

VIVIANE ULBRICH FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTILEUCÊMICO DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE
4 MUNICÍPIOS DO RIO GRANDE DO SUL**

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: Andrés Delgado Cañedo

**São Gabriel
2014**

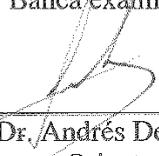
VIVIANE ULBRICH FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTILEUCÊMICO DE AMOSTRAS DE
PRÓPOLIS DE 4 MUNICÍPIOS DO RIO GRANDE DO SUL**

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.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 22 de Agosto de 2014.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
Orientador
Unipampa



Prof. Dr. Helmoz Rosenzaim Appelt
Unipampa



Me. Ana Paula Zemolin
Unipampa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Andrés Cañedo Delgado, pela orientação, apoio, confiança, paciência de explicar 50 mil vezes a mesma coisa e por nunca desistir de fazer com que eu aprenda.

A todos os professores, pela dedicação em me fazer aprender, por estar sempre a disposição para tirar duvidas e por não me tirarem da aula nas vezes em que dormir.

Aos técnicos, pelo alcóol, papel pardo, hipoclorito e por sempre estarem a disposição para resolver os meus problemas da melhor maneira possível.

A minha família, pelo amor, incentivo, pelo colo nos dias de desespero, por entender minha ausência e pelos pila de cada mês. Amo-os para mais de metro!

Aos colegas de laboratório, pelos conhecimentos trocados, solidariedades nos momentos de aperto e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos, pela força, carinho e pelas inúmeras tardes de mate e muita risada. Vou leva-los sempre comigo do lado esquerdo do peito.

Ao Adriano Alves de Paula, pelo carinho, companheirismo e paciência, muita, mas muita paciência mesmo.

E a todos que de alguma maneira fizeram parte da minha trajetória até aqui, muuuito obrigada!

RESUMO

Própolis, “cola de abelha” e/ou “cera negra”, é uma substância resinosa semelhante à cera natural, encontrada em colmeias. Esta substância é utilizada pelas abelhas para selar fissuras ou espaços abertos, atua como um antisséptico e evita a infecção microbiana das larvas, mantém a umidade e controla a temperatura interna da colmeia. A composição da própolis bruta é dividida basicamente em 50% de resina de vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra. Este composto natural tem sido utilizado para vários fins terapêuticos em humanos e animais, devido a suas propriedades farmacológicas. Inúmeros artigos científicos tem demonstrado que a própolis apresenta atividades bactericidas, bacteriostáticas, antifúngicas, analgésicas, cicatrizantes, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais. A composição química da própolis pode ser altamente variável dependendo da localização geográfica, época de colheita, técnica empregada e genética da abelha. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito antitumoral de diferentes amostras de própolis do Rio Grande do Sul, usando como modelo a linhagem celular K562. Células tratadas com diferentes concentrações de extrato de própolis foram avaliadas quanto à viabilidade e ciclo celular por citometria de fluxo em 24h, 48h e 72h. Os resultados mostraram que as própolis analisadas na concentração de 100µg/ml diminuiu a viabilidade a partir das 24 horas de tratamento e com 48h de tratamento todas as amostras mostraram algum tipo de alteração no ciclo celular. Além disso, quando comparados os resultados de viabilidade celular da própolis gaúcha com dados de outro estudo feitos com própolis vermelha, na mesma concentração, a própolis do Rio Grande do Sul demonstra ter efeito antineoplásico superior, causando maior morte celular e em menor tempo de tratamento. Esses resultados preliminares mostram que as própolis de Novo Hamburgo, São Gabriel, Taquara e Vacaria poderiam ser uma opção na busca de novas drogas para o tratamento de leucemia, sendo que mais análises em diferentes linhagens celulares neoplásicas e com própolis de outros municípios do Estado do Rio Grande do Sul estão sendo realizadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Palavras-chave: Extratos de própolis, K562, viabilidade celular e ciclo celular.

ABSTRACT

Propolis, "bee glue" and / or "black wax", is similar to natural wax resinous substance found in beehives. This substance is used by bees to seal cracks or open spaces, serves as an antiseptic and prevents microbial infection of larvae, holds moisture and controls the internal temperature of the hive. The composition of the crude propolis is basically divided into 50% from vegetable resin, 30% beeswax, 10% essential oils, 5% pollen, 5% scrap wood and soil. This natural compound has been used for various therapeutic purposes in humans and animals due to their pharmacological properties. Numerous scientific papers have demonstrated that propolis has bactericidal, bacteriostatic, antifungal, analgesic, healing, anti-inflammatory, antioxidant and antitumor activities. The chemical composition of propolis can be highly variable depending on geographic location, time of harvest technique and genetic Bee. The aim of the study was to evaluate the antitumor effect of different propolis samples of Rio Grande do Sul, using as a model cell line K562. Treated with different concentrations of propolis extract cells were evaluated for viability and cell cycle by flow cytometry at 24h, 48h and 72h. The results showed that the concentration of propolis analyzed 100 μ g / ml decreased from 24 hours of treatment and 48 hours of treatment all samples showed viability of some kind of change in the cell cycle. Furthermore, when comparing the results of cell viability of the state propolis with data from another study made with propolis, at the same concentration, propolis Rio Grande do Sul demonstrates greater antineoplastic effect, causing increased cell death and shorter treatment time. These preliminary results show that propolis from Novo Hamburgo, São Gabriel, Taquara and Vacaria could be an option in the search for new drugs for the treatment of leukemia, with more analysis in different neoplastic cell lines with propolis and other municipalities of the State of Rio Grande do Sul are being conducted by our research group.

Keywords: Propolis extracts, K562, cell viability and cell cycle.

"Não basta saber, é preferível saber aplicar. Não é o bastante querer, é preciso saber querer."

