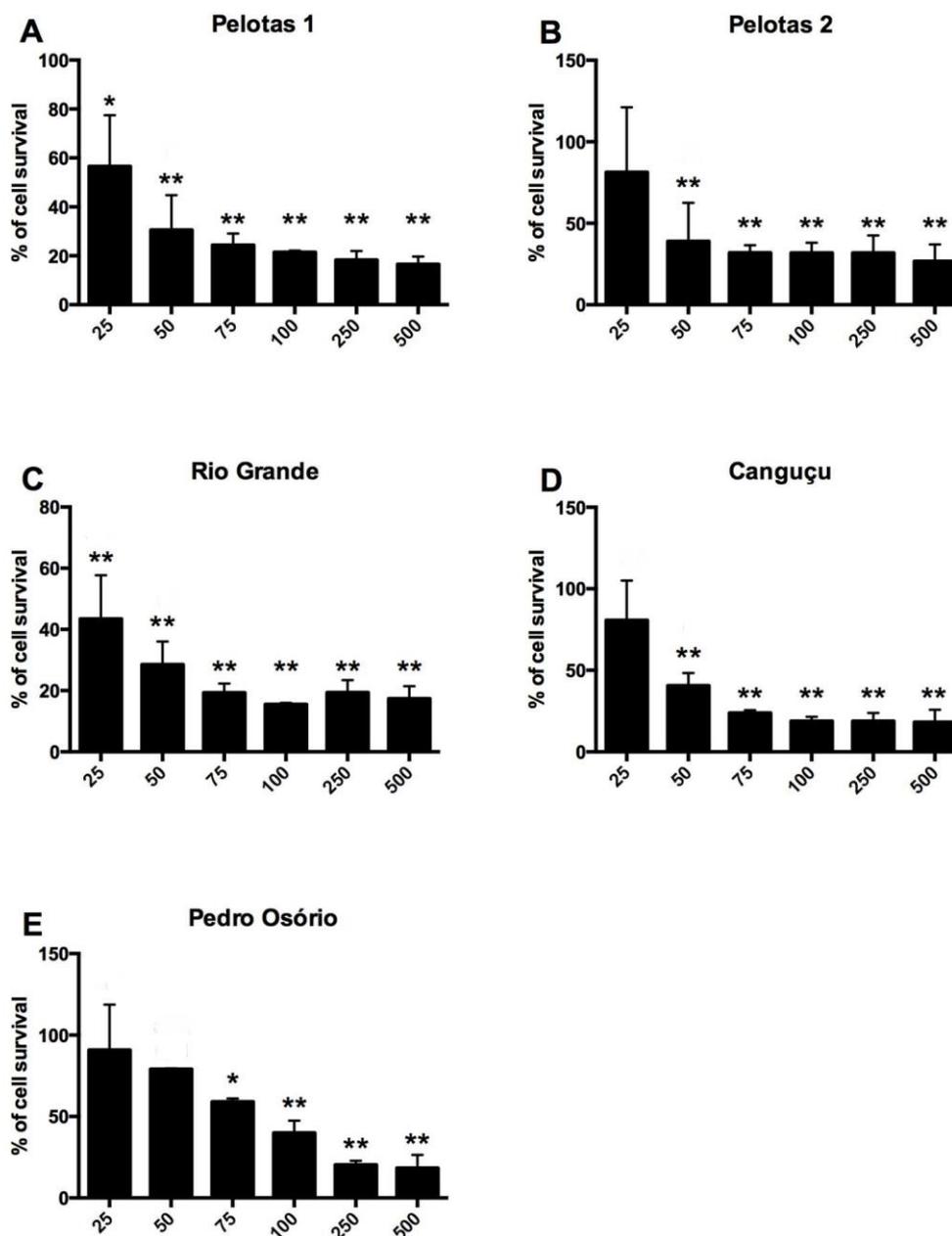


Figura 15. Gráfico da viabilidade das células de linhagem de melanoma de camundongo B16F10 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis, após 72h. Os valores apresentados no eixo X são referentes as concentrações utilizadas e são expressas em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No eixo Y são apresentados os valores, em porcentagem, de viabilidade celular pelo ensaio do MTT após 72h em comparação com o grupo controle solvente (DMSO). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de Tukey como teste post-hoc (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

A amostra de Canguçu apresentou bons resultados, e houve diferença significativa com o controle DMSO a partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EHP, restando 41,60% de células viáveis. Mas seus resultados foram semelhantes nas concentrações de 75, 100, 250 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, restando 25% de células viáveis para $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e aproximadamente 20% para as demais concentrações. A amostra de Canguçu não apresentou grande quantidade dos fitoquímicos analisados quando comparado as demais amostras; portanto, isto indica que outros compostos presentes nesta amostra possam ser os responsáveis pela atividade citotóxica.

Para o extrato da amostra de própolis oriundas de Pelotas 2 houve diferença significativa com o controle DMSO a partir da concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EHP, restando 28,93 % de células viáveis. No geral, essa amostra não demonstrou-se tão efetiva na inibição da linhagem testada (B16F10) quando comparada com a amostra de Pelotas 1 (Bairro Três Vendas). Foi observado uma relação entre os melhores resultados citotóxicos dessa amostra e sua alta capacidade antioxidante, avaliada pelos métodos com DPPH e FRAP. Essa amostra também apresentou maior teor de carotenoides do que a amostra de Pelotas 2.

Estes resultados demonstram que as própolis oriundas das cidades de Rio Grande, Pelotas 1 e Canguçu possuem alta capacidade antitumoral nas concentrações testadas, e por isso, a continuidade de mais estudos utilizando menores concentrações do EHP, seria interessante. Segundo critérios do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, 2014), para um extrato bruto ser considerado promissor para posterior isolamento, purificação e elucidação estrutural dos seus princípios ativos, sua IC50 deve ser menor que $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que classifica o extrato do presente estudo como sendo promissor para a linhagem tumoral investigada.

Estes resultados são extremamente positivos e encorajadores para o desenvolvimento de novas pesquisas que analisem a integridade da membrana celular e investiguem o mecanismo de ação da própolis do Sul do Rio Grande do Sul, e com o objetivo de que, futuramente, a própolis passe a ser utilizada na prevenção e no tratamento do câncer.

O extrato da amostra da cidade de Pedro Osório apresentou menor efeito citotóxico em relação às demais, sendo necessário $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EHP para causar inibição celular e diferir significativamente do controle. Mesmo nesta concentração, ainda restaram 60,72% de células viáveis.

Percebeu-se uma relação positiva entre o teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante e a atividade citotóxica, sendo que, no geral os extratos das amostras com maior teor de compostos fenólicos causaram maior percentual de inibição nas células cancerígenas, e os extratos das amostras com menor teor desses fitoquímicos não foram tão efetivas na inibição da linhagem tumoral de melanoma de camundongo (B16F10).

Segundo Frozza et al. (2013), os compostos fenólicos encontrados na própolis são conhecidos por possuírem capacidade antioxidante, e estas propriedades podem ter função essencial na atividade anticancerígena.

Aos ésteres do ácido cafeico tem sido atribuída a capacidade de aumentar a fosforilação e a expressão da proteína p53, que podem acelerar o processo de apoptose celular. Há relatos de que a ação destes compostos resulta da indução pela via das caspases na apoptose (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011). Grunberger, Banerjee, Eisinger (1988) testaram o efeito do ester fenil do ácido cafeico (CAPE) isolado da própolis em células de melanoma e carcinoma renal, através do método de MTT, onde a inibição das células cancerosas ocorreu na concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$. Kudugunti et al. (2010) também investigaram o uso do CAPE em células de câncer de melanoma, e os resultados demonstraram que este composto apresentou maior capacidade no combate às células cancerígenas que o próprio ácido cafeico. Isto se deve, em parte, a solubilidade deste composto em meio oleoso, o que permite sua passagem através da membrana celular e sua entrada nas células de melanoma, causando então apoptose das células.

Vários estudos foram realizados com a própolis, mas não foram encontrados relatos de que ela seja tóxica para ao homem ou animais. Em estudos realizados por Mohammadzadeh et al. (2007a), administrando doses de própolis de até $20.000 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal de ratos, não demonstraram morte alguma ou alteração em sinais clínicos e comportamentais em até 48 h.

Fernandes et al. (2014), avaliaram extratos de própolis brasileira contra um modelo de *Drosophila melanogaster*, sem encontrar efeitos genotoxicos nos

extratos em nenhuma das concentrações testadas (3,0 - 12,0 mg.mL⁻¹), e ainda foram encontrados efeitos antígeno-tóxicos contra danos induzidos pela doxorubicina. Os efeitos protetores foram atribuídos ao alto teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante da própolis. Segundo alguns autores, os compostos presentes na própolis, tais como os flavonoides, podem agir potencializando o efeito de algumas drogas utilizadas na quimioterapia, como por exemplo, o irinotecano, a epirubicina e a doxorubicina (ORŠOLIĆ, BASIC, 2005; KNEŽEVIĆ et al., 2011; FERNANDES et al., 2014). Os compostos fenólicos são conhecidos por proteger a estabilidade do genoma, devido às suas diversas propriedades biológicas, incluindo a capacidade antioxidante (FERNANDES et al., 2014).

