

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JOSIELY PEREIRA MACHADO

**AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA EM DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS ÂMBAR**

São Gabriel

2017

JOSIELY PEREIRA MACHADO

**AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA EM DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS ÂMBAR**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia, Universidade federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como requisito necessário à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Andrés Delgado Cañedo

São Gabriel

2017

JOSIELY PEREIRA MACHADO

**AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA EM DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS ÂMBAR**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como requisito necessário à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Dissertação defendida e aprovada em: 13/11/2017.

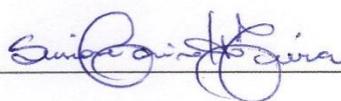
Banca examinadora:



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador

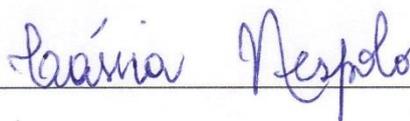
Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA



Prof.^a. Dr.^a. Susiane Cavinatto Meira

Banca examinadora

Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA



Prof.^a. Dr.^a Cássia Regina Nespolo

Banca examinadora

Universidade Federal do Pampa- UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus pais, Estela e Josias, e aos meus irmãos, Alex e Nicolly, simplesmente por tudo. Por todo empenho nesses anos da minha graduação pra que nada me faltasse, por jamais medirem esforços, por serem minha fortaleza quando tinha vontade de desistir. Tudo que fiz foi por vocês!

Ao Rian, que também esteve junto comigo toda minha graduação. Agradeço por todo o carinho recebido, por aguentar todos meus choros, por todos domingos e feriados que me levou ao laboratório, pela compreensão e companheirismo de sempre.

Ao meu orientador, Andrés, primeiro pela oportunidade de fazer parte do laboratório e por todas as orientações (que as vezes me desorientavam) recebidas, por todos ensinamentos que me passou. Aprendi muito contigo!

A Viviane, que é um pedacinho deste TCC. Que teve um participação ímpar nesse trabalho e no desenvolvimento da minha vida acadêmica. Primeiro agradeço por fazer eu me apaixonar pela nossa amada própolis e também pela cultura celular. Obrigada por todo o cuidado, paciência e ajuda que teve comigo. Tu foste essencial para que eu concluísse esse trabalho, muito do que sei é graças a ti!

A todos meus colegas de laboratório que passaram durante esses 3 anos, em especial a Érika, Eliane e Hudson por estarem comigo sempre, por compartilharem todas as lamentações, alegrias, almoços, desesperos e experimentos errados.

As minhas amigas, Ingrid e Thaís, que mesmo longe se fizeram presentes em todos os momentos durante esses anos, desde minha entrada na graduação, hospitalidade no estágio, conversas até agora nessa etapa final.

Aos técnicos, Adriano, Susi e Daia, por estarem sempre a postos todas as vezes que precisei de ajuda.

Muito obrigada, Deus, por colocar todas essas pessoas especiais em meu caminho pra que me ajudassem de uma forma ou outra na conclusão deste trabalho!

RESUMO

O câncer está entre as três primeiras causas de morte no Brasil e é considerado um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, aumentando o interesse por compostos ativos. Produtos apícolas tem ganhado atenção devido às atividades biológicas apresentadas, em destaque a própolis, que tem sido alvo de intensos estudos demonstrando atividade antifúngica, antiviral, antibacteriana, antioxidante e recentemente atividade antitumoral. O uso da própolis brasileira na “fitoterapia ou apiterapia” não deve ser generalizado devido ao fato que a sua composição química complexa e altamente variável de acordo com a localização geográfica, períodos sazonais e distribuição vegetal, sendo assim de grande importância a identificação e isolamento dos compostos ativos de extrato da própolis para desenvolver novos fármacos para terapias do câncer. O objetivo deste trabalho foi testar diferentes métodos para produção de extratos da própolis do município de São Gabriel, denominada própolis Âmbar, avaliando sua atividade antileucêmica através de teste de viabilidade celular e determinação do IC₅₀ e analisar o perfil cromatográfico dos extratos por HPLC. A preparação dos extratos hexânicos e diclorometano foram realizadas com as amostras da própolis do município de São Gabriel/RS dos anos de 2014 e 2015. Primeiramente, realizou a metodologia maceração de extração a quente pelo extrator Soxhlet. Após os extratos obtidos foram conduzidos a reação de saponificação em meio metanólico básico sendo, o produto extraído obtendo-se apenas a porção insaponificável. Posteriormente, a fim de comparação para atividade biológica utilizou-se a metodologia de maceração, extraído a temperatura ambiente no período de 7 dias, com agitações periódicas. A atividade antileucêmica foi analisada na linhagem celular Jurkat pelo parâmetro de IC₅₀ e viabilidade celular usando ensaio de exclusão com iodeto de propídio por citometria de fluxo e o perfil cromatográfico foi analisado por HPLC. Os resultados obtidos mostraram efeito antileucêmico dos extratos da própolis em todas extrações pelos métodos de extração e solventes com exceção do produto insaponificado do hexano dos dois anos. O IC₅₀ das amostras foram as concentrações finais entre 0,2 a 0,5 µg/mL. Quando realizado o perfil cromatográfico das amostras, revelou um pico distintivo a aproximadamente 30 minutos na qual levantamos a hipótese de que seja um possível marcador fitoquímico da própolis; porém, não logramos evidenciar ainda algum pico que pudesse explicar a diferença das atividades nos extratos produzidos. Concluindo, a extração

por Soxhlet foi a que demonstrou maior eficiência pelo benefício da redução do tempo de extração, assim como do solvente diclorometano pela extração de compostos apolares e de baixa polaridade que demonstrou maior semelhança entre as amostras, apresentando dados similares aos obtidos com o extrato etanólico desta própolis.

Palavras-chave: Própolis brasileira; Extratos naturais; hexano; diclorometano; Soxhlet.

ABSTRACT

Cancer is among the Brazil's top three causes of death and is considered a public health problem, especially among developing countries, increasing interest in new active compounds. Apiculture products have gained attention due to their biological activities, mainly the propolis, which has been extensively studied demonstrating antifungal activity, antiviral, antibacterial, antioxidant and recently antitumor activity. The use of Brazilian propolis in "phytotherapy or apitherapy" should not be generalized due to the fact that its chemical composition is complex and highly variable according to geographic location, seasonal periods and plant distribution, being therefore of great importance the identification and isolation of active compounds from propolis extract to develop new drugs for cancer therapies. The objective of this work was to test different methods for the production of extracts of propolis from São Gabriel, denominated propolis Amber, evaluating its antileukemic activity through cell viability and IC₅₀ test and to analyze the chromatographic profile of extracts by HPLC. The preparation of the hexane extracts and dichloromethane were carried out with the samples of the propolis of the city of São Gabriel / RS of the years 2014 and 2015. First, it carried out the maceration methodology of hot extraction by the Soxhlet extractor. After the obtained extracts were conducted the saponification reaction in basic methanolic medium being the product extracted obtaining only the unsaponifiable portion. Subsequently, in order to compare for biological activity, the maceration methodology was used, extracting the ambient temperature in the period of 7 days, with periodic agitations. The antileukemic activity was analyzed in the Jurkat cell line by the IC₅₀ parameter and cell viability using Propidium Iodide exclusion test by flow cytometry and the chromatographic profile was analyzed by HPLC. The results showed antileukemic effect of the extracts of propolis in all extractions by the extraction methods and solvents with the exception of the unsaponified Hexane for both propolis samples. The IC₅₀ dosis of the extracts that presented antileukemic activity were concentrations between 0.2 to 0.5 µg / mL. When the chromatographic profile was carried out, they showed a distinctive peak at approximately 30 minutes in which we hypothesized that it is a possible phytochemical marker for amber propolis; however, we did not obtain any evidence yet about what peak could explain the activity differences between the extracts produced. In conclusion, the Soxhlet extraction was the more efficient method because of the reduction of the extraction time, as well as the

Dichloromethane solvent by the extraction of apolar compounds and of low polarity that showed greater similarity between the samples activities, presenting similar data to those obtained with the ethanolic extract of this propolis.