Johann Wolfgang von Goethe

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produtividade científica sobre a própolis entre as décadas de 80 e 90	2
Figura 2 – Patentes depositadas entre os anos de 1965 e 1999 sobre a própolis	2
Figura 3 – Própolis <i>in natura</i>	11
Figura 4 – Efeito do extrato bruto da própolis na viabilidade de células K562	14
Figura 5 – Efeito das frações da própolis na viabilidade de células K562	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das própolis brasileiras	4
Tabela 2 – Comportamento das própolis no ciclo celular de k562	16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 História da Própolis	1
1.3 Própolis	2
1.4 Própolis e o câncer	6
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODO	11
3.1 Própolis	11
3.2 Preparação dos Extratos de Própolis	11
3.3 Cultura de células e tratamento	12
3.4 Análise da viabilidade celular	12
3.5 Análise do ciclo celular	12
3.6 Análise Estatística	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Efeito do extrato bruto da própolis na viabilidade de células K562.....	14
4.2 Efeito do extrato bruto da própolis no ciclo celular de células K562.....	15
4.3 Efeito das frações da própolis na viabilidade de células K562	16
4.4 Efeito das frações da própolis no ciclo celular de células K562	17
5. CONCLUSÃO	18

1 INTRODUÇÃO

1.1 História da Própolis

A própolis é tão antiga quanto o mel, e tem sido utilizada pelo homem há séculos. Há registros que sugerem o uso do mesmo pelos antigos egípcios, persas e romanos (Chan *et al.*, 2013). Os egípcios teriam aprendido com as abelhas a usar a própolis como substância de “embalsamamento”. As abelhas utilizam própolis e cera para cobrir animais, que foram mortos dentro das colméias e não conseguem transportar para fora da mesma (Salatino *et al.*, 2005; Menezes, 2005; Bankova *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002).

Hipócrates dizia ter usado a própolis para cura de feridas e úlceras, tanto externas como internas. Os romanos reverenciavam as abelhas e principalmente a própolis. Plínio, O Velho, na sua famosa História escreveu que: *“O própolis é produzido a partir da goma doce da videira ou o álamo, e é de uma consistência mais densa, os sucos de flores que estão sendo adicionados a ele. Ainda assim, no entanto, pode não ser corretamente chamado de cera, mas sim o fundamento dos favos; por meio dele todas as entradas estão guarnecidas, o que poderia, de outra forma, servir para a não admissão de influências prejudiciais; ele também tem um odor forte, tanto que, de fato, muitas pessoas usam-no em vez do gálibano.”* (Dealey, 2005)

Na Idade Média a própolis perdeu sua popularidade e seu uso na medicina tradicional logo desapareceu. Algumas fontes do século XII descrevem preparações medicinais contendo cola de abelha, que foram utilizadas no tratamento de infecções de boca e faringe, como cárie dentária (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

O interesse pela própolis retornou no início do século 19, onde foi estudada e descrita por Nicolas Louis Vauquelin, um farmacêutico e químico francês. No Brasil 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).

Na Figura 1 obtida de (Pereira *et al.* 2002) mostra o crescimento de publicações sobre a própolis nas décadas de 80 e 90.

As pesquisas dos dias atuais tem uma preocupação maior em estudar a composição química, origem botânica, bem como as propriedades medicinais da própolis.

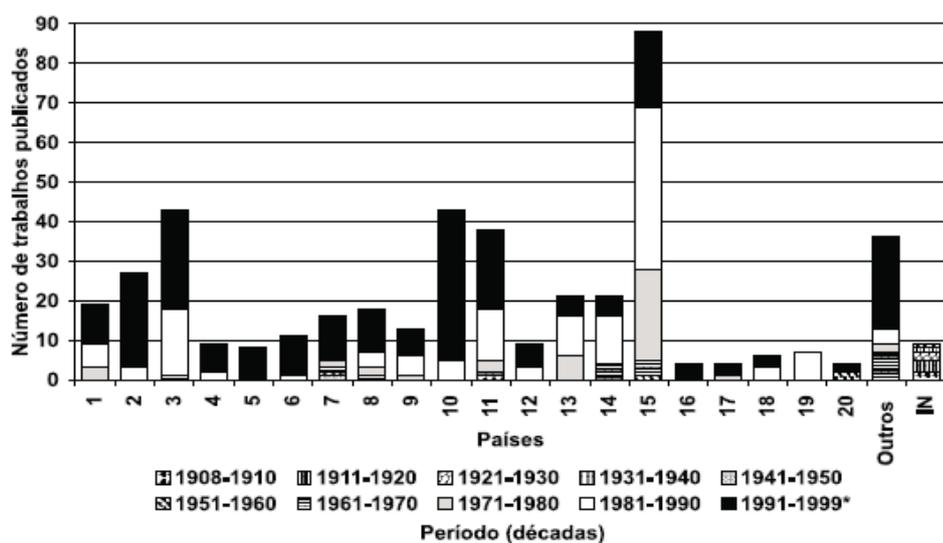


Figura 1: Produtividade científica sobre a própolis entre as décadas de 80 e 90. (1) Alemanha; (2) Brasil; (3) Bulgária; (4) China; (5) Cuba; (6) Espanha; (7) Estados Unidos; (8) França; (9) Itália; (10) Japão; (11) Polônia; (12) Reino Unido; (13) Republica Checa; (14) Romênia; (15) Rússia; (16) Egito; (17) Holanda; (18) Iugoslávia; (19) Hungria; (20) Ucrânia e (IN) Artigo cujo país de origem não foi determinado (Pereira *et al.*, 2002).

Na Figura 2 mostra o número de patentes depositadas sobre a própolis, e o número de patentes brasileiras depositadas é mínimo quando comparado as patentes depositadas pelo Japão, que inclusive possui patente sobre a publicação de compostos isolados inicialmente de amostras de própolis brasileira. No Brasil o número de patentes é pequeno devido a falta de hábito e interesse das universidades brasileiras em proteger suas pesquisas por meio de patentar (Pereira *et al.*, 2002).