Frezza et al. (2013) testaram extratos etanólicos de própolis vermelha do Estado de Sergipe - Brasil, em células tumorais de laringe e da coluna cervical, encontrado IC₅₀ de 63,48 µg.mL⁻¹ para câncer de laringe e IC₅₀ 81,40 µg.mL⁻¹ para câncer de coluna cervical, após 24h de tratamento. No entanto, Alencar et al. (2007) encontrou ação citotóxica superior para própolis vermelha de Alagoas (IC₅₀= 7,45 µg.mL⁻¹) em células HeLa (cervical) após 48h. Banskota et al. (2000), analisou a citotoxicidade de extratos aquosos e metanólicos de própolis de diversos países em células de carcinoma do cólon e de fibrossarcoma, sendo que extratos com metanol apresentaram maior capacidade (IC₅₀= 3,9 e 14,3 µg.mL⁻¹) no combate as células do que o extrato aquoso (IC₅₀= 100µg.mL⁻¹).

Estudo recente utilizando culturas primárias de células normais e cancerígenas demonstrou que extratos metanólicos de própolis de origem Portuguesa apresentaram seletividade *in vitro* (VALENTE et al., 2011). Os resultados foram observados em células de câncer da próstata em comparação com as células epiteliais da próstata humana normal, havendo maior eficácia na inibição das células tumorais tratadas com extratos de própolis, sem causar morte celular nas células normais (MORAES et al., 2010). Salienta-se que a seletividade é um parâmetro importante para a prevenção e tratamento do câncer (FROZZA et al., 2013).

Produtos naturais, assim como a própolis, tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente drogas que possam ser empregadas na quimioterapia, uma vez que estes produtos causam poucos

efeitos secundários, se comparados às drogas atualmente utilizadas (CASTALDO e CAPASSO, 2002). A própolis tem sido o objeto de muitas pesquisas e tem demonstrado resultados satisfatórios na atividade antitumoral, como evidenciado neste estudo e corroborado por outras pesquisas.

7. Considerações finais

Constatou-se alto teor de compostos fenólicos e de flavonoides em extratos alcoólicos de amostras de própolis do Sul do Rio Grande do Sul, principalmente da própolis oriunda da cidade de Pelotas e de Rio Grande, com valores comparáveis a amostras de algumas outras regiões do Brasil e de outros países. Também foi encontrada quantidades apreciáveis de carotenoides, ocorrendo variações de acordo com a cidade de origem. O espectro de absorção UV foi característico dos flavonoides, sendo relacionado com o teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos.

Os extratos das amostras de própolis apresentaram alta capacidade antioxidante analisada por diferentes métodos, sendo que no geral, os extratos de própolis oriunda da cidade de Pelotas e de Rio Grande foram superiores as demais, coincidindo com os teores mais elevados de fitoquímicos nas amostras.

Quanto à atividade antibacteriana, todos os extratos das amostras de própolis foram eficazes na inibição das bactérias testadas, apresentando atividade bacteriostática e bactericida. De uma maneira geral, os resultados foram melhores na inibição das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*).

Constatou-se efeito citotóxico em células de câncer de melanoma, porém houveram variações entre as amostras, e o efeito foi dependente da concentração e do tempo, sendo mais eficazes após 72 h de exposição aos extratos. Os extratos das amostras oriundas de Pelotas e de Rio Grande apresentaram capacidade de diminuir o número de células viáveis em concentrações e tempos menores que as demais, coincidindo com o maior conteúdo de fitoquímicos nestas amostras.

De acordo com as propriedades biológicas de extratos alcoólicos de própolis avaliadas neste estudo, pode-se concluir que o Sul do Rio Grande do Sul possui própolis de alta qualidade. As amostras de Rio Grande e de Pelotas se destacaram devido a sua composição fitoquímica e propriedades biológicas. Estes resultados indicam que as amostras analisadas podem ser utilizadas para fins alimentícios como conservantes, e para fins farmacológicos podendo ser consumida na forma de extratos ou cápsulas, devido as suas ações antioxidante, antibacteriana e antitumoral.

Sugerem-se mais estudos com própolis do Rio Grande do Sul, de forma a caracterizar e identificar os compostos responsáveis pelas atividades biológicas, bem como de estabelecer relação com a fonte botânica.

Referências

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.623-628, 2007

AHN, M.-R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383–1392, 2007.

AKATSU, I. P. **Resinas vegetais coletadas por *Scaptotrigona* (Hymenoptera, Apidae): composição química e atividade antimicrobiana**. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2009.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, C. C. F.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278–283, 2007.

ALIBONI, A.; D'ANDREA, A.; MASSANISSO, P. Treatment of propolis specimens from Central Italy to yield a product with a lower charge of allergenic species. **Separation and Purification Technology**, v. 82, p. 71–75, 2011.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.

ANDERSEN, Ø. M., MARKHAM, K. R. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. In: Separation and Quantification of Flavonoids. New York:Taylor e Francis, 2006. p. 1-37.

ANDRADE, N. P. C. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis sobre cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale São Francisco, Petrolina-PE, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, J. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

A.O.A.C. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**, 18th ed. Gaithersburg, Ed. William Horwitz., 2005.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 29–32, 2005.

BARDANA, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 341-363. 1998.

BARROS, N.; OPPERMAN, C. P. Entendendo o câncer (Temas de prevenção em Saúde). Porto Alegre – Artmed, 2014.

BARROS, L. S. S.; SILVA, R. M.; SILVA, I. M.; BALIZA, M. D.; VIRGÍLIO, F. F. *Escherichia coli* from cellulitis lesions in broilers. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 7, p. 40-45, 2013.

BIBLE, B. B.; SINGHA, S. Canopy position influences CIELab coordinates of peach color. **Hortscience**, v.28, p.992-993, 1997.

BOZAN, B.; TEMELLI, F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. **Bioresource Technology**, v. 99, n.14, p.6354–6359, 2008.

BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L. L.; CANEDO, A. D.; HORN, F.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; WINK, M. R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A. M. O. Anti-proliferative effect of quercetin in human U138MG glioma cell. **Anti-cancer Drugs**, v.17, n. 6., p. 663–671, 2006.

BRAGANHOL, E.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; BERNARDI, A.; WINK, M. R.; BATTASTINI, A. M. O. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the

human U138MG glioma cell line. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 1352–1359, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União** de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BURDOCK, G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347–363, 1998.

CABRAL I. S. R.; OLDONI T. L. C.; PRADO A.; BEZERRA R. M. N.; ALENCAR S. M.; IKEGAKI M.; ROSALEN P. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–27, 2009.

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

CÂNCER DE PELE. Disponível em: <<http://cancer-de-pele.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 27 Jan. 2015.

CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. de. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 432–434, 2010.

CASTALDO C.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73 (Supl. 1), p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; KOO, H.; DUARTE, S. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

CHAILLOUA, L. L.; NAZARENO, M. A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 1422–1427, 2009.

CONSEIL, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; DAYAN, G.; JAULT, J. M.; BARRON, D.; DI PIETRO, A. Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. **Proceedings, da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**, v. 95, n. 37, p. 9831–9836, 1998.

DAUSGSCH, A.; MORAES, C. S.; FOR, P.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J. A.; PARK, Y. K.. 2006. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**. 89. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

DE LA ROSA, L. A., EMILIO ALVAREZ-PARRILLA, E., & GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability. In Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (Eds.), *Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables*, (p. 53-88). Wiley-Blackwell, EUA, 2010.

DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p.33-40, 2004.

DIAS, C. A. R. MOURA, P. M. S. S. D'ANGELIS, C. E. M. A complexa interação entre radicais livres, suplementação e doenças. **Nutrição em foco**, p. 34-43, 2011.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4246-4253, 2012.

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

FALCÃO, S.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, L.M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M.R.M.; CARDOSO, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese

Propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 887-897, 2010.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MC GAW L. J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacologie**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FERNANDES, F. H.; GUTERRES, Z. DA R.; GARCEZ, W. S.; LOPES, S. M.; CORSINO, J.; GARCEZ, F. R. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. **Food Research International**, v.62, p. 20–26, 2014.

FORMICA, J. V.; REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemistry Toxicology**, London, v. 33, n, 12, p. 1061-1080, 1995.

FOX, A. **Microbiologia e Imunologia On line**. Bacteriologia – capítulo quarto: Membrana celular, esporos e biossíntese macromolecular. Escola de Medicina da Universidade da Carolina do Sul, 2010. Disponível em: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_4_bp.htm>. Acesso em: 26 de jan. 2015.

FRAGA, C. G. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology. New Jersey: John Wiley and Sons, EUA. p. 610, 2010.

FRAGA, C. G.; GALLEANO, M.; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, p.435-445, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, cap. 4., 182p, 1996.

FRANCO, S.S.; ROSA A.P.; LENGLER S.; UTTPATEL R.; ZANELLA I.; GRESSLER C.; SOUZA H. M. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**, v. 37, p.1765-1771, 2007.

FROZZA, C. O. da S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O. de; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; PÉGAS, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.

GREGORIS, E.; FABRIS, S.; BERTELLE, M.; GRASSATO, L.; STEVANATO, R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 97–101, 2011.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE R.; EISINGER K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v. 44, p. 230-232, 1988.

GÜLÇİN, I.; BURSAL ; SEHITOGLU, M. H.; BILSEL M.; GÖREN, A. C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look de future. *Annals of the new York Academy of Sciences*, New York, v. 899, n. 1, p. 136-147, 2000.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)- Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <<http://www.sidra.gov.br/bda/>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs#>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2.>> Acesso em: 16 Out. 2014.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma.> Acesso em: 16 Jan. 2015.

ISHIDA, V. F. de C.; NEGRI, G.; SALATINO, Antonio S.; BANDEIRA, M. F. C.L. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from

Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 125, p. 966–972, 2011.

JOMOVA, K., VALKOB, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, p. 65–87, 2011.