Keywords: Brazilian propolis; natural extratcs; Hexane; Dichloromethane; Soxhlet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema comparativo entre as técnicas de maceração, ultrassom e micro-ondas	16
Figura 2 – Efeito citotóxico dos extratos da própolis Âmbar em células da linhagem Jurkat após 24 horas de tratamento.	21
Figura 3 – Valores da concentração inibitória média (IC50) dos diferentes extratos de própolis da própolis Âmbar na linhagem celular Jurkat.....	24
Figura 4 – Perfil cromatográfico representativo do HPLC dos diferentes extratos da própolis Âmbar a 254 e 268 nm.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Histórico da Própolis	11
1.2 A Própolis e suas atividades biológicas	12
1.3 Métodos de extração	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Preparação dos Extratos de Própolis	19
3.2 Cultura de células e tratamento	19
3.3 Análise da viabilidade celular e determinação do IC ₅₀	20
3.4 Análise do perfil cromatográfico por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	20
3.5 Análise estatística	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Análise da viabilidade celular	21
4.2 Determinação do IC ₅₀	23
4.3 Análises do perfil cromatográfico por HPLC	25
5. CONCLUSÃO	28
6. REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da própolis

Em geral de aspecto pastoso e formada por materiais resinosos e balsâmicos de origem vegetal, a própolis é coletada pelas abelhas e modificada por meio de suas secreções salivares. É utilizada para vedação de suas colmeias e proteção contra intrusos como insetos e micro-organismos, por isso a palavra grega original "própolis" significa "defesa da população", podendo ser de cores e consistências variadas (Chan *et al.*, 2013).

A própolis já era utilizada na medicina popular desde 300 aC em diferentes civilizações, como os persas, gregos e romanos, junto com outros produtos das abelhas como o mel, geleia real e pólen (Ghisalberti, 1978). Sendo encontrada na literatura da França desde o século XVI (Ramos e Miranda 2007) e empregadas em clínicas médicas soviéticas durante a Segunda Guerra Mundial, também usadas durante a Guerra dos Bôeres na África do Sul, trazendo excelentes resultados (Díaz, 1997).

No século XVII, as farmacopeias de Londres elencaram a própolis como uma droga oficial, assim como os incas utilizavam a própolis como agente antitérmico. (Castaldo e Capasso, 2002). Há relatos ainda que os egípcios já utilizassem a própolis para evitar a decomposição de cadáveres como uma substância de “embalsamento”, o que é aplicado pelas abelhas para mumificar animais que foram mortos dentro de suas colmeias (Díaz, 1997). Ocorrem indícios que os árabes também faziam uso da própolis para limpeza e alguns manuscritos persas que descreviam a droga contra eczemas, mialgia e reumatismo (Fearnley, 2001).

Durante a Idade Média, a própolis foi perdendo sua popularidade e seu uso medicinal, mas o interesse pela própolis retornou no início do século XIX, onde foi estudada e descrita por Nicolas Louis Vauquelin, um farmacêutico e químico francês (Pereira *et al.*, 2002).

Nos anos de 1950 e 1960 em alguns países como a ex-União Soviética, Bulgária, República Tcheca e Polônia a própolis começou a ser vista como uma alternativa para tratamento de problemas de saúde. Ainda assim, só adquiriu popularidade na América do Sul e do Norte e no Japão a partir de 1980. E foi no Japão, em 1985 na cidade de Nagoia, no 30º Congresso Internacional de Apicultura, que o primeiro anúncio sobre a atividade farmacológica promissora da própolis ocorreu (Salatino *et al.*, 2005). Antes disso, no Brasil decorreu-se a primeira publicação sobre a própolis, foi em 1984 um estudo comparativo do efeito da própolis e antibiótico na inibição de *Staphylococcus aureus*, onde a própolis

brasileira estudada apresentou mais atividade do que vários antibióticos testados (Pereira *et al.*, 2002).

Começou-se então um aumento gradual do interesse das pessoas pela própolis, que até aquele momento, era considerado somente um subproduto indesejável, sem valor no mercado e prejudicava a produção de mel. Isto tornou-a um produto de grande importância na medicina complementar e alternativa (Salatino *et al.*, 2005).

1.2 A própolis e suas atividades biológicas

Para as abelhas, a própolis pode ser um mecanismo de automedicação no nível de colônia, apoiando o conceito de que a coleta de resina pelas abelhas é uma forma de imunidade social. Estes exemplos descrevem comportamentos que se enquadram sob o termo *pharmacophagy*, que é a ingestão de substâncias não-nutritivas para fins que não sejam demandas energéticas. Neste caso, com as abelhas, as resinas não são ingeridas, mas usadas dentro da colmeia pelas abelhas adultas como, por exemplo, quando expostas a esporos de fungos (Finstrom e Spivak, 2013).

As substâncias disponíveis para as abelhas produzirem a sua própolis vêm de uma enorme variedade de processos botânicos em diferentes partes de plantas. Assim, além das substâncias ativamente secretadas pelas abelhas a própolis possui substâncias encontradas no exsudato de cortes das plantas, materiais lipofílicos das folhas e dos brotos foliares, mucilagens, gomas, resinas e látex (Bankova *et al.*, 2000). Em geral, a própolis é composta por 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (Park *et al.*, 2002; Burdock, 1998; Funari e Ferro, 2006; Menezes, 2005; Woisky *et al.*, 1998).

Ainda assim a sua composição química não é definida, variando conforme a flora da região, época da colheita, a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (Pereira *et al.*, 2002), o que é muito recorrente em própolis brasileiras devido à grande diversidade do Brasil. Característica essa, que concede uma enorme importância nas propriedades químicas e biológicas da própolis e o estudo da mesma.

Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens

diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides, terpenos, b-esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (Aga *et al.*, 1994; Bankova *et al.*, 1995; Marcucci *et al.*, 1995).

Park *et al.* (2002) classificaram a própolis brasileira em 12 grupos com base em suas características físico-químicas e também investigou a origem botânica destas por métodos cromatográficos. Cinco tipos no sul do Brasil, sendo 2 tipos do Rio Grande do Sul, 1 no grupo do sudeste do Brasil e 6 no grupo do Nordeste do Brasil. A própolis brasileira, que é produzida num clima tropical, é significativamente diferente da própolis encontrada na zona temperada, por causa das diferenças nas fontes vegetais (Bankova *et al.*, 2000). Posteriormente, Park *et al.* (2004) através do perfil químico identificaram a origem botânica da própolis classificada como G12, própolis verde da região Sudeste, vinda de *Baccharis dracunculifolia*.