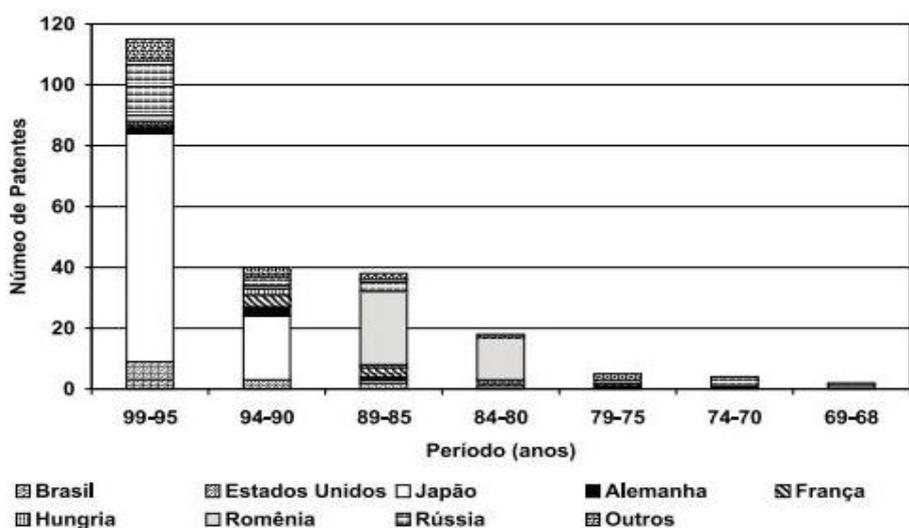


Figura 2: Patentes depositadas entre os anos de 1965 e 1999 sobre a própolis (Pereira *et al.*, 2002).

1.2 Própolis

Própolis, “cola de abelha” e/ou “cera negra”, é uma substância resinosa semelhante à cera natural, encontrada em colmeias. A composição da própolis bruta é dividida basicamente em 50% de resina de vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (Menezes, 2005; Ghisalberti *et al*, 1978).

A própolis pode exercer atividades antibacterianas, anti-septicas e anestésicas (Chan *et al.*, 2013). Alguns estudos também evidenciam a ação da própolis como anti-herpes (HSV tipo 2) (Vynograd *et al.*, 2000), imunomodulador (Sforcin, 2007; Chan *et al.*, 2013), antifúngica (Ota *et al.*, 2001; Dota *et al.*, 2010), atividade antioxidante (Kumazowa *et al.*, 2004; Frozza *et al.*, 2013), anti-inflamatório (Ramos e Miranda, 2007; Mirzoeva e Calder, 1996) e, recentemente, trabalhos científicos tem demonstrado que a própolis apresenta atividade antitumoral, tendo o potencial de inibir o crescimento celular, induzir a apoptose e interferir no ciclo celular *in vitro* (Sforcin, 2007; Franchi Jr *et al.*, 2012; Frozza *et al.*, 2013; Xuan *et al.*, 2014; Król and Szliszka, 2013) entre outros.

As propriedades da própolis brasileira estão diretamente relacionadas à sua composição química, e este é o maior problema para o uso da própolis na “fitoterapia ou Apiterapia”, sendo que sua composição química pode ser altamente variável dependendo da localização geográfica, época de colheita, técnica empregada e genética da abelha (Pereira *et al.*, 2002; Kumazowa *et al.*, 2004; Park *et al.* 2002; Bankova *et al.*, 2000). A própolis brasileira, que é produzida num clima tropical, é significativamente diferente da própolis encontradas na zona temperada, por causa das diferenças nas fontes vegetais (Bankova *et al.*, 2000). Além disso, a própolis pode variar sua composição química sazonalmente numa mesma localidade. Por exemplo, a própolis de diferentes regiões do Brasil apresenta variação significativa em suas composições químicas (Park *et al.* 2002; Bankova *et al.*, 2000).

Park *et al.*, (2002) classificou a própolis brasileira em doze tipos diferentes com base em suas características físico-químicas, representadas na Tabela 1. No mesmo trabalho, também foi testada a atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* e *streptococcus mutans*, antioxidante e ação anti-inflamatória dos extratos etanólicos da própolis brasileira, nos quais os grupos 1 e 2, que correspondem ao Estado do Rio Grande do Sul, apresentaram resultado negativo ou fraca inibição quanto à sua ação antimicrobiana, apresentaram excelente atividade antioxidante, acima de 80% e baixa ação anti-inflamatória, determinada pela inibição da enzima hialuronidase.

Tabela 1: Classificação das própolis brasileiras

Extrato Etanólico de própolis			
Grupos	Cor	Subst. Solúveis (%)	Origem da Própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho Claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho Escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho Claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom Esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom Avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom Esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho Escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo Escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom Esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: Park *et al.*, 2002

Recentemente, foi encontrada uma própolis de cor vermelha em colmeias localizadas no litoral do nordeste brasileiro. Por tanto, a própolis vermelha foi classificada como própolis do grupo 13 (Franchi Jr *et al.*, 2012).

A atividade biológica atribuída à própolis provem de substâncias derivadas das plantas. Embora a própolis seja um produto animal, uma porção considerável de seus componentes, principalmente aqueles sobre os quais possuem atividade biológica, são derivados de plantas (Salatino *et al.*, 2005). As plantas possuem um grupo de compostos vegetais, conhecidos como metabólitos secundários, que defendem os vegetais contra herbívoros e microrganismos patogênicos, sendo terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados as três principais classes de metabólitos secundários (Tai & Zeiger, 2004).

Marcucci (1995) e Bankova *et al.* (2000) descreveram mais de 300 compostos químicos isolados da própolis, sendo os principais grupos: ácidos, ésteres aromáticos,

açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróis, cetonas, chalconas, flavonoides (flavonas, flavonóides e flavononas), terpenóides entre outros. Sendo o grupo dos flavonoides o mais estudado. Recentemente, novos compostos foram isolados a partir de própolis, como ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) a partir de própolis verde brasileira, e tem se mostrado um dos principais componentes imunomoduladores (Cheung *et al.*, 2011). O éster fenílico do ácido caféico (CAPE), composto ativo em própolis, acredita-se ser o principal responsável pelas atividades terapêuticas antitumorais da própolis (Sawicka *et al.*, 2012).