JUG, M.; KONCIC, M. Z.; KOSALEC, I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, p. 530-537, 2014.

JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R. ; COLOMBARI, V. ; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, v. 116, p. 452–461, 2009.

KNEŽEVIĆ, A. H.; DIKIĆ, D.; LISIČIĆ, D.; KOPJAR, N.; ORŠOLIĆ, N.; KARABEG, S. Synergistic effects of irinotecan and flavonoids on Ehrlich ascites tumour-bearing mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 343–349, 2011.

KUDUGUNTI, S. K.; VADA, N. M.; WHITESIDEA, A. J.; NAIKA, B. U.; YUSUFA, M. A.; Srivenugopala, K. S.; MORIDANIA, M. Y. Biochemical mechanism of Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) selective toxicity towards melanoma cell lines. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 1–14, 2010.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of própolis of diferente geographic origin. **Journal Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-401, 1999.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p. 691-693, 2004.

LASKAR, R. A.; SK, I.; ROY, N.; BEGUM, N. A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. **Food Chemistry**, v. 122, p. 233–237, 2010.

LONGHINI R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

LOPES, M. A. **Qualidade dos Produtos Apícolas da Guiné Bissau: Mel e Própolis**. Dissertação de mestrado (Farmácia e Química de produtos naturais), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2014.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: structure–activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 6, p. 691–714, 2002.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105–112, 2001.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p. 83–99, 1995.

MATSUZAKI, W. S.; RODRIGUES, F. C. M.; MALHEIROS, C. A.; RAHAL, F. Uso de Teste de quimio-sensibilidade para escolha da quimioterapia adjuvante no caso de câncer gástrico avançado. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n.4, p. 228-234, 2006.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 533–539, 2010.

MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutation Research**, v. 571, p. 91-106, 2005.

MENDONÇA, L. S. de. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente), Universidade Tiradentes, Sergipe, Aracaju, 2011.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D. Review: Is própolis safe as na alternative medicine. **Journal of Pharmacy & BioAllied Science**, v. 3, n. 4, p. 479-495, 2011.

MIGUEL, M. G.; NUNES S.; DANDLEN, S. A.; CAVACO, A. M.; ANTUNES, M. D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 16-23, 2014.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, p. 239-246, 1997.

MITHEN, R. F.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; RABOT, S.; JOHSON, I. T. The nutritional significance and bioavailability of glucosinolates in human foods review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 967-984, 2000.

MOHAMMADZADEH S.; SHARIATPANAH M.; HAMED M.; AHMADKHANIHA R.; SAMADI N.; OSTAD S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian própolis. **Food Chemistry**, v.103, p.1097–1103, 2007.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARRIATPANAH M.; HAMED M.; AMANZADEH, Y.; EBRAHIMI, S. E. S.; OSTAD, S. N. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 729–733, 2007.

MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3482 – 3485, 2008.

MOREIRA, L. L.; ROGÃO, M.; ESTEVINHO, L. Efeitos terapêuticos do própolis na saúde humana. **O Apicultor**, v. 20, n. 71, 2011. Disponível em: <<http://www.oapicultor.com/>>. Acesso em: 27 Jan. 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunologie**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOURÃO, L. R. M. B. **Estudo *in vivo* da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. Tese de Doutorado (Núcleo de Energia Nuclear na Agricultura e no Meio Ambiente), Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2013.

MURAD, J. M.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 331-334, 2002.

NACIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

NORA, A. B.; PANAROTTO, D.; LOVATTO, L.; BONIATTI, M. M. **Frequência de aconselhamento para prevenção de câncer da pele entre as diversas especialidades médicas em Caxias do Sul**. In: Anais Brasileiro de Dermatologia Investigação Clínica, Laboratorial e Terapêutica, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 45-51, 2004.

ORDÓÑEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; NIEVA MORENO, M. I.; ISLA, M. I. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. **Microbiological Research**, v. 166, p. 578-584, 2011.

ORŠOLIĆ, N.; BAŠIĆ, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 561–570, 2005.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washisngton, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, p. 85–90, 2000.

PARK, Y. K.;IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

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

PINTO, M. R. R.; DE SOUZA, A. C. V.; DA SILVA, D. A.; TOMAZZOLI, M. M.; VELEIRINHO, B. R.; SEVERINO, R. B.; ZEGGIO, A. S.; DIAS, P. F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; YUNES, R. A.; DE OLIVEIRA, S. K; MARASCHIN, M. Determinação de carotenóides totais e atividade antioxidante de extratos hidro alcoólicos de amostras outonais (2010) de própolis catarinense. In: 38^o CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 89, 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2011.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. ILSI Press: Washington, 1999, 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Brasília: MMA/SBF. 100p., 2008.

RODRIGUEZ-VILLALON, A.; GAS, E.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown Arabidopsis seedlings. **The Plant Journal**, v. 60, p. 424–435, 2009.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of própolis: role of caffeic acid phenethyl ester an galang. **Fitoterapia**, v. 73, Suppl. 1, p. 21-29, 2002.

SALATINO, A., TEIXEIRA, E. W., NEGRI, G., & MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 33–38, 2005.

SEBRAE. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura>> Acesso em: 13 jun. 2013.

SFORCIN, J. M.; FERNADES, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243–249, 2000.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno Como Agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, vol.17, n.2, p. 227-236, 2004.

SILVA, A. F. da. **Própolis: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2009. 126f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SILVA, E. C. C. da; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. de C. S; ZILSE, G. A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. XY, n. 00 p. 1-6, 2013.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.

SILVA, R. A. da; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, 2006.

STEFANOVIC, V.; MANDEL, P.; ROSENBERG, A. Ecto-5'-nucleotidase of intact cultured C6 rat glioma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 13, p. 3900-3905, 1976.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 760 p., 2005.

TOSI, E. A.; RÉ, E.; ORTEGA, M. E.; CAZZOLI, A. F.; Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1025-1029, 2007.

TRUSHEVA, B., POPOVA, M., BANKOVA, V., SIMOVA, S., MARCUCCI, M. C., MIORIN, P. L. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 249–254, 2006.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidante phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

TUKMECHI, A.; OWNAGH, A.; MOHEBBAT, A. *In vitro* antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (eeip) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* & *Streptococcus iniae*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.1086-1092, 2010.

UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 616-622, 2007.

UZEL, A.; SORKUN, K. ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULU, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

VALENTE, M.J.; BALTAZAR, A.F.; HENRIQUE, R.; ESTEVINHO, L.; CARVALHO, M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 86–92, 2011.

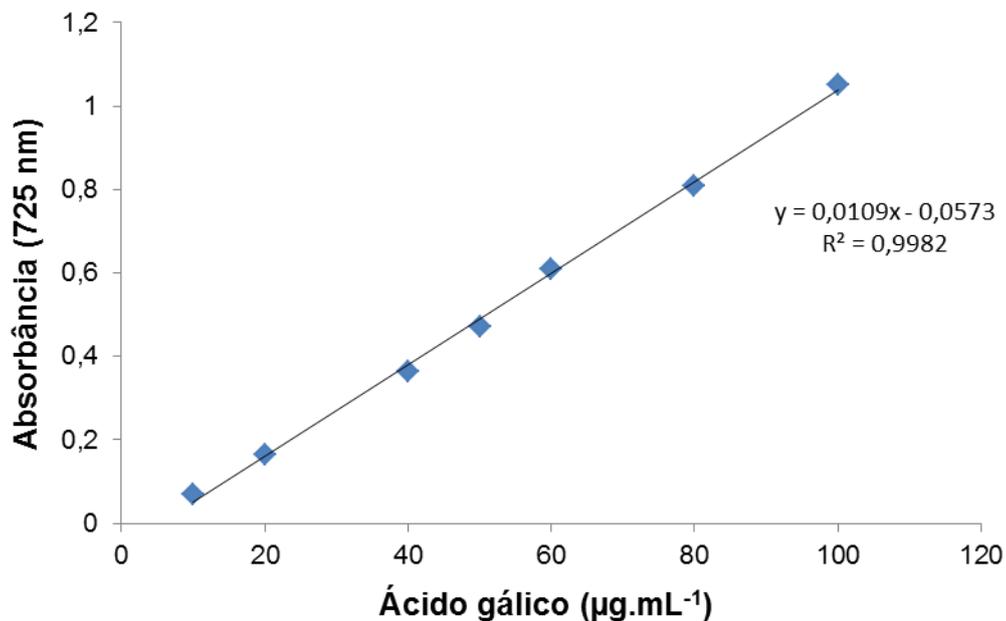
VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

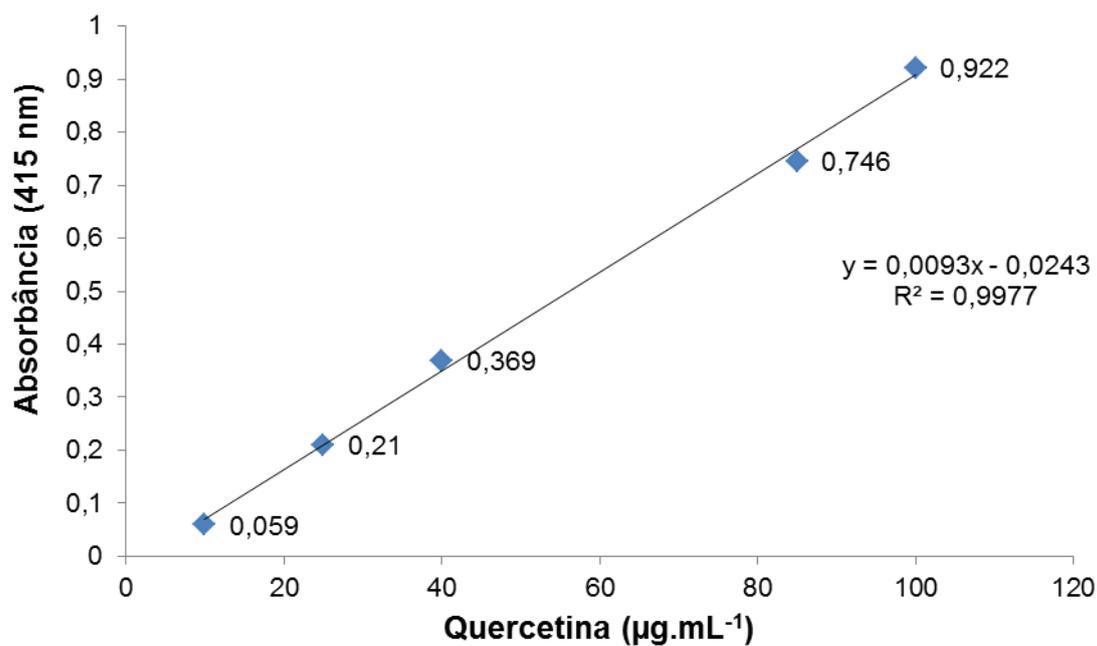
WENG, C. J.; YEN, G. C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 1, p.76–87, 2012.