Silva *et al.* (2008) mostrou um novo tipo de própolis, denominada própolis Vermelha devido a sua coloração, encontrada em Maceió no estado de Alagoas com a composição química diferente dos 12 tipos descritos por Park *et al.* (2002), característica por ser rica em isoflavonóides na qual ganhou a classificação G13. Os flavonóides e ácidos fenólicos ganham destaque na composição química da própolis, pois é atribuída a eles grande parte das atividades biológicas constatadas nas amostras de própolis (Funari e Ferro, 2006). Sendo essa relação a que torna o uso da própolis na “fitoterapia ou Apiterapia” um grande problema.

Nestes últimos 30 anos, a própolis tornou-se ferramenta para intensos estudos farmacológicos e químicos (Bankova, 2005), incluindo atividade antifúngica, antiviral, antibacteriana, antioxidante (Park *et al.*, 1998). Kumazawa *et al.* (2004) apontou a atividade antioxidante de extratos etanólicos da própolis da Argentina, Austrália, China, Hungria e Nova Zelândia, correlacionando com o conteúdo total de polifenóis e flavonoides encontrados nas própolis onde as própolis com forte atividade antioxidante continham compostos antioxidativos como o kaempferol e o éster fenílico do ácido caféico (CAPE). As substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana ainda não foram descritas em sua totalidade, pois podem variar de uma amostra para outra (Dos Santos *et al.*, 2003).

Mais recentemente ainda, em estudos oncológicos, a própolis vem apresentando mecanismos benéficos para terapia anticancerígena, induzindo apoptose (morte celular programada), parada no ciclo celular e o extrato etanólico (EPP) da própolis e os seus

componentes fenólicos suprindo a proliferação celular tumoral (Sawick *et al.*, 2012; Król e Szliszk, 2013). O câncer é um problema de saúde pública e está entre as três primeiras causas de morte no Brasil. A leucemia representa um grupo de neoplasias malignas derivadas das células hematopoiéticas, incluindo células destinadas a formar eritrócitos (células vermelhas do sangue), células secretoras de anticorpos (plasma) assim como células de linfócito T e B. Tem início na medula-óssea, local onde as células sanguíneas são produzidas, e posteriormente invadem o sangue periférico, podendo atingir vários órgãos do paciente afetado.

Os componentes fenólicos abundantes na própolis tem se mostrado os responsáveis por efeito antileucêmico, exercendo papel quimiopreventivo por múltiplos mecanismos moleculares em células cancerosas, vias de apoptose e de sinalização (Król e Szliszk, 2013). Por exemplo, o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) é um importante agente contra o câncer, é um endógeno que induz apoptose seletivamente em células tumorais. No entanto, algumas células cancerosas são resistentes à apoptose mediada por TRAIL. O extrato etanólico de própolis verde é rico em componentes fenólicos e estudos *in vitro* indicaram os altos potenciais na via apoptótica induzida por TRAIL para a atividade quimiopreventiva de câncer utilizando a própolis brasileira (Szliszka *et al.*, 2011).

Bonamigo *et al.* (2017) comprovaram a qualidade da própolis do bioma do Cerrado Brasileiro através de extratos de *Plebeia droryana* e *Apis mellifera* que reduziram a viabilidade celular da linhagem tumoral de eritroleucemia K562, ocasionando morte necrótica das células. O que mostra a presença de importantes compostos com a capacidade de minimizar a ação de substâncias oxidantes no organismo e reduzindo a viabilidade das células de eritroleucemia.

O ácido Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é um componente ativo presente na própolis verde brasileira que possui atividade antitumoral. Quando a Artepillin C foi aplicada em linhagens celulares de leucemia humana de diferentes fenótipos, exibiu potentes efeitos citotóxicos e induziu níveis marcantes de apoptose em todas as linhagens celulares, principalmente em células T (Kimoto *et al.* 2001).

As própolis verde e vermelha são as duas variedades mais estudadas do Brasil, supervalorizadas no mercado, são características por possuírem fortes atividades biológicas. Franchi *et al.* (2012) comparou as atividades citotóxicas *in vitro* de própolis verde (G12) e própolis vermelho (G13) em células de leucemia humana, onde a própolis vermelha

mostrou uma atividade mais acentuada em relação a própolis verde. Concluindo a necessidade de um maior isolamento dos compostos químicos da própolis vermelha (G13) para identificação das atividades (Franchi et al. 2012). Estudos mostraram o potencial antifúngico utilizando de própolis verde e própolis vermelha contra amostras de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes* levantando a possibilidade de usar essas própolis como um tratamento alternativo para a dermatofitose causada por fungos deste gênero (Siqueira et al. 2008).

Há um grande interesse dos pesquisadores em investigar a ação de compostos isolados da própolis, no entanto, a composição química altamente variável nas diversas amostras torna a análise uma tarefa abstrusa. No caso do Brasil, essa tarefa é mais árdua ainda devido a grande biodiversidade brasileira que acarreta na variação das propriedades biológicas e composição química (Pereira et al., 2002; Kuropatnicki et al., 2013) tornando a própolis brasileira em matéria prima de altíssimo valor na bioprospecção.

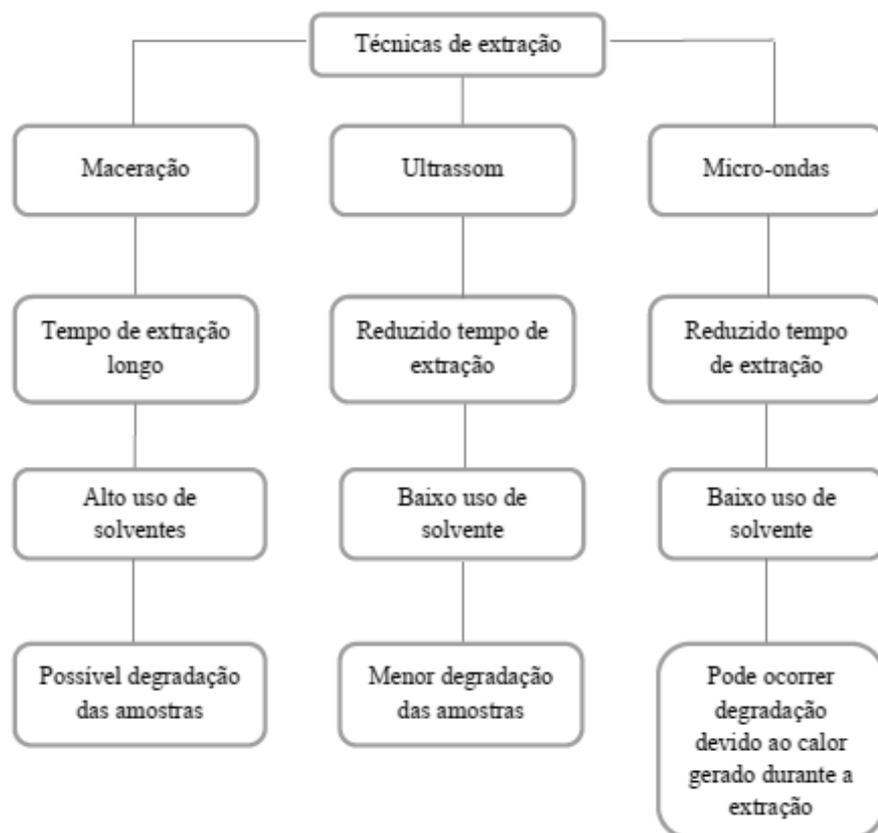
1.3 Métodos de extração

Diversos processos de isolamento e de caracterização de frações, a partir de um extrato bruto, são realizados com a finalidade de elucidar as estruturas químicas envolvidas nas atividades biológicas citadas da própolis. O propósito dos pesquisadores é isolar substâncias específicas da própolis com solventes e procedimentos extrativos (Pereira et al., 1998 apud Cunha et al., 2004). Em 2004, Cunha e colaboradores chama a atenção para a falta de padrão no procedimento extrativo e análise da composição geral da própolis, salientando que este deveria ser o primeiro passo para implementação do controle de qualidade dos produtos derivados da própolis.