Os flavonóides são um grupo diverso de fitoquímicos que são produzidos por diversas plantas em quantidades elevadas (Kuropatnicki *et al.*, 2013; Tais & Zeiger, 2004). Possuem atividade antioxidante potente eliminando radicais livres, que podem interferir amplamente com o metabolismo da célula normal. Eles protegem os lipídeos e outros compostos, tais como a vitamina C de ser oxidado ou destruído (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Os pesquisadores têm se interessado em investigar a ação de compostos isolados da própolis, no entanto, sua composição química altamente variável nas diversas amostras torna a análise uma tarefa complexa onde há mais exceções do que regras. No caso do Brasil essa variação das propriedades biológicas e composição química são facilmente explicadas pela grande biodiversidade brasileira (Pereira *et al.*, 2002; Kuropatnicki *et al.*, 2013) tornando a própolis brasileira em matéria prima de altíssimo valor na bioprospecção.

Utilizada na proteção da colmeia seu nome em grego é uma junção dos termos *pro* “defesa de” e *polis* “cidade”. Portanto, a própolis está envolvida diretamente na defesa da comunidade das abelhas (Salatino *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2013). Esta substância é utilizada pelas abelhas para selar fissuras ou espaços abertos, atua como um antisséptico e evita a infecção microbiana das larvas, mantém a umidade e controla a temperatura interna da colmeia (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Além das vantagens para a saúde humana, a própolis também é muito importante para a sanidade apícola, mantendo a colmeia saudável, reduzindo consideravelmente o crescimento de microrganismos. Nicodemo *et al.*, (2013) demonstraram que colônias descendentes de cruzamentos entre abelhas produtoras de própolis foram significativamente mais higiênicas do que cruzamentos entre colônias produtoras de pouco própolis. A reserva de mel e pólen também foi significativamente mais abundante nas colônias de alta produção de própolis. Assim, o melhoramento das abelhas baseado na produção de própolis pode ser de grande importância para o melhoramento na produtividade de outros produtos da colmeia.

A pesquisa aqui apresentada fornece evidências de que o uso de resinas por abelhas pode ser um exemplo de um mecanismo de auto-medicação 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 usado dentro da colméia pelas abelhas adultas expostas a esporos de fungos (Finstrom & Spivak, 2013).

No ultimo Censo Agropecuário realizado pelo IBGE, no ano de 2006, não apresenta dados unitário da produção de própolis, mas em Junho de 2014 o SEBRAE apresentou um boletim apenas do mercado da própolis (SEBRAE, 2014), uma vez que a crescente produção de artigos científicos relacionados à aplicação e composição química da própolis brasileira ocasionou um aumento na produção da própolis, sendo hoje o Brasil o terceiro maior produtor mundial, chegando a 150 toneladas anuais (Brighenti *et al.*, 2014).

O Japão é o principal importador de própolis, com uma preferência manifestada pela própolis do Brasil (Salatino *et al.*, 2005; Kuropatnicki *et al.*, 2013; SEBRAE, 2014). Apesar de o Brasil ser responsável por apenas 15% de toda a produção mundial de própolis, 90 % do que é produzido no Brasil é exportado para Japão, Estados Unidos, Alemanha e China (Brighenti *et al.*, 2014). O comércio Brasil/Japão movimenta cerca de 300 milhões por ano (Brighenti *et al.*, 2014 *apud* Toledo, 2007). Outro aspecto de grande importância nesta área tem sido a estabilização dos preços do produto no mercado, custando 500 reais o Kg, e de acordo com dados da Japan Trade Organization o extrato alcoólico da substância é vendido no Japão a US\$ 110 o frasco (SEBRAE, 2014).

O valor do produto hoje está agregado a sua tipificação, identificação de origem geográfica e botânica. Ausência de contaminantes químicos e biológicos tem sido alguns itens fundamentais na valorização e melhor comercialização do produto. Apesar disso, o mercado ainda valoriza o aspecto visual da própolis, supervalorizando alguns tipos como a própolis verde e a vermelha, o boletim do SEBRAE de 2014 fala apenas do mercado desses dois tipo de própolis. Existem regiões que não produzem própolis verde nem vermelha, sendo discriminados no mercado, desmotivando sua produção.

1.3 Própolis e o câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum a desordens no ciclo celular, ocorrendo excesso nas taxas de proliferação e deficiência nas taxas

de morte celular. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, que podem espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Embora de origens e causas ainda não estão muito esclarecidas, as neoplasias surgem devido a mutações genéticas, espontâneas ou induzidas por agentes carcinogênicos (INCA, 2012).

As células neoplásicas adquirem algumas vantagens metabólicas e capacidades biológicas se tornando independentes de sinais proliferativos, como: perda do controle da proliferação e da divisão celular, capacidade de invadir tecidos e formar metástase, capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogêneses) e resistência à morte programada (apoptose) (INCA, 2012; Weinberg, 2008).

A leucemia é a malignidade de qualquer variedade de células hematopoéticas, incluindo células destinadas a formar eritrócitos (células vermelhas do sangue), células secretoras de anticorpos (plasma) assim como células de linfócito T e B, essas linhagens de células hematopoéticas malignas circulam livremente pela circulação e não possuem pigmentação, e são geralmente, de origem desconhecida. Tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. A medula óssea produz as células que dão origem á células sanguínea, que são os glóbulos brancos, os glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e as plaquetas.

A estimativa de 2014, segundo INCA, é de 11.370 novos casos de leucemia, sendo 5.050 homens e 4.320 mulheres. Os últimos dados de mortes são de 2011, que foi de 6.187, sendo 3.277 homens e 2.910 mulheres (SIM – sistema de Informação sobre Morte). Existem quatro tipos mais comuns de leucemia: leucemia linfóide crônica (CLL), que afeta células linfoblásticas e se desenvolvem lentamente; leucemia mieloide crônica (CML), afeta células mieloblásticas e se desenvolvem lentamente, é extremamente diferenciadas das células mieloides (medula), sugerindo a diferenciação de células-tronco mieloide em diversos tipos celulares distintos; leucemia linfóide aguda (ALL), surgem tanto em células B (80%) como em linhagens de células T (20%) de linfócitos e agrava-se rapidamente; leucemia mieloide aguda (AML), essas células possuem um núcleo grande com uma pequena camada ao seu redor de citoplasma é uma doença que avança rapidamente (INCA, 2012; Weinberg, 2008).