APÊNDICES

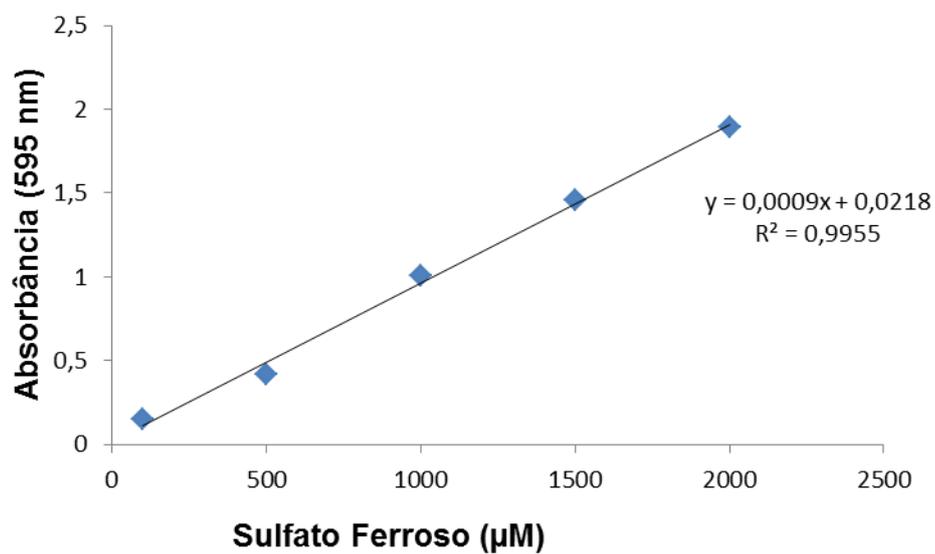
APÊNDICE A – Gráfico da Curva de calibração dos compostos fenólicos totais, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Ácido gálico, pelo método de Folin-Ciocalteu.



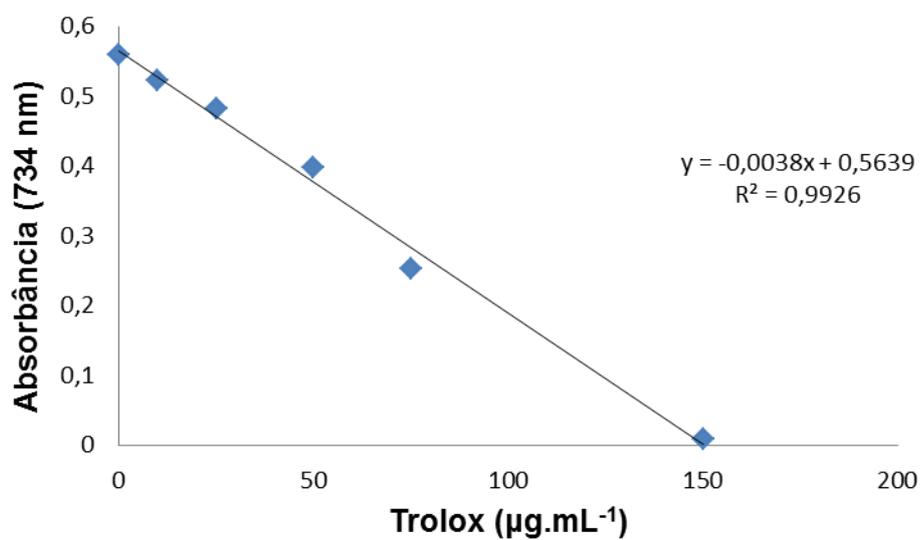
APÊNDICE B - Gráfico da Curva de calibração dos flavonoides totais, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Quercetina, pelo método de Cloreto de alumínio.



APÊNDICE C – Gráfico da Curva de calibração do Sulfato Ferroso, expresso em $\mu\text{mol de Fe (II).g}^{-1}$, pelo método de FRAP.



APÊNDICE D - Gráfico da Curva de calibração de Trolox, pelo método de ABTS.



Fitoquímicos e atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de extratos de própolis do Brasil

Cristina Jansen^{a*}, Rui Carlos Zambiasi^b, Eliezer Avila Gandra^b, Giana de Paula Cognato^c, Carlus Augusto Tavares do Couto^c, Josiane Kuhn Rutz^d

^a Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Rua Gomes Carneiro 1, Centro, CEP 96010-610, RS/Brasil.

^bCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, CP 354, RS/Brasil.

^cPrograma de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, RS 96010-900, Brasil

^dPrograma de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS 96010-900, Brasil

*Rua: Gomes Carneiro nº 1 – CEP: 96010-610 – Pelotas/RS – Faculdade de Nutrição – Campus Anglo – cris-jansen@hotmail.com

O manuscrito encontra-se nas normas do periódico Food Chemistry (ISSN 0308-8146) revista escolhida pelos autores para submissão, após apreciação da banca avaliadora.

Resumo

A própolis é produzida pelas abelhas através da coleta de resinas, plantas e flores, sendo parcialmente digeridos e acrescentado-se cera e pólen. Porém vários fatores interferem na sua composição química, resultando em modificações nos fitoquímicos, e, portanto, nas propriedades biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição de fitoquímicos em amostras de própolis do Rio Grande do Sul - Brasil, afim de testar sua capacidade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram alto teor de fitoquímicos, sendo confirmado pela máxima absorção na região característica dos flavonoides, porém ocorreram variações entre as amostras. As amostras de Pelotas e Rio Grande apresentaram alta capacidade antioxidante. Todas amostras tiveram atividade antibacteriana; porém, os resultados foram superiores na inibição de *Stafilococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, quando comparados aos de *Escherichia coli*. As amostras de Rio Grande, Canguçu e Pelotas apresentaram resultados promissores contra a linhagem de melanoma (B16F10) após 72h de tratamento.

Key-words: cancer; phenolic compounds. *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*.

Highlights:

Própolis possui diversas atividades biológicas atribuídas ao elevado teor de fitoquímicos.

Houve diferença significativa nos fitoquímicos e na capacidade antioxidante de própolis brasileiro.

Todas as amostras foram eficazes na inibição de bactérias patogênicas.

Amostras de Rio Grande, Canguçu e Pelotas demonstraram ação citotóxica contra o câncer de melanoma.

1. Introdução

A colmeia é fonte de produtos de alto valor nutritivo e com grandes potencialidades farmacológicas, como o mel, a própolis, o pólen, a cera, a geleia real e a apitoxina. A própolis é um dos produtos apícolas que têm alcançado destaque internacional devido a sua composição química e propriedades biológicas e, apesar disso, ainda é pouco explorada em algumas regiões (CASTALDO, CAPASSO, 2002; PEREIRA et al., 2002).

A própolis é um produto elaborado pelas abelhas através de substâncias resinosas e gomosas, que são coletadas de brotos, flores e exsudados de plantas. As abelhas digerem parcialmente estes materiais através da ação das enzimas contidas nas suas secreções salivares, e após acrescentam ainda cera e pólen, formando assim a própolis (SILVA et al., 2012).

A própolis vem sendo utilizada desde as civilizações antigas no tratamento de diversas doenças, devido as suas propriedades biológicas e terapêuticas (MOREIRA et al., 2008; CARDOSO et al., 2010). Propriedades, como a antimicrobiana (MARCUCCI et al., 2001; UZEL et al., 2005; TOSI et al., 2007), anti-inflamatória (SILVA et al., 2012), antitumoral (FROZZA et al., 2013), cicatrizante (PARK et al., 1998), anticariogênicas (ISHIDA, NEGRI, SALATINO, 2011), anestésica (MARCUCCI, 1995) e antioxidante (MOREIRA et al., 2008) são atribuídas à complexa composição química, principalmente pela presença de

fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, incluindo majoritariamente os compostos fenólicos (MOREIRA et al., 2008).

Os compostos fenólicos presentes na própolis tem atraído muita atenção devido a sua relação com a atividade antioxidante, aos efeitos na proteção contra doenças coronárias, cardíacas e o câncer, e recentemente, pelas evidências do efeito de inibição da invasão tumoral e da metástase (WENG, YEN, 2012).