Antes de iniciar o procedimento extrativo, deve-se garantir que a amostra esteja com sua estabilidade intacta. Fatores como exposição ao ar, presença de luz, tempo de extração, temperatura, radicais livres podem acarretar em degradação dos compostos. Em geral os métodos de extração que já vem sendo usados há muitas décadas, são demorados e requerem quantidades relativamente grandes de solventes. Por este motivos a necessidade de desenvolvimento de novo métodos cresceu nos últimos anos (Biesaga, 2011). Outros fatores que foram considerados para evolução dos métodos extrativos convencionais foi a purificação e o aumento do rendimento de um composto alvo sem afetar as propriedades do composto. Por exemplo, técnicas de extração padrão sólida-líquida dependem de aprimoramento

mecânico ou de temperatura, como a maceração e Soxhlet (Tiwari e McDonnell, 2017). Diversos fatores como o tipo e concentração dos solventes utilizados, razão solvente-sólido, tempo de extração, temperatura aplicada, pH, entre outros estão relacionados a taxa de eficiência de cada método extrativo (Figura 1). A solubilização dos compostos de interesse também deve ter uma alta atenção na preparação dos extratos (Azmir *et al.*, 2013).

Figura 1 - Esquema comparativo entre as técnicas de maceração, ultrassom e micro-ondas.



Fonte: Santos, 2016.

A técnica de maceração, considerada um dos métodos convencionais consiste basicamente em colocar a amostra em contato com o solvente, com ou sem agitação, por um período de tempo relativamente longo, à temperatura ambiente ou com aquecimento, até a completa solubilização dos compostos químicos no solvente. Solventes contendo 70% de etanol ou mais são efetivos na extração de resinas das própolis brasileiras por maceração (Sawaya *et al.*, 2011). Isto pode ser comprovado em Dos Santos *et al.* (2003) que avaliaram diferentes EEP na atividade antimicrobiana contra cepas multirresistente de *Staphylococcus aureus*, determinando que a utilização de álcool 70% como ideal. Ainda assim para algumas

aplicações, o teor alcoólico do solvente não é desejável, portanto, alternativas de solventes para extrações de compostos da própolis têm sido testadas (Sawaya *et al.*, 2011). Enquanto isso o etanol continua sendo eleito o solvente mais utilizado para extrações de própolis (Sawaya *et al.*, 2011).

Processos de extração por micro-ondas são eficientes na extração de metabólitos a partir de materiais biológicos diversos, entretanto essa técnica possui fatores limitantes como a potência, frequência, temperatura, pressão, tempo de exposição e o solvente adequado que permita a absorção da energia no equipamento. (Zhang *et al.*, 2011).

A extração por Soxhlet tem a vantagem de reduzir o tempo de extração e aumentar o rendimento. O extrator Soxhlet é dividido por três principais secções: um percolador (um balão de destilação e um condensador de refluxo) onde ocorre o refluxo do solvente, um dedal que é um filtro onde permanecem as partículas sólidas, e um sifão, que esvazia periodicamente a câmara onde o dedal é colocado. Durante cada ciclo, uma porção de composto não-volátil dissolve-se no solvente. O composto é concentrado no balão de destilação após várias passagens do solvente pela amostra sólida (FCiências, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Testar diferentes métodos para produção de extratos da própolis do município de São Gabriel, denominada própolis Âmbar, avaliando sua atividade antileucêmica.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos das amostras da própolis Âmbar pelo método de Soxhlet com solventes hexano ou diclorometano;
- Obter extratos das amostras da própolis Âmbar pelo método de maceração com solventes hexano ou diclorometano;
- Realizar reações de saponificação dos extratos da própolis Âmbar hexânico e diclorometano para obtenção do produto insaponificação;
- Avaliar a atividade antileucêmica dos extratos da própolis Âmbar, através de análise da viabilidade celular na linhagem leucêmica Jurkat;
- Definir o IC₅₀ dos extratos da própolis Âmbar na linhagem leucêmica Jurkat;
- Avaliar o perfil cromatográfico dos extratos obtidos da própolis Âmbar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação dos extratos da própolis

Foram testadas amostras de própolis produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera* do município de São Gabriel, uma amostra coletada no mês de março de 2014 e uma amostra coletada no mês de setembro de 2015, sendo de um mesmo apiário, aqui denominadas própolis Âmbar devido sua coloração.

Para extração por Soxhlet, foi realizada a maceração de 10 g das amostras da própolis à temperatura ambiente e adicionados 400 mL de solventes, hexano ou diclorometano, refluxando durante 12 horas a aproximadamente 60°C. A seguir, o solvente foi removido em rotaevaporador modelo 2 Hei-Vap Precision Heidolph e os extratos foram diluídos em dimetilsufóxido (DMSO) na concentração de 100% (p/v). Alternativamente, 1 grama de cada extração de diferentes solventes foi saponificada, refluxando por 1 hora com uma solução de KOH em metanol (0,5% m/v). O material insaponificável foi extraído da mistura alcalina com éter etílico e solubilizado em DMSO na concentração de 100% (p/v).

Das mesmas amostras de própolis, foram realizados extratos por maceração a temperatura ambiente durante 7 dias, com agitação periódica com os mesmos solventes e proporções usadas na extração por Soxhlet.

3.2 Cultura celular e tratamentos

Células da linhagem celular Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg /mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂, desenvolvendo-se em meio completo que foi trocado cada 2-3 dias. Depois de atingir aproximadamente 80% de confluência, as células foram transferidas para placas de cultura de plástico de 96 poços, na concentração inicial de 1×10^5 células/mL para determinação do IC₅₀ e análise da viabilidade celular e mantidas por 24 horas antes dos tratamentos. Células tratadas apenas com DMSO e células sem tratamentos foram utilizadas como controle. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

3.3 Análise da viabilidade celular e determinação da dose de IC₅₀

A viabilidade celular foi medida usando o ensaio de exclusão com Iodeto de Propídio (PI). A linhagem celular foi plaqueada em placas de 96 poços em 200µL na concentração de 1×10^5 células/mL, após 24 horas foram tratadas com 0,2 µg/mL dos extratos de própolis. Passada 24 horas de exposição ao tratamento, foi adicionado 1,25 µg/mL de PI e a viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo adquirindo 10000 células discriminadas em gráfico FSC-H vs. SSC-H e discriminando células vivas e mortas em gráficos FL2-H vs. SSC-H. A análise de IC₅₀ (50% da concentração inibitória média) foi realizada como descrito para viabilidade celular tratando as células com concentrações finais de 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL de cada extrato de própolis.

3.4 Análise do perfil cromatográfico por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

A análise do perfil químico dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram realizadas no HPLC Shimadzu, acoplado com um detector UV/VIS por arranjo de diodos (SPD-M20A) e o programa LC solution SP1 1,22. Para análise foram injetados 20 µL em uma coluna Phenomenex C18 (4,6 mm x 250 mm). A fase móvel constituiu de um solvente A: água e o solvente B: metanol. Em uma taxa de fluxo de 1 mL/min, foi usado o seguinte gradiente linear: 0:15 min 30% de B; de 15:20 min 60% de B; de 20:30 min 70% de B; de 30:40 min 80% de B; de 40:65 min 90% de B; de 65:75 min 30% de B e 75:90 min ocorreu a diminuição da proporção do solvente gradativamente até 0%. A detecção foi monitorada a 254 e 268 nm.