O câncer é um problema de saúde pública mundial, o número de casos em todo o mundo deve duplicar nos próximos 20 anos, expectativa apontada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O INCA estima que o número de novos casos pule de 14 milhões em 2012 para 22 milhões em 2030. De acordo com a Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil,

publicada em 27 de novembro de 2013. Os cânceres que mais causam morte são pulmão, estômago e fígado.

Segundo dados do IBGE, o câncer é a segunda maior causa de mortes no Brasil, sendo responsável por 15,6% dos óbitos, perdendo apenas para doenças cardiovasculares (infartos e hipertensão).

A própolis é um produto natural que tem sido utilizada na medicina popular desde tempos antigos, recentemente, tornou-se um assunto de especial interesse na área de pesquisa oncológica, como uma fonte de compostos polifenólicos valiosos para a prevenção e tratamento do câncer. A própolis não pode ser usada diretamente como matéria-prima e deve ser purificada por extração para remover o material inerte e preservar a fração polifenólica (Król and Szliszk, 2013).

Os polifenóis contidos na própolis possuem efeitos imunomoduladores, quimiopreventivos e antitumorais. Eles exercem o seu efeito quimiopreventivo por múltiplos mecanismos moleculares em células cancerosas, vias de apoptose e de sinalização são alguns. Tanto os extrato etanólico (EEP) quanto os polifenóis isolados de própolis mostram sensibilizar células de câncer por apoptose induzida por TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF) (Król and Szliszk, 2013).

Franchi Jr. *et al.*, (2012) mostraram por teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) que a própolis vermelha e a verde tem compostos químicos capaz de inibir o crescimento de diferentes células de linhagem leucêmica.

Os efeitos citotóxicos da própolis vermelha (extrato hidroalcoólico) em linhagens celulares de câncer de Hep-2 e HeLa e em células de linhagem não tumoral (HEK-283), foram mostrados por (Frezza *et al.*, 2013), onde extrato de própolis foi capaz de inibir a proliferação das linhagens de células de câncer de forma significativa quando comparado a células de linhagem não tumoral. Mostrando que o extrato de própolis é capaz de inibir a proliferação de células de linhagens de câncer de forma mais eficiente de que em células de linhagem não tumoral investigadas.

O efeito inibidor contra o crescimento de células de câncer por diferentes amostras de própolis pode estar relacionado com um efeito geral de compostos químicos presentes em cada extrato, na região e ano em que as amostras foram recolhidas. Os resultados *in vitro* confirmaram os efeitos citotóxicos da própolis em diferentes linhagens de células de câncer, indicando uma atividade antitumoral, tendo como principal efeito inibir a proliferação do crescimento celular (Sawicka *et al.*, 2012). Embora muitos estudos tem mostrado efeitos

inibitórios da própolis e seus compostos no crescimento e proliferação de células de câncer, novas pesquisas são necessárias para entender a eficiência e os mecanismos de seus efeitos benéficos (Sawicka *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar o efeito antitumoral de diferentes amostras de própolis do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do extrato bruto de amostras de própolis da Região do Rio Grande do Sul na viabilidade Celular;
- Estudar o efeito do extrato bruto de amostras de própolis da região do Rio Grande do sul no ciclo celular;
- Obtenção de extratos para o estudo do principio ativo da própolis do Rio Grande do Sul.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Própolis

As amostras de própolis foram produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera* nas cidades de São Gabriel (30° 20' 11" S e 54° 19' 12" L, Taquara (29° 39' 02" S e 50° 46' 50" L), Vacaria (28° 30' 44" S e 50° 56' 02" L), fornecidas gentilmente pelo Laboratório Jobim. Também foi testado Extrato etanólico (EEP) da cidade de Novo Hamburgo (29° 40' 42" S e 51° 07' 50" L).



São Gabriel-RS

Taquara-RS

Vacaria-RS

Figura 3. Própolis *in natura*

3.2 Preparação dos Extratos de Própolis

Extrato em DMSO

Todos os extratos testados foram preparados na concentração de 10%. Como solvente para diluir as amostras foi utilizado dimetil sulfóxido 99,9% (DMSO), com agitação periódica, por 72 horas, mantidas a temperatura ambiente. Depois de 72 horas os extratos foram centrifugados a 4000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e filtrado. O extrato etanólico da cidade de Novo Hamburgo foi colocado no concentrador a vácuo (Eppendorf) por 45 minutos para evaporação do álcool. O álcool evaporado foi substituído pelo mesmo volume de DMSO.

Extratos em Hexano, Diclorometano, Acetato de etila, Metanol

Além da obtenção de extratos brutos, utilizando amostra de própolis do município de Taquara, também tentamos otimizar a extratificação deste visando a uma semi-purificação dos compostos orgânicos através de suas polaridades. O esquema para obtenção dos extratos diretamente da própolis descrito por Cechinel e Yunes (Cechinel VF; Yunes RA, 1998) foi usado para preparar os extratos semi-puros, com ligeiras modificações. Os extratos foram obtidos dissolvendo-se, aproximadamente 1g de própolis em 20ml dos solventes *Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Metanol* (nesta ordem) durante 24h, com agitação periódica

e filtração em papel filtro, a seguir o solvente foi removido em rotaevaporador marca Heidolph modelo 2 Hei-Vap Precision. Posteriormente os extratos foram dissolvidos em DMSO em concentrações equivalente aquelas da solução bruta a 10% e 50%.

3.3 Cultura de células e tratamento

Células de linhagem leucêmica K562, derivada de leucemia mieloide crônica humana (CML), adquiridas a partir da American Type Culture Collection (ATCC), foram utilizadas como modelo de estudo, mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco, USA); suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Brasil) e antibiótico a 37 °C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂.