Estudos demonstraram que amostras de própolis oriundas de regiões tropicais, especialmente brasileiras, apresentam diferenças na composição química em relação à própolis de outras regiões. O Brasil possui clima e vegetação que torna possível às abelhas produzirem uma própolis de alta qualidade, o que pode ser um diferencial dentre os países produtores. Mesmo a própolis brasileira apresenta variações na sua composição química e, portanto, nas suas propriedades biológicas, de acordo com as diferentes regiões do país onde são coletadas, e esta variação ocorre em virtude da grande biodiversidade de plantas encontradas no Brasil (PEREIRA et al., 2002).

Além disso, existem diversos fatores externos contribuem para as alterações nas características físicas, químicas e sensoriais da própolis, influenciando diretamente nas suas propriedades químicas e biológicas. Os principais agentes causadores desta variação são: as espécies vegetais e sua origem botânica; a localização geográfica; a época do ano; a espécie de abelha (no caso brasileiro também o grau de "africanização" da *Apis mellifera*); e da forma de coleta e extração do produto (CARDOSO et al., 2010; FROZZA et al., 2013).

Por esta razão, se tornam muito importantes pesquisas que caracterizem a própolis de diferentes microrregiões brasileiras, distinguindo a composição e a atividade biológica das amostras, e assim, sua melhor aplicação. Em função

disso, este estudo visa à caracterização química de amostras de própolis oriundas da região Sul do Rio Grande do Sul, avaliando sua capacidade antioxidante, ação antibacteriana e efeito citotóxico.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Amostras de própolis

Cinco amostras de própolis produzidas por abelhas *Apis mellifera* foram coletadas por apicultores na primavera, entre os meses de setembro a novembro de 2013, a partir de quatro cidades da região Sul do Estado do Rio Grande do Sul do Brasil: Pelotas 1 (31°42'10.3"S e 52°22'34.9"W) e Pelotas 2 (31°35'55.0"S e 52°31'06.0"W); Rio Grande (32°02'06.2"S e 52°05'56.4"W); Canguçu (31°23'33.8"S e 52°39'58.8"W); e Pedro Osório (31°52'37.4"S e 53°01'25.2"W). As amostras contendo cerca de 1 kg foram obtidas em cada localidade logo após a extração do mel, pelo raspamento das paredes e quadros das caixas que continham as colmeias. Cada amostra foi inspecionada a fim de remover fragmentos de abelhas e de madeira, dentre outras impurezas sólidas. Após a remoção das principais impurezas visíveis, a própolis foi pesada, acondicionada em embalagens plásticas e congeladas (-20°C) até o momento das análises. Para cada amostra foram realizadas três repetições.

2.1.2 Reagentes

Para as análises de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante foram utilizados: ácido gálico (Fluka®, $\geq 98,0\%$) e reagente Folin-Ciocalteu, quercetina ($\geq 98,0\%$) 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) obtidos da Sigma Aldrich®. Os demais reagentes foram com grau de pureza para análise (P.A.) para análises realizadas em espectrofotômetro.

Para as análises de atividade antibacteriana foram utilizados Ágar Infusão Cérebro e coração (BHI) (Fluka®), caldo Infusão Cérebro e coração (BHI) (HIMEDIA®) e corante Resazurina (Sigma Aldrich®). Para a realização do efeito citotóxico utilizou-se Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO®), Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich®), e brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich®).

2.2 Preparação dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP)

Inicialmente as amostras de própolis bruta foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido. Após preparou-se os extratos de modo semelhante ao realizado por Silva et al. (2012), pesando 10g de própolis e após diluindo com um volume 10 vezes maior de solução de etanol 80% para obtenção de um extrato a 10% (1:10 m/v). A extração foi realizada sob agitação em shaker (QUIMIS®) a temperatura ambiente por 3 horas. Após, os extratos foram filtrados em papel filtro Quali®, para remover as ceras e substâncias menos solúveis. O sobrenadante foi removido e mantido sob refrigeração overnight, e posteriormente centrifugado a 150rpm a 5°C por 15 minutos.

Os filtrados finais foram evaporados em evaporador rotativo (LABOROTA 4000) sob pressão reduzida a 40°C, e, em seguida, liofilizados (LIOBRAS L101). O

material sólido (pós) resultante foi dissolvido novamente em etanol 80%. Esta solução final corresponde ao extrato hidroalcoólico de própolis (EHP).

2.2.1 Determinação do teor de compostos fenólicos

Para a determinação do total de compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (ALVES, KUBOTA, 2013). As amostras foram diluídas na proporção de 1:10, com etanol 80%. Desta solução 500 µL foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N, e após cinco minutos foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após a incubação, à temperatura ambiente, no escuro por 2 horas, a absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis), tendo como branco o etanol (80%).

O ácido gálico nas concentrações de 30 a 500 µg.mL⁻¹ foi utilizado para construir a curva de calibração $y = 0,0109x - 0,0573$ e $R^2 = 0,9982$. O teor de compostos fenólicos foi expresso em mg equivalente de ácido gálico por g de matéria seca de própolis (mg EAG.g⁻¹).

2.2.2 Determinação do teor de flavonoides

O método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) foi utilizado para a determinação do teor de flavonoides, conforme metodologia descrita por Mello, Petrus e Hubinger (2010).

O teor do total de flavonoides foi determinado adicionando-se 100 µL de AlCl₃ a 10% , misturados com o mesmo volume da solução do extrato (diluído em etanol 1:10). Após 0,1 mL de acetato de potássio (1M) e 4,3 mL de etanol 80% foram adicionados. A mistura foi agitada em vortex e mantida à temperatura ambiente

por 40 min. A absorvância da mistura foi determinada a 415 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.).

Para a curva de calibração, soluções de quercetina em etanol (80%), com concentrações variando de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram utilizados, obtendo-se a equação da reta $y = 0,0093x - 0,0243$ e $R^2 = 0,9977$. Os resultados foram expressos em termos de equivalentes de miligrama de quercetina por grama de matéria seca de própolis (mg EQ.g⁻¹).

2.2.3 Espectroscopia de absorção na região Ultravioleta-Visível

A determinação dos espectros de UV-visível dos extratos hidroalcoólicos foi realizada de acordo com Silva et al. (2012), com algumas modificações. Os espectros dos extratos a 10% (m/v) foram determinados no intervalo de comprimento de onda de 190 a 650 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.).

2.2.4 Ensaio de sequestro de radicais DPPH

A atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH dos extratos foi realizada segundo o método descrito por Vicentino e Menezes (2007), com poucas alterações.

Preparou-se uma solução 0,3 mM de DPPH em etanol e, em 1,0 mL desta solução adicionou-se 2,5 mL das amostras de extratos de própolis diluídas em etanol 80% com concentrações de 25 à 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No branco, ao invés dos extratos, adiciona-se 2,5 mL de etanol 80% e 1 mL de DPPH. A quercetina foi utilizada como substância de referência, nas mesmas concentrações das

amostras, por ser um flavonoide, principal classe de substâncias com propriedades antioxidantes presentes na própolis.

Posteriormente, as soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos, e as absorbâncias obtidas após 30 minutos de repouso na ausência de luz, em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) no comprimento de onda 517 nm.

O efeito bloqueador do DPPH foi calculado pela porcentagem de descoloração do DPPH usando a seguinte equação:

$$\% = [(Abs\ branco - Abs\ extrato) / Abs\ branco] \times 100 \quad (eq. 2)$$

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o branco. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de 50% do extrato, sendo calculados a partir da construção de uma curva analítica para cada amostra, com a porcentagem da atividade antioxidante versus concentração do extrato. Através da equação de regressão linear resultante foi então calculada a concentração capaz de inibir 50% (IC 50) dos radicais livres de DPPH.

2.2.5 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 2913, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Estes micro-organismos eram

mantidos sob congelamento em Caldo BHI e Glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção 3/1 (v/v). A partir da cultura congelada, as cepas foram reativadas em Caldo BHI com incubação a 37°C por 24h, após uma alçada de cada cepa foi transferida para placas de Ágar BHI. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e resuspendidas em uma solução de NaCl 0,89% estéril.

Após a homogeneização, a concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) para corresponder à turbidez de 0,5 da escala Mc Farland, sendo ajustadas para o valor de absorbância de 0,08 a 0,10 a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale entre 1-2x10⁸UFC.mL⁻¹. Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas foi inoculado em 30 mL do caldo BHI, para se obter uma concentração bacteriana em torno de 1-2x10⁵ UFC.mL⁻¹.

A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de caldo BHI previamente inoculado. Em seguida, foram adicionados 100 µL do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) em concentrações que variaram de 0,1-12 mg/mL (diluição seriada de razão 2). Como controle negativo foi utilizado o etanol 80% (v/v), solvente utilizado para solubilizar o EHP. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram adicionados 30 µL do corante Resazurina (0,01%; m/v) para verificar os poços em que houve crescimento bacteriano. Após 3 h de incubação, nos poços em que não houve mudança na cor do corante, ou seja, permaneceu roxo, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração se considerou crescimento bacteriano.

Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 μ L do meio de cultura dos poços considerados com efeito inibitório foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubados a 37°C por 24 h. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

2.2.6 Ensaio citotóxico

2.2.6.1 Linhagem celular

As células ATCC B16F10, de melanoma de camundongo, foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC), EUA. O cultivo das células foi feito em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementadas com soro fetal bovino (SFB) a 10%.

2.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT, um sal que após ser clivado pelas desidrogenases presentes na mitocôndria das células, forma cristais de formazan, tornando-se solúvel em solventes orgânicos (MOSMANN, 1983). Em meio de cultura com células, após adição de DMSO, o MTT convertido em formazan é solubilizado e pode ser lido por espectrofotometria em função desta conversão, proporcionando uma medida quantitativa do número de células metabolicamente viáveis.