3.5 Análise estatística

Os resultados são expressos com média \pm desvio padrão de pelo menos três amostras. As análises estatísticas da viabilidade celular foram realizadas por *one-way* ANOVA seguido pelos testes de Brown-Forsythe e Tukey analisando as diferenças entre os tratamentos. As diferenças estatísticas foram determinadas utilizando o programa GraphPad-Prism (versão 6) e foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

As análises de IC₅₀ foram realizadas no programa GraphPad-Prism (versão 6) utilizando uma curva de regressão não linear de dose resposta sigmoidal que representa a

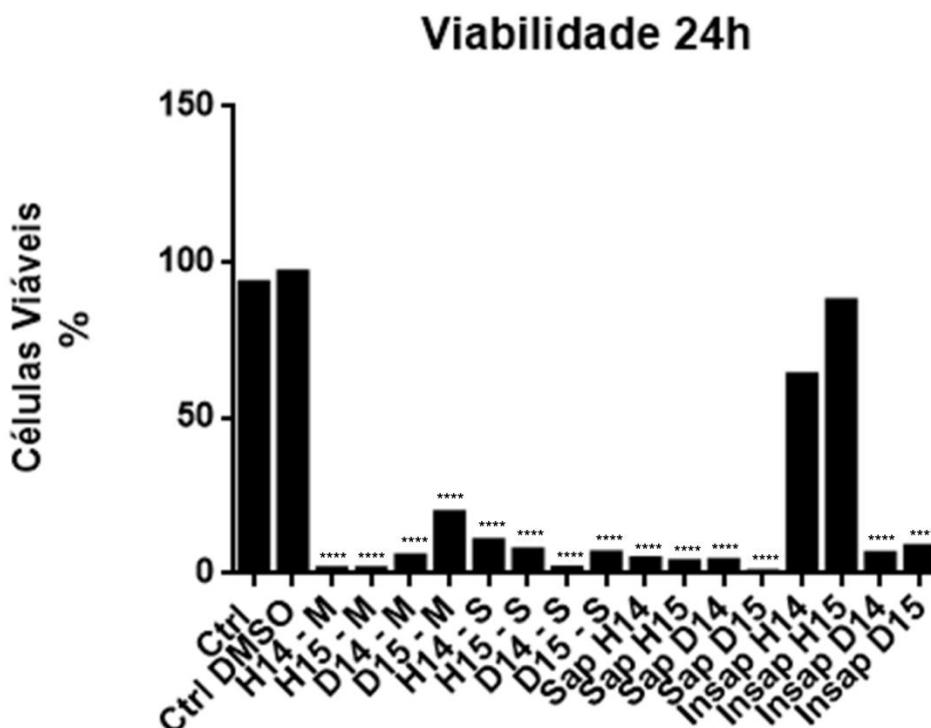
correlação entre a porcentagem de inibição e as concentrações dos extratos da própolis. Para ajuste e determinação do IC50 foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da viabilidade celular

Os tratamentos das células Jurkat com diferentes extrações da própolis Âmbar a 0,2 µg/mL causou diminuição da viabilidade celular após 24 horas de exposição na maioria dos extratos, exceto no material insaponificável obtido do extrato hexânico. Todas as extrações obtiveram efeito estatístico significativo quando comparadas ao controle ($p \leq 0,0001$) com exceção do insaponificado de hexano 2014 e 2015 como mostrados na Figura 2. Estes resultados sugerem que a própolis Âmbar pode possuir mais de um composto com atividade antileucêmica.

Figura 2 – Efeito citotóxico dos extratos da própolis Âmbar em células da linhagem Jurkat após 24 horas de tratamento. **** $p \leq 0,0001$. H= hexano; D= diclorometano; Sap= Saponificado; Insap= Insaponificado; M= Maceração; S= Soxhlet; 14= 2014; 15= 2015.



A reação de saponificação consiste na hidrólise de lipídeos (óleos vegetais ou gorduras) por intermédio da adição de uma base forte, transformando os ácidos graxos presentes na amostra em sal orgânico. O material insaponificável, ou seja, os que restaram na solução alcalina são as moléculas que não possuem ácidos graxos e que são extraídas com éter etílico.

Quando comparados os produtos nsaponificáveis do extrato de hexano com o extrato de diclorometano, o material extraído com hexano demonstrou uma baixa atividade contra a linhagem celular. Devido a polaridade dos solventes, o diclorometano tem a característica de extrair compostos apolares, que também são extraídos pelo hexano, mas também outros compostos com baixa polaridade, como descrito por Cabral e colaboradores (2013). Através do teste de viabilidade celular nestas duas reações foi possível hipotetizar que existem, ao menos, dois grupos de moléculas com atividade citotóxica contra a linhagem celular leucêmica. As moléculas com ácidos graxos que são extraídas com hexano e diclorometano pela reação de saponificação e moléculas com atividades antileucêmica não saponificáveis extraídas exclusivamente pelo diclorometano. Porém quando comparados os solventes nas demais extrações não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,0001$).

A extração pelo método de Soxhlet é baseada na circulação do solvente quando aquecido até atingir a temperatura de refluxo. Encontra-se na literatura que o aumento da temperatura neste método tem a vantagem da solubilização da cera presente na própolis, mas provavelmente prejudica os compostos termolábeis (Biscaia e Ferreira, 2009). O outro método de extração utilizado no presente trabalho foi a maceração da própolis em temperatura ambiente pelo período de 7 dias. Comparando os dois métodos, não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,0001$) na viabilidade das células Jurkat onde ambos tiveram uma alta citotoxicidade. Presumindo que a temperatura utilizada no método de extração não causou danos aos compostos químicos dos extratos.

Ainda avaliando os dois métodos de extração, quando considerado o tempo de extração o uso do Soxhlet (12 horas) teve uma redução de tempo comparado à extração por maceração em temperatura ambiente por 7 dias, o que já é comprovado por outros autores que concluíram que o uso do Soxhlet reduz o tempo de extração (Cunha *et al*, 2004).

Ferreira (2017) avaliou a atividade antileucêmica da própolis Âmbra bruta, na qual foi denominada própolis Âmbra a partir da cor de seu extrato etanólico. A concentração letal da própolis bruta é 100x menor comparado as extrações por hexano e diclorometano avaliadas no

nosso trabalho. Com isso, suspeita-se que o sinergismo dos compostos contribuem para um melhor efeito da atividade antileucêmica desta própolis ou, ainda, a possibilidade da ocorrência de compostos com atividade antileucêmicas não extraídos com os dois solvente usados.