Para tratamento com os extratos, as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade inicial de 10⁵ células/ml. Após 24 horas foi adicionado 1µl dos extratos brutos nas quantidades de 100µg, 10µg, 1µg, 0,1µg e 1µl dos extratos semi-puros nas concentrações de 10% e 50% equivalente aquelas da solução bruta.

Células não tratadas e tratadas com 1µl de DMSO foram usadas como controle negativo.

3.4 Análise da viabilidade celular

Para determinar os efeitos dos extratos de própolis sobre o crescimento e morte celular, as células foram tratadas com as concentrações: 100µg, 10µg, 1µg, 0,1µg e 1µl dos extratos semi-puros nas concentrações de 10% e 50% equivalente aquelas da solução bruta.

Para identificação das células mortas foi utilizado o corante Iodeto de propídeo (PI) (Sigma, USA) na concentração final de 1,25µg/ml tanto nas amostras tratadas quanto nas não tratadas, Após um minuto de incubação as células foram analisadas em citômetro de fluxo modelo C6 marca Accuri nos tempos 24, 48 e 72Hs. 10000 eventos foram coletados de todas as amostras.

3.5 Análise do ciclo celular

O conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi analisado para os tratamento com extrato de própolis, usando as concentrações previamente relatadas, e controles após 24, 48 e 72Hs. Para tal, 400µl de uma solução contendo 0,001% PI, 0,05M Trizma base (Ludwig-biotecnologia), 0,05M NaCl, 0,001M EDTA (Nuclear) e 0,5% NP-40 (Sigma) foram adicionados aos 200µl da suspensão celular utilizadas para analisar a

viabilidade celular. Em seguida 5000 eventos foram coletados por citometria de fluxo e utilizando o software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA) e os dados foram analisados por software FlowJo 8.8.7 (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

3.6 Análise Estatística

Os dados foram comparados por ANOVA seguida pelo testes t ($p < 0,05$), apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do extrato bruto da própolis na viabilidade de células K562

Para avaliar o efeito dos extratos brutos da própolis de 4 municípios diferentes do Estado do Rio Grande do Sul (Novo Hamburgo, Taquara, Vacaria e São Gabriel) amostras de própolis foram diluídas em DMSO numa concentração final de 10% p/v. As células foram tratadas com quantidades que variaram entre 0,1 μg e 100 μg e avaliadas nos tempos 24, 48 e 72Hs. A análise estatística mostrou que as amostras dos 4 municípios foram capazes de diminuir a viabilidade celular a partir das 24Hs de tratamento quando usadas na concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ destacando-se as amostras de Vacaria e São Gabriel que matou quase a totalidade das células em 48Hs. Nas concentrações de 0,1 a 10 μg , não foi detectada alterações na viabilidade das células, demonstrando que o efeito final é dependente da dose (Figura 4).

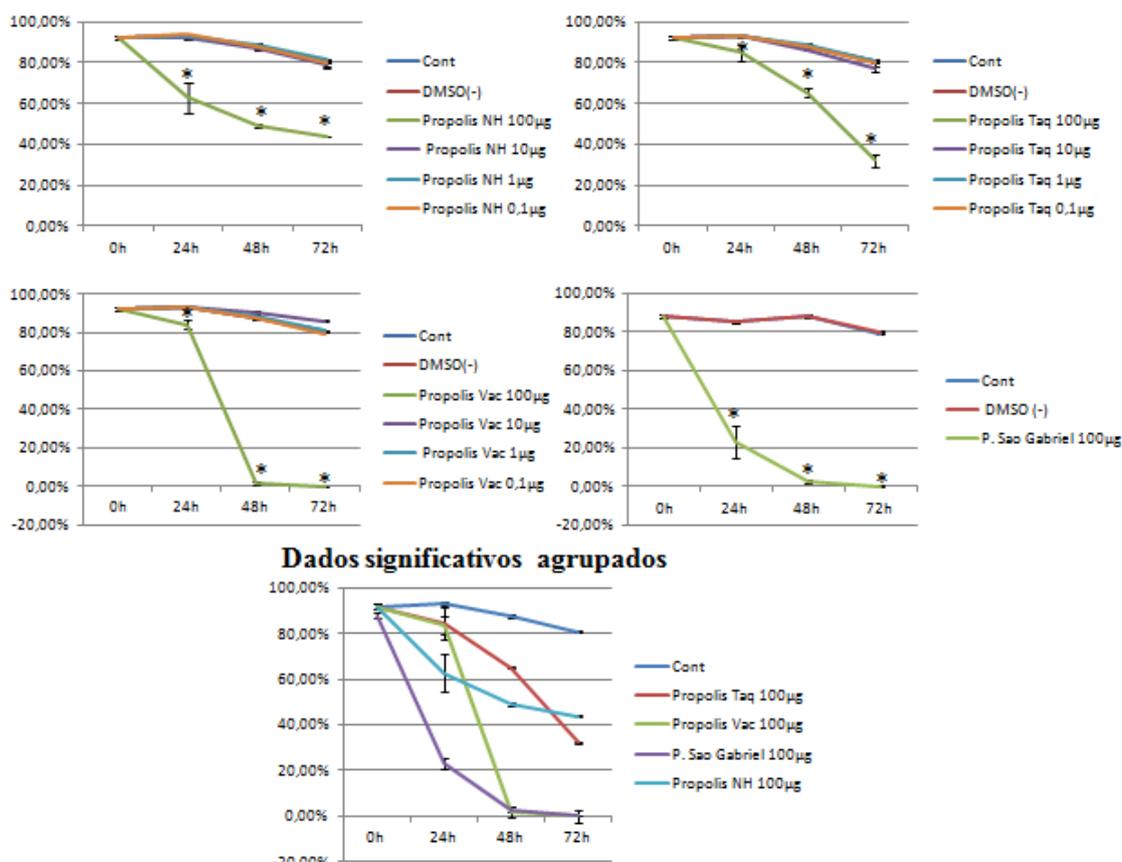


Figura 4. Efeito do extrato bruto de própolis na viabilidade de células K562. Amostras de 4 municípios foram testadas em diferentes concentrações e nos tempos 24, 48 e 72Hs. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$ (*).