Após a tripsinação, as células foram suspensas em DMEM contendo 10% (v/v) de SFB e distribuídos 100 μ L em placas de 96 poços a uma densidade de 5x10⁴ células/poço em DMEM e incubadas a 37°C, de acordo com Frozza et al. (2013).

Os EHP foram diluídos em DMSO em concentrações variadas (25-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), para após 24 h as células serem tratadas com a própolis e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 48 h e 72h. O meio foi então removido e 50 μL do corante MTT foi adicionado aos poços. O controle utilizado foi DMSO (0,1%), na ausência do extrato de própolis. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 2 h. Posteriormente a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan violeta foram solubilizados em 100 μL de DMSO.

A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, EUA) a 492 nm. Todas as leituras foram comparadas com o controle, o que representava 100% de viabilidade. A análise foi efetuada em triplicata. O resultado foi expresso em percentual de inibição celular (%) de acordo com a absorbância obtendo-se o percentual da viabilidade celular. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism®.

2.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias referentes às determinações realizadas em triplicata e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA), e para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$), através do programa estatístico SAS v.8.

O teste Dunnet ($p < 0,05$) foi utilizado na análise de capacidade antioxidante pelo método de capacidade de sequestro do DPPH, comparando a quercetina com as amostras.

3. Resultados e discussão

3.1 Fitoquímicos

A importância dos resultados encontrados para os fitoquímicos consiste no fato de que as ações biológicas atribuídas à própolis têm sido diretamente relacionadas com a presença desses compostos.

Tabela 1. Teor total de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante através do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) de extratos de própolis oriundos de diferentes cidades do RS.

Amostras	Compostos fenólicos		Flavonoides	DPPH
	mg EAG.g-1	mg EQ.g-1	IC50 (mg.g-1)	
Quercetina	-	-	74,11	
Canguçu	56,92 c	10,04 e	_	**
P. Osório	60,08 c	16,70 d	_	**
Pelotas	122,52 b	60,40 c	90,23 a	
Pelotas 2	189,81 a	102,87 b	108,69 a	
Rio Grande	200,39 a	112,48 a	50,35 a	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *Diferem na coluna do controle quercetina, pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$). _ ** Amostra não tingiu o IC50 nas concentrações testadas.

O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin- Ciocalteu, os quais variaram de 56,92 a 200,39 mg EAG.g-1 (Tabela 1). As amostras oriundas de Rio Grande e de Pelotas 2 apresentaram valores superiores as demais, diferindo significativamente, apresentando teores três vezes superiores aos encontrado para as amostras de Pedro Osório e Canguçu. As amostras de

própolis oriundas de Pelotas diferiram entre si, demonstrando que existe variação na composição química da própolis mesmo em amostras coletadas na mesma cidade.

Houve grande variação para o teor total de flavonoides, de 10,04 a 112,48 mg EQ.g-1, sendo que estes conteúdos diferiram entre todas as amostras. Assim como para a análise de compostos fenólicos, a amostra oriunda de Rio Grande foi a que apresentou maior quantidade, diferindo significativamente das demais.

Amostras de própolis de Pedro Osório e de Canguçu apresentaram os menores teores de flavonoides, com 16,70 e 10,04 em mg EQ.g-1, respectivamente.

Silva et al. (2012) analisaram o teor de compostos fenólicos e de flavonoides de três cidades de Portugal, encontrando diferenças significativas entre as amostras de diferentes origens, assim como o ocorrido no presente trabalho. Moreira et al. (2008) analisaram o teor total de compostos fenólicos nos extratos de própolis de Portugal, encontrando diferenças de acordo com a região de procedência, de 151,00 mg EAG.g-1 a 329,00 mg EAG.g-1.

Apesar da variação no teor de compostos fenólicos que ocorreu nas amostras analisadas no presente estudo, o conteúdo das amostras oriundas de Pelotas e de Rio Grande estão de acordo com os dados obtidos por Fernandes et al. (2014) para própolis marrom do Mato Grosso do Sul (194 mg EAG.g-1EEP). Amostras de própolis da região Sudeste do Brasil, do Estado de Minas Gerais, apresentaram valores inferiores, entre 81,70 e 94,98 mg EAG.g-1 e para flavonoides de 43,00 e 47,31 mg EQ.g-1; e para a região Nordeste, na Bahia, de 22,03 à 39,38 mg EAG.g-1 e 2,47 a 4,41 mg EQ.g-1 (CASTRO et al., 2007).

De fato, os dados encontrados sugerem que a própolis de diferentes localidades apresentam diferentes conteúdos de compostos fenólicos, o que pode ser

resultante dos diferentes métodos de extração, além da localização geográfica, a origem botânica das plantas, às grandes distâncias entre o local de origem e as diferentes práticas apícolas (FROZZA et al., 2013). Segundo Falcão et al. (2010), a diversidade de compostos fenólicos presentes na própolis está relacionada com a complexidade das resinas vegetais utilizadas pelas abelhas, mas também pela combinação de várias espécies botânicas visitadas, principalmente em locais de grande diversidade de plantas.

Segundo Cabral et al. (2009), a escolha do solvente têm influência nos compostos que são extraídos da própolis, incluindo o teor de compostos fenólicos e consequentemente, influenciando a atividade biológica. De acordo com Silva et al. (2012), o uso de solventes muito polares como a água, reduz sua solubilidade, pois a própolis possui compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo mais apropriado o uso de solventes de polaridade intermediária, como o álcool etílico. Além disso, extratos hidroalcoólicos apresentam a vantagem de não serem tóxicos ao consumo humano.

3.2 Espectroscopia de absorção na região Ultravioleta-Visível

O espectro de absorção dos extratos hidroalcoólicos de amostras de própolis está representado na figura 1. As amostras apresentaram espectros semelhantes, com a absorção máxima entre 290 e 400nm. Apenas a amostra oriunda de Pedro Osório apresentou um espectro de absorção inferior, de 290 a 350nm, o que pode ser relacionado ao seu menor teor de compostos fenólicos e de flavonoides. O resultado é coerente com a absorção da maioria dos compostos fenólicos que é de 250 a 350 nm.

Figura 1. Gráfico do espectro de absorção no UV-visível de extratos hidroalcoólicos de própolis de diferentes regiões.

Esta análise é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar os extratos de própolis, devido as suas atividades farmacológicas serem relacionadas ao conteúdo de compostos fenólicos, como os grupos dos flavonoides e dos ácidos fenólicos, os quais absorvem na região do ultravioleta.

De acordo com Castro et al.(2007) as própolis dos tipos 6 (Nordeste) e 12 (Sudeste) do Brasil apresentam um perfil de absorção com absorbâncias máximas em 279 e 302 nm, respectivamente. Silva et al. (2012) encontraram espectros semelhantes ao do presente estudo em amostras de própolis Portuguesa, com absorção máxima entre 290 nm e 370 nm.

3.3 Capacidade antioxidante

3.3.1 Sequestro do radical DPPH

Dentre os métodos aplicados para avaliação do potencial antioxidante, o método de sequestro do DPPH é um dos mais utilizados. Este método é considerado simples e rápido, e é empregado em grande parte dos trabalhos que avaliam o potencial antioxidante de substâncias puras e de amostras complexas.

Analisando as diferentes concentrações de extratos testadas, observou-se que da menor até a maior concentração empregada, a amostra oriunda de Rio Grande apresentou capacidade antioxidante próxima ao valor do padrão quercetina utilizada como um controle. Na maior concentração testada, de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as

duas amostras de própolis oriundas de Pelotas e a amostra de Rio Grande apresentaram valores próximos ao do controle, inibindo aproximadamente 90% dos radicais DPPH, enquanto a quercetina apresentou 97,14%. Porém, as amostras da cidade de Canguçu e de Pedro Osório, mesmo em concentrações maiores, não conseguiram inibir 50% dos radicais livres (IC50), não sendo possível encontrar o valor de IC50 para essas amostras (Tabela 1), sendo necessárias concentrações de extrato de própolis superiores das empregadas no presente estudo.

As amostras que apresentaram maior capacidade antioxidante (Rio Grande e Pelotas) também apresentaram altos teores de compostos fenólicos e de flavonoides. As amostras com menores teores desses compostos (Canguçu e Pedro Osório) apresentaram ação antioxidante significativamente inferior, sugerindo uma grande influência desses compostos na ação contra os radicais livres.

Campos et al. (2014) analisando EHP provindas do Estado de Mato Grosso-Brasil, pelo método de DPPH, encontraram IC50 de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando que esta própolis apresenta capacidade antioxidante superior as amostras analisadas neste trabalho. No entanto, Frozza et al. (2013) encontraram um IC50 de 270,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para própolis brasileira da região Nordeste, valor este bem superior ao encontrado neste estudo para as amostras de Pelotas, Pelotas 2 e Rio Grande, demonstrando menor capacidade antioxidante que as amostras analisadas no presente estudo.

As variações nos resultados da capacidade antioxidante entre os estudos com própolis podem ter ocorrido devido a diferentes técnicas de extração, bem como variações no período de coleta e localização.

3.4 Atividade antibacteriana

Os resultados para a atividade antimicrobiana das amostras estão expostos na tabela 2. Todas as amostras de própolis testadas apresentaram atividade antibacteriana, porém os resultados variaram de acordo com concentração e com a origem da amostra.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos hidroalcoólicos de própolis de cidades do Sul do RS frente a bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*.