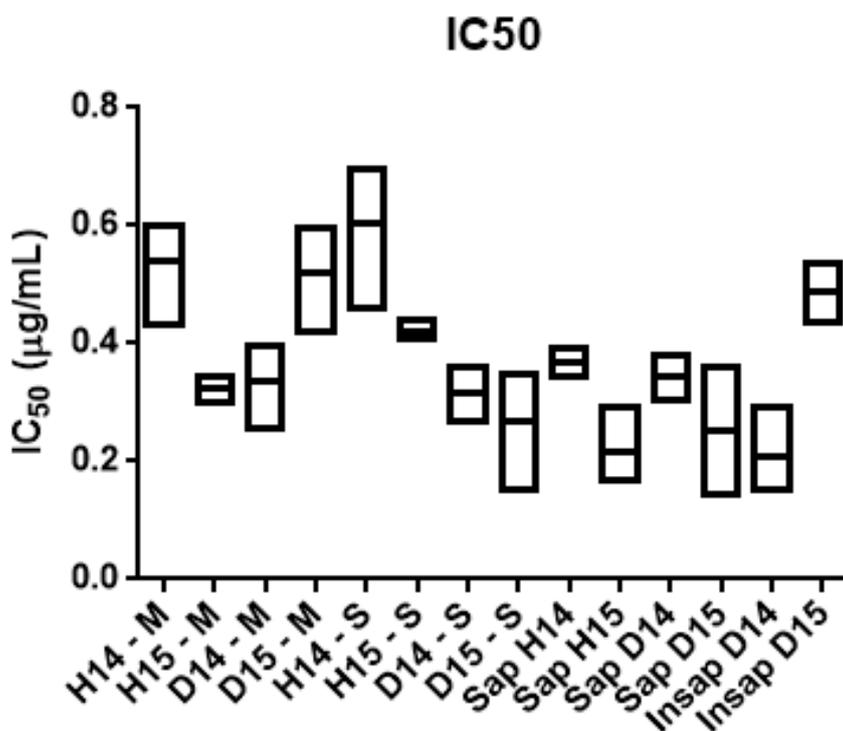
4.2 Determinação do IC₅₀

A determinação da concentração inibitória média (IC₅₀) foi determinada utilizando os extratos da própolis Âmbar nas concentrações finais de 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL na linhagem celular leucêmica Jurkat. No método de extração por maceração a temperatura ambiente os valores de IC₅₀ foram entre cerca de 0,30 a 0,5 µg/mL, sendo hexano 2014 – Maceração: 0,5102 µg/mL, hexano 2015 – Maceração: 0,3226 µg/mL, diclorometano 2014 – Maceração: 0,3185 µg/mL e diclorometano 2015 – Maceração: 0,4994 µg/mL. Já na extração pelo método de Soxhlet, os valores foram: hexano 2014 – Soxhlet: 0,5657 µg/mL, hexano 2015 – Soxhlet: 0,4223 µg/mL, diclorometano 2014 – Soxhlet: 0,3103 µg/mL e diclorometano 2015 – Soxhlet: 0,2296 µg/mL, não havendo diferença estatística significativa entre os dois métodos ($p \leq 0,05$). O IC₅₀ das extrações oriundas da reação de saponificação com hexano e diclorometano obtiveram os seguintes valores de dose: Saponificado hexano 2014: 0,3676 µg/mL, Saponificado hexano 2015: 0,2207 µg/mL, Saponificado diclorometano 2014: 0,3400 µg/mL e Saponificado diclorometano 2015: 0,2281 µg/mL. Valores estes, que estão representados na Figura 3.

Não foi determinado o IC₅₀ dos produtos do material insaponificável do hexano do ano de 2014 e de 2015 visto que as concentrações expostas não obtiveram um efeito citotóxico acima de 50% nas células Jurkat Já os valores dos extratos do material insaponificável do diclorometano foram 0,2110 µg/mL para o ano de 2014 e 0,4841 µg/mL para o ano de 2015.

No estudo de Ferreira (2017) a própolis bruta em extrato etanólico do município de São Gabriel (própolis Âmbar) dos diferentes anos comportaram-se semelhantes contra as linhagens utilizadas e que se manteve nas extrações realizadas neste trabalho, exceto no produto insaponificado do diclorometano que obteve diferença estatística significativa com maior dose IC₅₀ para as amostras de própolis Âmbar coletada no ano 2015 ($p \leq 0,05$).

Figura 3 – Valores da concentração inibitória média (IC₅₀) dos diferentes extratos de própolis Âmbar na linhagem celular Jurkat. H= hexano; D= diclorometano; Sap= Saponificado; Insap= Insaponificado; M= Maceração; S= Soxhlet; 14= 2014; 15= 2015.



A concentração inibidora média (IC₅₀) é de suma importância quando aplicada em drogas com uso farmacológico, este valor é a medida mais amplamente utilizada e informativa da eficácia de uma droga. Indicando o IC₅₀, ou seja, o quanto do medicamento é necessário para inibir o processo biológico em 50%, é possível proporcionar uma medida de potência de um medicamento antagonista em pesquisas farmacológicas (Aykul e Hackert, 2016). O IC₅₀ estava dentro de uma faixa de 0,2 a 0,5 µg/mL, indicando que todas as extrações tem uma composição semelhante, em relação aos compostos ativos, contra as células da linhagem celular leucêmica Jurkat.

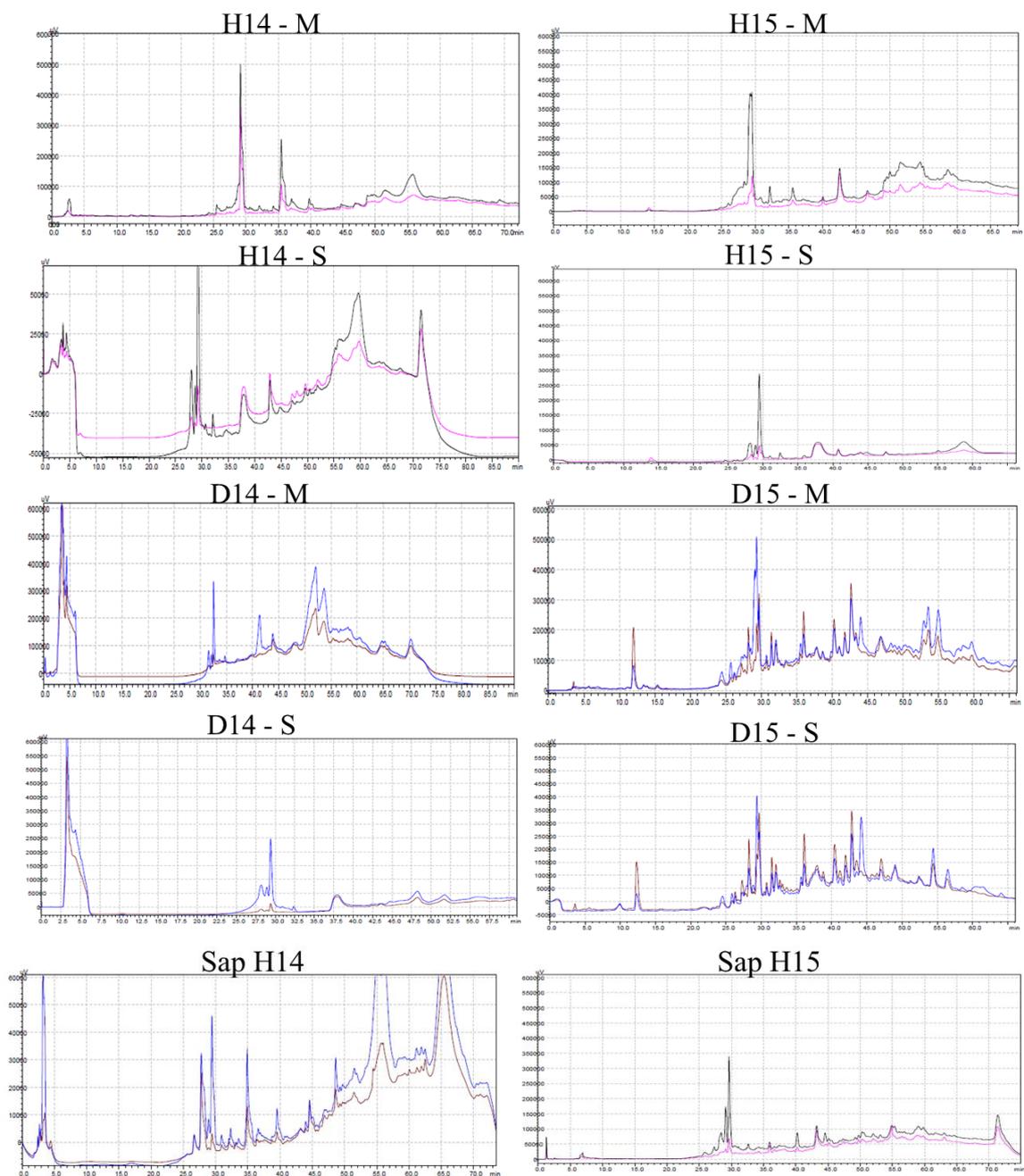
As duas própolis brasileiras mais caracterizadas são a verde e a vermelha com efeito antitumoral comprovado *in vitro* e, de acordo com Ferreira (2017), a própolis âmbar dos anos de 2014 e 2015, teve um comportamento semelhante ao da própolis vermelha e ainda maior que a própolis verde em 3 linhagens celulares leucêmicas.