Quando comparados com os dados da literatura nossos dados demonstram que a própolis gaúcha testada apresenta efeitos comparáveis às melhores própolis vermelhas testadas na literatura (Franchi Jr. 2012; Frozza *et al.*, 2013). Neste ponto São Gabriel e Vacaria apresentaram melhores resultados que a própolis vermelha enquanto que Novo Hamburgo e Taquara apresentaram dados inferiores.

4.2 Efeito do extrato bruto da própolis no ciclo celular de células K562

Para analisar o efeito dos extratos brutos no ciclo celular das k562 as células tratadas foram analisadas por citometria de fluxo quanto ao seu conteúdo de DNA. O ciclo celular regula a transição da quiescência (G0), para a proliferação. As fases associadas com a síntese de DNA (fase S) e mitose (M) são separadas por intervalos G1(*Gap 1*) e G2 (*Gap 2*)/M. Células normais assim que completam o ciclo celular recebem sinais para seguir crescendo e dividindo ou para entrar em estado não proliferativo (fase G0), no entanto as células cancerosas tem sua sinalização do controle celular normal rompido (Weinberg, 2008), ou seja, não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna a fase G0), assim passa da fase M para nova fase G1 (Almeida *et al.*, 2005).

Como visto na Tabela 2 as própolis de Taquara e Vacaria induziram um bloqueio no ciclo celular na transição da fase G2 para M já em 24Hs, resultando na inibição da proliferação, ambas na concentração máxima utilizada. Com 48Hs de tratamento todas as amostras mostraram algum tipo de alteração significativa no ciclo celular, entretanto não existe um padrão da própolis e sim de cada amostra. Isso pode ser devido suas diferenças na composição química presentes em cada extrato, que pode estar relacionado à região e ano em que as amostras foram recolhidas (Sawicka *et al.*, 2012).

Tabela 2. Comportamento das própolis no ciclo celular de k562.

Tempo	Amostra	Concentração	G1	S	G2/M
24h	Taquara	100ug/ml	=	=	↑
24h	Vacaria	100ug/ml	=	↑	=
48h	Novo Hamburgo	100ug/ml	=	↓	=
48h	Taquara	100ug/ml	↑	=	=
48h	Vacaria	100ug/ml	↓	=	↑
48h	Vacaria	10ug/ml	↓	=	=
48h	São Gabriel	100ug/ml	=	↓	=

Somente estão apresentados os dados que apresentaram valores significativos ($p < 0,05$). ↑ aumento no número de células; ↓ diminuição no número de células; = sem variação quando comparadas ao controle.

4.3 Efeito das frações da própolis na viabilidade de células K562

Além da avaliação do efeito dos extratos brutos, também avaliamos os efeitos das frações de própolis do município de Taquara, tentamos aperfeiçoar a extratificação deste visando à divisão dos compostos orgânicos nas diferentes soluções. Os extratos foram obtidos dissolvendo-se, aproximadamente 1g de própolis em 20ml dos solventes Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Metanol (nesta ordem) durante 24Hs, com agitação periódica e filtração em papel filtro, a seguir o solvente foi removido em rotaevaporador. Posteriormente os extratos foram dissolvidos em DMSO em concentrações equivalente aquelas da solução bruta a 10% e 50% p/v. As células foram tratadas com as concentrações de 10% e 50% (equivalentes a solução do bruto) e avaliadas nos tempos 24, 48 e 72Hs. A análise estatística mostrou que os extratos das frações de Hexano e Diclorometanos foram capazes de diminuir a viabilidade celular a partir das 24Hs de tratamento quando usadas na concentração final de 50% destacando-se o extrato a partir da fração de Diclometano que matou mais de 50% das células em 24Hs (Figura 5).

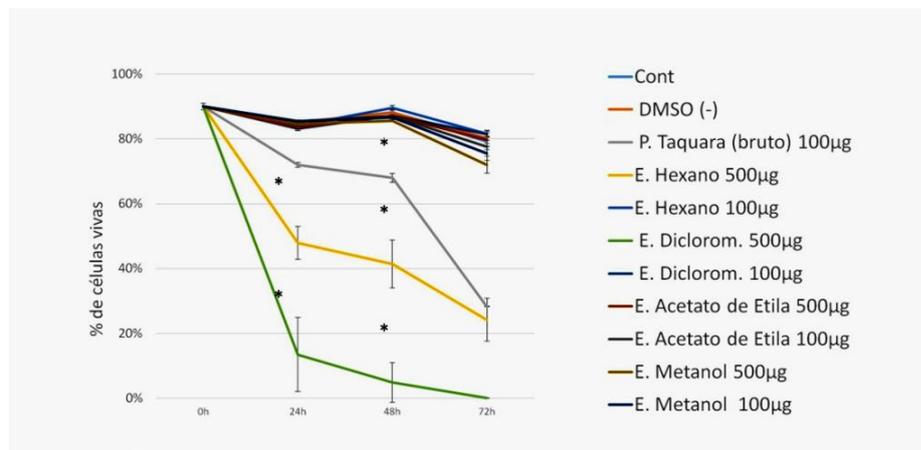


Figura 5. Efeito das frações de própolis na viabilidade de células K562. Foram testados o efeito biológico de 4 solventes em diferentes concentrações e nos tempos 24, 48 e 72Hs. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$ (*)

4. 4 Efeito das frações da própolis no ciclo celular de células K562

Para analisar o efeito das frações no ciclo celular das k562 as células foram tratadas e analisadas por citometria de fluxo quanto ao seu conteúdo de DNA. O extrato bruto apresentou alteração no ciclo celular estatisticamente significativa, contudo nenhuma das frações apresentou alteração significativa no ciclo celular. É possível que a ação da própolis no ciclo celular seja pela interação entre vários compostos, separados nas frações, mas juntos no extrato bruto.