Amostras	S. aureus		L. monocytogenes		E. coli	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Canguçu		0,53 aB	3,13 bB			
	6,25 aB					
	1,25 cB	0,36 aB	3,13 bB	6,25 aA	12,50 aA	
P. Osório						
Pelotas	0,2 aC					
	0,1 aA	0,65 aB				
	1,33 aA	6,25 aB				
	1,56 cA	6,26 aA				
	1,56 cA	12,50 aA				
	1,56 cA					
Pelotas 2	0,43 aA	1,25 cB	1,04 aA	1,56 cA	1,31	cA
	1,56 cA					

Rio Grande	0,2 aB	1,56 dB	0,91 aB	1,56 cB	3,13	bA
	3,13 bA					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Resultados do CIM e da CBM são expressos em mg.mL⁻¹.

Para a *E. coli*, as duas amostras de própolis de Pelotas foram as que apresentaram maior potencial inibitório, pois provocaram inibições bacterianas em menores concentrações de extrato, apresentando o menor CIM, com 1,31 e 1,56 mg.mL⁻¹ para Pelotas 2 e Pelotas, respectivamente. As amostras de própolis oriundas de Canguçu e de Pedro Osório necessitaram de maiores concentrações de própolis para causar a inibição de *E. coli* O157:H7, de 6,25 e 6,26 mg.mL⁻¹, respectivamente.

A concentração bactericida (CBM) dos extratos foi superior ao CIM na maioria das amostras, e em algumas foi à mesma concentração (Tabela 2). De acordo com Tosi et al. (2007), os efeitos bactericidas e bacteriostáticos de extratos de própolis dependem da concentração adicionada e são influenciadas pelo método de extração.

Houve grande variação entre as CIM e as CBM, enquanto para a *S. aureus* e *L. monocytogenes* a CBM de algumas bactérias necessitou da concentração de própolis seis vezes superior a CIM. Para *E. coli* a concentração duas vezes superior foi suficiente para a CBM. No entanto os valores da CIM para *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram, na sua maioria, inferiores às necessárias à *E. coli*, diferindo significativamente.

Como esperado, a *E. coli* apresentou maior resistência ao extrato de própolis, sendo que sua CIM e CBM foram superiores as CIM e CBM necessárias para *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Vários autores têm estudado a atividade antimicrobiana da própolis, enquanto alguns trabalhos encontraram ação somente em bactérias Gram-positivas e alguns fungos, alguns outros encontraram atividade também contra as bactérias Gram-negativas, porém utilizando maior concentração do extrato de própolis, segundo o que ocorreu no presente estudo (MARCUCCI, 1995).

Acredita-se que os compostos presentes na própolis, como flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos atuem na parede celular destas bactérias, e como as Gram-negativas possuem estrutura quimicamente mais complexa, apresentando a membrana externa contendo proteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos, reduz a efetividade desses compostos. Os lipopolissacarídeos promovem uma barreira à permeabilidade de substâncias hidrofóbicas, e são os responsáveis pela antigenicidade, toxicidade e patogenicidade das Gram negativas, o que as tornam mais resistentes à ação da própolis do que as bactérias Gram-positivas (VARGAS et al., 2004).

Kalogeropoulos et al (2009), testaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis de regiões distintas da Grécia e do Chipre. Ambas as amostras exibiram atividade antibacteriana, inibindo as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (0,15-0,60 mg.mL⁻¹), *L. monocytogenes* (0,08-0,3 mg.mL⁻¹) e *B. cereus* (0,02-0,15 mg.mL⁻¹) em menores concentrações do que as Gram-negativas *E. coli* O157:H7 (5 mg.mL⁻¹) e *Salmonella* Typhimurim (2,50 mg.mL⁻¹). No entanto, os extratos não inibiram as bactérias ácido-láticas *L. delbrueckii* subsp., *L. delbrueckii* plantarum, *L. bulgaricus* e *L. casei*. Esses resultados apontam para

seu potencial para ser utilizado como conservante e antimicrobiano em alimentos, especialmente os fermentados, pois inibiu bactérias patogênicas e não causou inibição em bactérias ácido-láticas.

As variações encontradas nos diferentes estudos na determinação da CIM podem ser atribuídas a fatores, como o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da amostra de própolis, a época da coleta, entre outros (FENNEL et al., 2004). Kalogeropoulos et al. (2009), atribuem a atividade antimicrobiana ao sinergismo entre os compostos da classe dos flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos e seus ésteres, o que poderia ser a razão para a alta atividade antimicrobiana da própolis de diferentes regiões.

No entanto, para Uzel et al. (2005) a atividade antimicrobiana é devido aos flavonoides, em especial à pinocembrina, à galangina e ao CAPE, agindo através do mecanismo de ação de inibição da RNA polimerase. Outros estudos revelam que o ácido caféico, ácido benzóico e ácido cinâmico causam danos à membrana citoplasmática e à parede celular, o que causaria perda dos íons potássio e posterior autólise. A quercetina é apontada por aumentar a permeabilidade da membrana, fazendo com que a célula perca a capacidade de produzir adenosina trifosfato (ATP) (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011).

Um mutante de *E. coli* resistente à canamicina, neomicina e ampicilina não adquiriu sensibilidade aos antibióticos na presença de 200 ou 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de própolis. Dessa forma, o uso da própolis associado a um antibiótico, pode diminuir a resistências dos micro-organismos, evitando o uso de antibióticos mais fortes (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011).

O estudo realizado por Marcucci et al. (2001), com própolis oriundos de diferentes regiões de Taiwan verificou que a CIM e a CBM dos extratos etanólicos para *S.*

aureus variou de acordo com período e o local em que foi realizada a coleta com um CIM de 15 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e CBM variando entre 15 e 60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Castro et al. (2007) também encontraram variações nos valores de CIM de acordo com os períodos de sazonalidade envolvendo as safras apícolas em amostras de própolis da região Sudeste e Nordeste do Brasil. No período de inverno houve diminuição da atividade antimicrobiana e aumento em períodos de seca, isto porque no inverno há uma menor concentração dos fitoquímicos no vegetal onde as abelhas coletam a resina.

No geral, as amostras de Pelotas e Rio Grande apresentam os melhores resultados para a atividade antibacteriana, havendo uma associação entre a concentração de fitoquímicos e atividade antimicrobiana. Observou-se que as amostras com maior capacidade antioxidante apresentaram também as melhores atividades bactericidas (método da CBM).

3.5 Atividade citotóxica

A figura 2 demonstra os resultados dos extratos hidroalcoólicos de própolis em concentrações variadas (25-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), administrados à linhagem de melanoma (B16F10) após 48h do tratamento. Observa-se que os extratos de amostras de própolis Pelotas 1, Rio Grande e Canguçu demonstraram-se mais efetivas na atividade antiproliferativa frente a linhagem tumoral estudada, pois causaram redução de células viáveis na linhagem em que foram testadas. Com relação às demais amostras, houve baixa capacidade em inibir o crescimento das células tumorais, após 48h de exposição ao tratamento.

Figura 2. Gráfico da viabilidade das células de linhagem de melanoma de camundongo B16F10 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis após 48h. Os valores apresentados no eixo X são referentes á concentrações utilizadas e são expressas em $\mu\text{g.ml}^{-1}$. No eixo Y são apresentados os valores, em porcentagem, de viabilidade celular pelo ensaio do MTT em comparação com o grupo controle (DMSO). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de Tukey como teste post-hoc (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Os extratos das amostras de própolis oriundas de Rio Grande e de Pelotas 1 apresentaram elevado teor de fitoquímicos e alta capacidade antioxidante e portanto, sendo esperado seu efeito citotóxico. Entretanto, o extrato da amostra de própolis de Canguçu não apresentou altos teores de flavonoides e de compostos fenólicos, sugerindo que a atividade citotóxica desta própolis não está somente relacionada com a presença deste grupo de fitoquímicos tradicionalmente presentes em outros tipos de própolis brasileira. Ainda, que esta amostra possua algum composto específico da classe geral destes compostos que não esteja presente nas demais amostras; e isto poderia ser justificado devido a grande variedade de vegetação que as abelhas podem utilizar no preparo da própolis.

Após 72h de tratamento (Figura 3) os resultados demonstram que as própolis oriundas das cidades de Rio Grande, Pelotas 1 e Canguçu possuem alta capacidade antitumoral nas concentrações testadas, e por isso, a continuidade de mais estudos utilizando menores concentrações do EHP, seria interessante. Segundo critérios do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI,

2014), para um extrato bruto ser considerado promissor para posterior isolamento, purificação e elucidação estrutural dos seus princípios ativos, sua IC₅₀ deve ser menor que 30 µg.mL⁻¹, o que classifica o extrato do presente estudo como sendo promissor para a linhagem tumoral investigada.

Figura 3. Gráfico da viabilidade das células de linhagem de melanoma de camundongo B16F10 expostas a diferentes concentrações e diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis, após 72h. Os valores apresentados no eixo X são referentes as concentrações utilizadas e são expressas em µg.mL⁻¹. No eixo Y são apresentados os valores, em porcentagem, de viabilidade celular pelo ensaio do MTT após 72h em comparação com o grupo controle solvente (DMSO). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido de Tukey como teste post-hoc (* = p<0,05; ** = p<0,01).

Estes resultados são extremamente positivos e encorajadores para o desenvolvimento de novas pesquisas que analisem a integridade da membrana celular e investiguem o mecanismo de ação da própolis do Sul do Rio Grande do Sul, e com o objetivo de que, futuramente, a própolis passe a ser utilizada na prevenção e no tratamento do câncer.