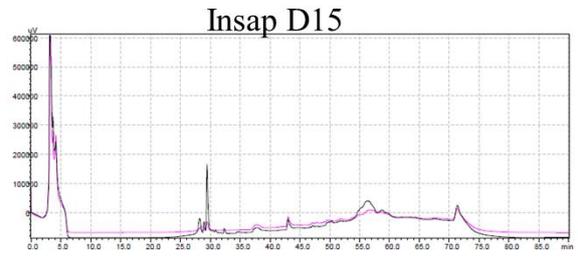
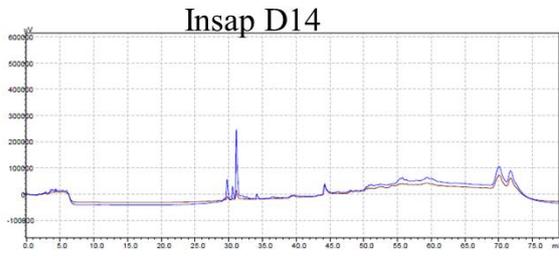
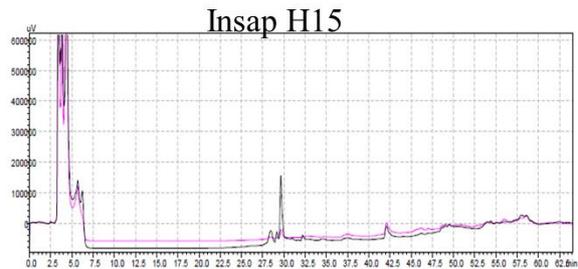
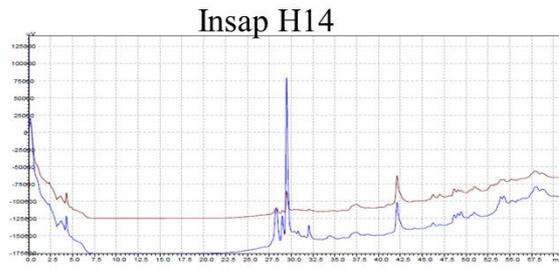
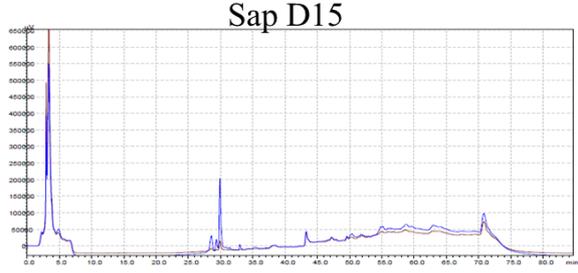
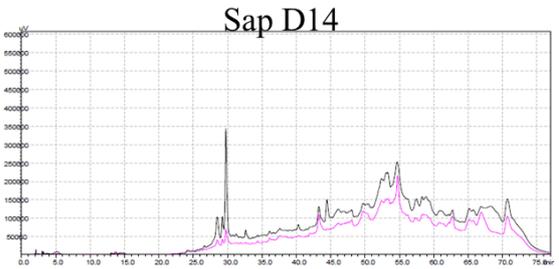
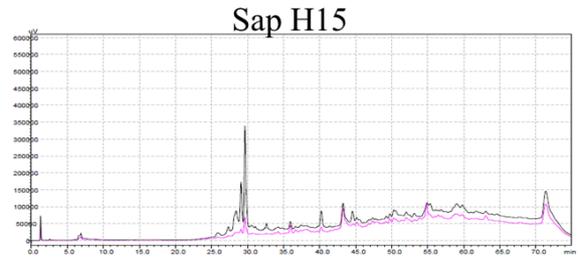
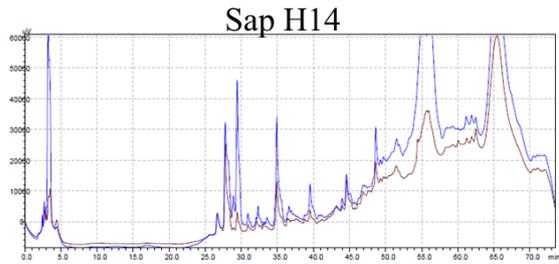
4.3 Análises do perfil cromatográfico por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Quanto a análise das extrações das própolis por HPLC, avaliando absorvância a 254 e 268 nm, foi possível observar um pico distintivo a aproximadamente 30 minutos compartilhado em todas as extrações que merece atenção e posterior caracterização como uma molécula marcadora deste tipo de própolis, independente da suas função biológica. A análise da própolis âmbar por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS) por Ferreira (2017) apresentou um pico dominante característico que também não pode ser identificado ao ser comparado com as bases de dados disponíveis (possivelmente por falta de purificação do composto). Levantando assim a hipótese de que os picos identificados por ambos métodos cromatográficos sejam equivalentes.

A própolis verde possui a Artepillin C como marcador fitoquímico para identificação da mesma, sendo um dos componentes majoritários dessa própolis. A presença de Artepillin C na própolis verde é advinda da sua origem botânica, a *Baccharis dracunculifolia* (Park *et. al.*, 2004). Assim a identificação de um possível marcador fitoquímico da própolis Âmbar estimularia seu interesse regional, agregando valor ao produto, e ajudaria na determinação da sua origem botânica, que poderia ser o Eucalipto ou alguma outra espécie relacionada a partir do estudo do perfil químico por CG-MS já realizado em trabalhos anteriores.

Figura 4 – Perfil cromatográfico representativo do HPLC dos diferentes extratos de própolis Âmbar a 254 e 268 nm. H= hexano; D= diclorometano; Sap= Saponificado; Insap= Insaponificado; M= Maceração; S= Soxhlet; 14= 2014; 15= 2015.





5. CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados indicam que os extratos de compostos apolares das própolis produzidas no município de São Gabriel/RS nos anos de 2014 e 2015 possuem ampla diversidade de moléculas com efeito citotóxico contra células da linhagem leucêmica Jurkat. Entre os métodos e solventes testados, podemos concluir que a grande maioria possui uma alta atividade antileucêmica quando tratadas com 0,2 µg/mL dos extratos, dando destaque para o método de Soxhlet pelo tempo reduzido de extração, com o solvente Diclorometano onde temos o indicio que extraiu compostos de baixa polaridade e apolares, favorecendo assim sua atividade pelo potencial de atravessar a membrana celular das células. Com os resultados preliminares do perfil químico por HPLC, perspectivas de uma possível identificação do composto majoritário da própolis, purificação e avaliação da sua atividade leucêmica aumentam. Finalmente, os resultados atuais estimulam o fracionamento e purificação dos compostos dos extratos com diclorometano para continuar os estudos das atividades biológicas da própolis Âmbar.

6. REFERÊNCIAS

- AGA, H.; SHIBUYA T.; SUGIMOTO T.; KURIMOTO M. e NAKAJIMA S. **Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis**. *Biosci Biotechnol Biochem*. vol.58, 1994, p.945–946.
- AYKUL, S. e MARTINEZ-HACKERT, E. **Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis**. *Analytical Biochemistry*, 508, 2016. p. 97–103.
- AZMIR,J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF,K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review**. *Journal of Food Engineering*. vol.117, 2013, p. 426–436.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV R.; KUJUMGIEV, A; MARCUCCI, M.C.; POPOV S. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis**. *Z Naturforsch C*. vol.50, 1995. p.167–172.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L. e MARCUCCI, M.C. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin**. *Apidologie*. 2000, p.3–15.
- BIESAGA, M. **Influence of extraction methods on stability of flavonoids**. *Journal of Chromatography A*, 2011, p. 2505–2512.
- BISCAIA D. e FERREIRA, S.R.S. **Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction**. *J. of Supercritical Fluids* 51, 2009, p. 17–23.
- BONAMIGO, T.; CAMPOS, J.F.; OLIVEIRA, A.S.; TORQUATO, H.F.V.; BALESTIERI, J.B.P. e CARDOSO, C.A.L. **Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome**. *PLOS ONE* , 2017.
- BURDOCK, G.A. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)**. *Food Chem Toxicol*. vol. 36, 1998, p. 347-363.

CABRAL, F.A.; PAVIANI, L.C.; FIORITO, G. e SACODA, P. **Different solvents for extraction of brazilian green propolis: composition and extraction yield of phenolic compounds.** III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia), 2013.

CASTALDO, S. e CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** Fitoterapia, 2002, p. S1-6.

CHAN, G.C.; CHEUNG, K.; SZE, D.M. **The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis.** Clin Rev Allerg Immunol, 2013, p. 262–273.

DÍAZ, J.C.Q.; RODRÍGUEZ, O.A.; VELÁZQUEZ, M.D.; MILIÁN, M.L. **Empleo de la tintura de propóleo al 5 % en la cura de heridas sépticas faciales.** Rev Cubana Estomatol vol.34, 1997, p. 25-27.

DOS SANTOS, C.R.; ARCENIO, F., CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A., ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.e ROCHA, L. **Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana.** Rev. Bras. Farmacogn., vol. 13, 2003, p. 74-77.

FCIÊNCIAS - Soxhlet - Laboratorio Online . Disponível em: <http://www.fcencias.com/2015/01/15/soxhlet-laboratorio-online/> . Acessada em: 25/09/2017.

FEARNLEY, J. **Bee Propolis: Natural Healing from the Hive**, Souvenir Press, London, UK, 2001.

FERREIRA, V.U. **Caracterização Química, Atividades Antioxidante, Antileucêmica E Antimicrobiana Da Própolis Âmbar Sul Brasileira.** Universidade Federal Do Pampa, Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas, 2017.

FINSTROM, M.D.S. e SPIVAK, M. **Increased Resin Collection after Parasite Challenge: A Case of Self-Medication in Honey Bees?** Plos One, vol.7, Issue 3, 2013.

FRANCHI JR., G.C.; MORAES, C.S.; TORETI, V.C.; DAUGSCH A.; NOWILL A.E. e PARK Y.K. **Comporison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on**

Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. Evidencebased Complementary and Alternative Medicine, 2012, 6p.

FUNARI C.S. e FERRO V. O. **Análise de Própolis.** Ciênc .Tecnol. Aliment. vol. 26, 2006, p. 171-178.

GHISALBERTI, E.L. ; JEFFERIES, P.R.; LANTERI, R; MATISONS, J. **Constituents of propolis.** Experientia 34, 1978, p. 157-158.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M. e KURIMOTO, M. **Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis.** J. Anticancer Research, 2001, p. 221-228.

KRÓL W. e SZLISZKA E. **Polyphenols Isolados from Propolis Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells.** Evidencebased Complementary and Alternative Medicine, 2013, p. 10.

KUMAZAWA, S; HAMASSAKA, T; NAKAYAMA, T. **Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins.** Food Chemistry, v. 84, 2004, p. 329-339.

KUROPATNICKI, A.K.; SZLISZKA, E. e KROL, W. **Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times,** 2013.

MARCUCCI, M.C. **Propolis—chemical-composition, Biological Properties and Therapeutic Activity.** Apidologie. 1995; p. 83–99.

MENEZES, H. **Própolis: Uma Revisão dos Recentes Estudos de suas Propriedades Farmacológicas.** Arquivos do Instituto de Biologia, São Paulo, v. 72, 2005, p. 405-411.

PARK, Y. K; ALENCAR, S.M; AGUIAR, C.L. **Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, 2002, p. 2502–2506.

- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P. e AGUIAR, C.L. **Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal.** *Ciência Rural* v.32, 2002, p. 997-1003.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI M; ABREU, J.A. e ALCICI, N.M. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** *Cien. Tecnol. Aliment.* v. 18, 1998, p.313.
- PARK, Y.K. ; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M. e FUJIWARA, F.Y. **Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis.** *J. Agric. Food Chem.* 52, 2004, p. 1100-1103.
- PEREIRA, A.D.S.; SEIXAS, F.R.M.S. e NETO, F.R.D.A. **Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** *Química Nova*, 2002, p. 321-326.
- RAMOS, A.F. N. e MIRANDA, J. L. **Propolis: A Review of its Anti-inflammatory and Healing Actions.** *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2007, p. 698.
- SALATINO, A.; WEINSTEIN, E.T.; NEGRI, G. e MESSAGE, D. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2.1, 2005, p. 33–38.
- SANTOS, D.A. **Avaliação da atividade biológica de frações obtidas da própolis vermelha em cultivo celular.** Universidade De Caxias Do Sul Centro De Ciências Biológicas E Da Saúde, Instituto De Biotecnologia, 2016.
- SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I.B.D.S. e MARCUCCI, M.C. **Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis.** *Chemistry Central Journal*, 5, 2011.
- SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H. e NIKLIŃSKI, J. **The anticancer activity of própolis.** *Folia Histochemica et Cytobiologica*, vol. 50, 2012, p. 25–37
- SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A. e ALENCAR, S.M. **Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis.** *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 5, 2008, p. 313-316.
- SZLISZKA, E. ; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; e KROL, W. **Ethanollic extract of Brazilian green propolis sensitizes**

prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. International Journal of Oncology. vol 38, 2011, p. 941-953.

TIWARI, B.K. e MCDONNELL, C. **Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants.** Comprehensive Analytical Chemistry, vol 76, 2017, p. 111-129.

WOISKY, R.G. ; SALATINO, A. **Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control.** J Apicult. vol. 37, 1998, p. 99-105.

ZHANG, H.F.; YANG, X.H. e WANG, Y. **Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions.** Trends in Food Science and Technology. vol 22, 2011, p. 672–688.