5 CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados indicam que a própolis gaúcha apresenta propriedades biológicas importantes, com capacidade de inibir o crescimento e a proliferação de células leucêmicas. Entretanto, estudos adicionais sobre os mecanismos de ação, o isolamento e caracterização de componente(s) bioativo(s) necessitam ser realizados. A otimização da extração de compostos da própolis também deve ser investigada quanto às suas propriedades biológicas. Esses resultados preliminares mostram que as própolis de Novo Hamburgo, São Gabriel, Taquara e Vacaria poderiam ser uma opção na busca de novas drogas para o tratamento de leucemia, sendo que análises em diferentes linhagens celulares neoplásicas e com própolis de outros municípios do Estado do Rio Grande do Sul estão sendo realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, como também os estudos dos mecanismos celulares e moleculares que induziram a morte nestas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.A.; LOPES, M.T.P. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** Química Nova, v. 28, n. 1, p. 118-119, 2005.

BANKOVA VS, DE CASTRO SL, MARCUCCI MC. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin.** Apidologie. 2000; 3–15p.

BOSTOCK J, RILEY HT, editores. **Pliny the Elder, the Natural History, Book XI. The Various Kinds of Insects.** Cap. 6 e 5. The meaning of the terms commosis, pissoceros, and propolis. Londres, UK, 1855. Disponível em: <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0137%3Abook%3D11%3Achapter%3D6>. Acessado em: 13 de agosto de 2014.

BREYER H. F. E. **Técnicas de produção de própolis.** XIII Congresso brasileiro de Apicultura, 2000.

BRIGHENTI D.M.; SANTOS F.C.; BRIGHENTI CRG. **Método para itencificar a produção de própolis: o quadro coletor “Tira e põe”.** APACAME – Mensagem Doce, vol. 85, 2014.

CECHINEL V.F.; YUNES R.A. **Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade.** Química Nova 21 (1), 1998.

CHAN, G.C.; CHEUNG, K.; SZE, D.M. **The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis.** Clinic Rev Allerg Immunol, 2013, 44:262–273p.

CHEUNG K.W., SZE D.M., CHAN W.K., DENG R.X., TU W., CHAN G.C. **Brazilian green propolis and its constituent, artemillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation.** J Ethnopharmacol 138:463–471, 2011.

DEALEY C. **The Care of Wounds.** Blackwell Publishing; 2005.

DOTA K.F.D.; CONSOLARO M.E.L.; SVIDZINSKI T.I.E.; BRUSCHI M.L. **Antifungal Activity of Brazilian Propolis Microparticles against Yeasts Isolated from Vulvovaginal Candidiasis.** Evidence-Based complementary and Alternative Medicine, vol. 2011, 2010, 8p.

FINSTROM, M.D.S.; 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.; 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.

FROZZA, C.O.S.; SILVA C.O.; GRACIA C.S.C.; GAMBATO G.; SOUZA M.D.O., SALVADOR M.; MOURA S.; PADILHA F.F.; SEIXAS F.K. COLLARES T.; BORSUK S.; DELLAGOSTIN O.A.; HENRIQUES J.A.P.; ROESCH-ELY M. **Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red própolis.** Food and Chemical Toxicology 52, 2013, 137-142p.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM). Disponível em: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=13&op=0&vcodigo=MS28&t=obitos-neoplasias-malignas-taxa-mortalidade-especifica>. Acessada em: 16/08/2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário.** Rio de Janeiro-RJ, 2006, 1-777p.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. Organização Luiz Claudio Santos Thuler. – 2. ed.– Rio de Janeiro : Inca, 2012, 129 p.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2010/agencia_internacional_pesquisa_cancer_lanca_estatisticas. Acessado em: 16/08/2014.

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

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

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

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

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

MIRZOEVA O.K. and CALDER P.C. **The effecto of própolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response.** Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, vol 55 (6), 1996, 441-449p.

NICODEMO D., JONG D. DE, COUTO R.H.N., MALHEIROS E.B. **Honey Bee Lines Selected for High Propolis Production Also have Superior Hygienic Behavior and Increased Honey and Pollen Stores.** Genetics and Molecular Research 12, 2013, 6931-6938p.

OMS – Organização Mundial de Saúde – **International Agency for Research on Cancer (IARC).** Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acessada em 16/08/2014.

OTA C.; UNTERKIRCHER C.; FANTINATO V. SHIMIZU M. T. **Antifungal activity of propolis on different species of *Candid*.** Mycoses, vol. 44(9-10), 2001, 375-378p.

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, p. 2502–2506, 2002.

PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. **Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** Quimica Nova, 2002. 25, 321-326.

RAMOS, A. F. N. and MIRANDA, J. L. **Propolis: A Review of its Anti-inflammatory and Healing Actions.** *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2007, 13, 4, p. 698

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis.** *Evidencebased Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2, nº 1, 2005, 33-38p.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H.; NIKLIŃSKI, J. **The anticancer activity of propolis.** *Folia Histochemica et Cytobiologica*, Vol. 50, Nº 1, 2012, 25–37p.

SEBRAE – Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Boletim – O mercado da própolis.** 2014, 3p.

SFORCIN, J. M; BANKOVA, V. **Propolis: is there a potential for the development of new drugs?** *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 133, 2011, 253 -260p.

SFORCIN, J.M. **Propolis and the immune system: a review.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 1–14, 2007.

SILVA VEIGA PA. **Health and Medicine in Ancient Egypt: Magic and Science.** *British Archaeological Reports*; 2009.

TAI, L., ZEIGER E. **Fisiologia Vegetal.** Trad. Eliane Romanato Santarém *et al.*, 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

VYNOGRAND N., VYNOGRAND I., SOSNOWSKI Z. **A comparative multi-centre study of the efficacy of própolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV).** *Phitomedicine*, vol 7(1), 2000, 1-6p.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer.** Trad. Bruna Selbach *et al.* Porto Alegre: Artmed: 2008, 864p.

XUAN H.; LI Z.; YAN H.; SANG Q.; KAIWANG; HE Q.; WANG Y.; HU F. **Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells.** *Evidence-Based complementary and Alternative Medicine*, 2014, 11p.