Percebeu-se uma relação positiva entre o teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante e a atividade citotóxica, sendo que, no geral os extratos das amostras com maior teor de compostos fenólicos causaram maior percentual de inibição nas células cancerígenas, e os extratos das amostras com menor teor desses fitoquímicos não foram tão efetivas na inibição da linhagem tumoral de melanoma de camundongo (B16F10). Também foi observado uma relação entre

os melhores resultados citotóxicos das amostras provindas de Rio Grande e de Pelotas 1 e sua alta capacidade antioxidante, avaliada pelo método com DPPH.

Segundo Frozza et al. (2013), os compostos fenólicos encontrados na própolis são conhecidos por possuírem capacidade antioxidante, e estas propriedades podem ter função essencial na atividade anticancerígena.

Gregoris et al. (2011) aplicaram amostras de própolis provindas da Itália em protetores solares, e os resultados demonstraram que a própolis e alguns de seus fitoquímicos podem ser utilizados em formulações de protetores solares devido as suas propriedades antioxidantes, atribuídas aos flavonoides, além de ter apresentado um amplo espectro de fotoproteção ultravioleta A (UVA) e ultravioleta B (UVB).

Aos ésteres do ácido cafeico tem sido atribuída a capacidade de aumentar a fosforilação e a expressão da proteína p53, que podem acelerar o processo de apoptose celular. Há relatos de que a ação destes compostos resulta da indução pela via das caspases na apoptose (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011). Isto se deve, em parte, a solubilidade deste composto em meio oleoso, o que permite sua passagem através da membrana celular e sua entrada nas células de melanoma, causando então apoptose das células.

Braganhof et al (2006) analisou o efeito da quercetina na linhagem tumoral de células de glioma humano (U138MG), e os resultados demonstraram que este flavonoide teve um efeito antiproliferativo, induzindo a morte celular através da ativação de apoptose e paragem na barreira G2 do ciclo celular.

Vários estudos foram realizados com a própolis, mas não foram encontrados relatos de que ela seja tóxica para ao homem ou animais. Em estudos realizados por Mohammadzadeh et al. (2007), administrando doses de própolis de até

20.000 mg.kg⁻¹ de peso corporal de ratos, não demonstraram morte alguma ou alteração em sinais clínicos e comportamentais em até 48 h.

Fernandes et al. (2014), avaliaram extratos de própolis brasileira contra um modelo de *Drosophila melanogaster*, sem encontrar efeitos genotóxicos nos extratos em nenhuma das concentrações testadas (3,0 - 12,0 mg.mL⁻¹), e ainda foram encontrados efeitos antígenotóxicos contra danos induzidos pela doxorubicina. Os efeitos protetores foram atribuídos ao alto teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante da própolis. Os compostos fenólicos são conhecidos por proteger a estabilidade do genoma, devido às suas diversas propriedades biológicas, incluindo a capacidade antioxidante (FERNANDES et al., 2014).

Frezza et al. (2013) testaram extratos etanólicos de própolis vermelha do Estado de Sergipe - Brasil, encontrado citotoxicidade em células tumorais de laringe e da coluna cervical após 24h de tratamento. Estudo recente utilizando culturas primárias de células normais e cancerígenas demonstrou que extratos metanólicos de própolis de origem Portuguesa apresentaram seletividade in vitro (VALENTE et al., 2011). Os resultados foram observados em células de câncer da próstata em comparação com as células epiteliais da próstata humana normal, havendo maior eficácia na inibição das células tumorais tratadas com extratos de própolis, sem causar morte celular nas células normais (MORAES et al., 2010). Salienta-se que a seletividade é um parâmetro importante para a prevenção e tratamento do câncer (FROZZA et al., 2013).

Produtos naturais, assim como a própolis, tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente drogas que possam ser empregadas na quimioterapia, uma vez que estes produtos causam poucos

efeitos secundários, se comparados às drogas atualmente utilizadas (CASTALDO e CAPASSO, 2002). A própolis tem sido o objeto de muitas pesquisas e tem demonstrado resultados satisfatórios na atividade antitumoral, como evidenciado neste estudo e corroborado por outras pesquisas.

4. Conclusão

Constatou-se uma grande variação no teor de compostos fenólicos e de flavonoides nos extratos hidroalcoólicos de própolis do Sul do Rio Grande do Sul. As amostras provindas de Pelotas e de Rio Grande apresentaram os maiores teores, sendo comparáveis com amostras de outras regiões do Brasil e de outros países. As amostras de Pelotas e de Rio Grande apresentaram alta capacidade antioxidante, sendo superiores as demais e coincidindo com os teores mais elevados de fitoquímicos nessas amostras.

Quanto à atividade antibacteriana, todos os extratos das amostras de própolis foram eficazes na inibição das bactérias testadas, apresentando atividade bacteriostática e bactericida. De uma maneira geral, os resultados foram melhores na inibição das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*).

Constatou-se efeito citotóxico em células de câncer de melanoma, porém houveram variações entre as amostras, e o efeito foi dependente da concentração e do tempo utilizado, sendo as amostras de Rio Grande, Canguçu e Pelotas as mais eficazes. Estes resultados indicam que as amostras analisadas podem ser utilizadas para fins alimentícios como conservantes, e para fins farmacológicos podendo ser consumida na forma de extratos, cápsula ou adicionado em produtos dermatológicos, devido as suas ações antioxidante, antibacteriana e citotóxica.

Sugerem-se mais estudos com própolis do Rio Grande do Sul, de forma a caracterizar e identificar os compostos responsáveis pelas atividades biológicas, bem como de estabelecer relação com a fonte botânica.

Referências

ALVES, E. KUBOTA, E. H. (2013). Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34 (1), 37-41.

CABRAL I. S. R. OLDONI T. L. C. PRADO A. BEZERRA R. M. N. ALENCAR S. M. IKEGAKI M. ROSALEN P. (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32 (6), 1523-27.

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

CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. de. (2010). Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Veterinary Microbiology*, 142, 432–434.

CASTALDO C. CAPASSO, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 (1), S1-S6.

CASTRO, M. L. CURY, J. A. ROSALEN, P. L. ALENCAR, S. M. IKEGAKI, M. KOO, H. DUARTE, S. (2007). Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, 30 (7),1512-1516.

FALCÃO, S. VILAS-BOAS, M. ESTEVINHO, L.M. BARROS, C. DOMINGUES, M.R.M. CARDOSO, S.M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 887-897.

FENNEL, C. W. LINDSEY, K. L. MC GAW L. J. SPARG, S.G. STAFFORD, G. I. ELGORASHI, E. E. GRACE, O. M. VAN STADEN, J. (2004). Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal Ethnopharmacologie*, 94, 205-217.

FERNANDES, F. H. GUTERRES, Z. DA R. GARCEZ, W. S. LOPES, S. M. CORSINO, J. GARCEZ, F. R. (2014). Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. *Food Research International*, 62, 20–26.

FROZZA, C. O. da S. GARCIA, C. S. C. GAMBATO, G. SOUZA, M. D. O. de; SALVADOR, M. MOURA, S. PADILHA, F. F. SEIXAS, F. K. COLLARES, T. BORSUK, S. DELLAGOSTIN, O. A. PÊGAS, J. A. ROESCH-ELY, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137–142.

GREGORIS, E. FABRIS, S. BERTELLE, M. GRASSATO, L. STEVANATO, R. (2011). Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 405, 97–101.

ISHIDA, V. F. de C. NEGRI, G. SALATINO, Antonio S. BANDEIRA, M. F. C.L. (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125, 966–972.

KALOGEROPOULOS, N. KONTELES, S. J. TROULLIDOU, E. MOURTZINOS, I. KARATHANOS, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452–461.

MARCUCCI, M. C. FERRERES, F. GARCÍA-VIGUERA, C. BANKOVA, V. S. DE CASTRO, S. L. DANTAS, A. P. VALENTE, P. H. M. PAULINO, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 105–112.

MARCUCCI, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83–99.

MELLO, B. C. B. S. PETRUS, J. C. C. HUBINGER, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96, 533–539.

MOHAMMADZADEH S. SHARIATPANAH M. HAMED M. AHMADKHANIHA R. SAMADI N. OSTAD S. N. (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103, 1097–1103.

MOREIRA, L. DIAS, L. G. PEREIRA, J. A. ESTEVINHO, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3482 – 3485.

MOREIRA, L. L. ROGÃO, M. ESTEVINHO, L. Efeitos terapêuticos do própolis na saúde humana (2011). *O Apicultor*, 20 (71). Disponível em: <<http://www.oapicultor.com/>>. Acesso em: 27 Jan. 2015.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunologie*, 65, 55–63.

NACIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

PARK, Y. K. IKEGAKI, M. ABREU, J. A. S. ALCICI, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18 (3), 313-318.

PEREIRA, A. dos S. SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. de A. (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25 (2), 321-326.

SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1790–1795..

TOSI, E. A. RÉ, E. ORTEGA, M. E. CAZZOLI, A. F. (2007). Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 104, 3, 1025-1029.

UZEL, A. SORKUN, K. ÖNÇAG, Ö. ÇOGULU, D. GENÇAY, Ö.; SALIH, B. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160, 189-195.

VALENTE, M.J. BALTAZAR, A.F. HENRIQUE, R. ESTEVINHO, L. CARVALHO, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free

radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 86–92.

VARGAS, A. C. LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S. VIANA, L. R. (2004). Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, 34, 159-163.

VICENTINO, A. R. R. MENEZES, F. S. (2007). Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (3), 384-387.

WENG, C. J. YEN, G. C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38 (10), 76–87.