

FÁBIO HENRIQUE FERNANDES

**Avaliação do Potencial Antioxidante, Genotóxico e/ou
Antigenotóxico e Estudo Químico de uma amostra de Própolis da
Região do Cerrado de Mato Grosso do Sul**

**CAMPO GRANDE
2012**

FÁBIO HENRIQUE FERNANDES

**Avaliação do Potencial Antioxidante, Genotóxico e/ou
Antigenotóxico e Estudo Químico de uma amostra de Própolis da
Região do Cerrado de Mato Grosso do Sul**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez
Co-orientadora: Profa. Dra. Zaira da Rosa Guterres

CAMPO GRANDE
2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a quatro pessoas que representam a estrutura da minha essência, são elas: meus pais **Marli Coutinho da Rocha Fernandes** e **Vicente Fernandes**, minha irmã **Aline Mirella Fernandes** e meu tio **Dico (Valdir Coutinho da Rocha)** *in memoriam*. Eles estarão sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me fazer companhia, até mesmo no laboratório vazio.

A minha família pelo amor incondicional e efusivo apoio aos estudos desde sempre. Sem o apoio de vocês teria sido mais difícil. Obrigado por sempre acreditarem em mim e pela fortaleza que vocês são. Amo vocês.

Às minhas orientadoras: Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez e Profa. Dra. Zaira da Rosa Guterres por acreditarem em mim desde o início mesmo conhecendo pouco sobre mim. Agradeço pelo rico conhecimento que me foi transferido com ética, entusiasmo e compromisso em realizar ciência com excelência. E tudo isso realizado com uma humanidade admirável. Foi uma honra fazer parte da equipe de vocês.

Ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez e ao Prof. Dr. Joaquim Corsino pelas orientações fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Ambos sempre me atenderam com muita tranquilidade e paciência.

Aos funcionários Msc. Luciana Marçal Ravaglia pelo imenso carinho que tratava minhas amostras de RMN e amizade; Dra. Edilene Delphino Rodrigues pela atenção, disponibilidade em realizar os experimentos de RMN e brincadeiras; Luis Leonardo Viana pelo grandioso profissionalismo e constante disponibilidade para desenvolver análises no CG/EM.

As minhas companheiras do Laboratório Bioensaios, Cleusa Garcia Rocha Gaban pela agradável companhia, risos, exemplo de credibilidade, perseverança e amizade duradoura; Dra. Lilliam May Grespan Estodutto da Silva pela confiança depositada em mim e também preocupação com a minha saúde sempre; Dra. Valquíria Barbosa Nantes Ferreira pelas conversas ricas de cultura e aprendizado; MSc. Liliane Menezes Fernandes por dividir as alegrias e as angustias durante o desenvolvimento do trabalho; MSc. Rosana Aparecida Gabriel Adamowicz pela parceria e troca de informações. Meninas, obrigado pela amável companhia.

Aos alunos de Iniciação Científica: Tiago Senes Lopes pela amizade e auxílio durante as análises das mutações; Sávio Mestre Lopes pelo empenho em estudar a fase acetato de etila; Aline Vendrame de Freitas, Juliana de Sousa Peçanha e Pâmela Rafaela Prado Teixeira pela dedicação, amizade e ajuda durante o trabalho.

A todos os integrantes do LP-1, alguns dos quais eu tive a oportunidade de estar mais próximo: Alex Fonseca Souza, Jeferson Macedo Nazaro, MSc. Patrícia de Oliveira Figueiredo, Talita Vilvalva Freire, Ivan Wider Rezende, MSc. Cristiane Justino do Nascimento, Mariana Mitsue Fujita, Dra. Ivana Maria Pova Violante, Dra. Maria Carolina Silva Marques, Camila Miyuki, Maria José de Camargo, MSc. Aloízio de Oliveira Soares, Dra. Luzinátia Ramos Soares, Lyvia Olarte de Moura, Ulana Chaves Sarmiento, Carlos Henrique Miguita e Aymee Portela. Obrigado pelas conversas!

Agradecimento especial para o Danilo Tófoli, Luiz Roberto Assis Jr. e MSc. Mayker Lázaro Dantas Miranda, pela companhia constante no laboratório inclusive nos finais

de semana e feriados. Vocês tem meu “respeito tecnológico”. Agradeço pela ajuda, troca de informações e por terem subsidiado em mim grande síntese de serotonina (“substância da felicidade”) durante nossas conversas e passeios. Hoje, além de colegas cientistas, somos amigos.

Aos amigos que estiveram longe geograficamente, mas sempre presentes no pensamento Ana Paula Machado, MSc. Paulo Ricardo da Silva Oliveira, Ricieri Andrella Neto, Muryel Furtado de Barros, Giovanna Santana Rovari, Jaqueline Ferreira Piccirilli, Mariana Acosta de Almeida, Antônio Cássio Gonçalves dos Santos, Wesley de Oliveira Souza e Verônica Aoki de Oliveira. Obrigado pela amizade de longa data.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste por viabilizar esse trabalho, bem como às funcionárias Vera Nascimento da Silva e Áurea Gobi pela atenção e disponibilidade.

À agência Capes pela bolsa de Mestrado.

Enfim, agradeço a todos aqueles que estiveram comigo durante todo o percurso e que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa, as palavras supracitadas embora redigidas com muito carinho, pouco traduzem meus sentimentos de gratidão.

Muitíssimo obrigado!

"TTGGGATCCT TGGCAGATGG ACATCAGTGT CATTTACTAA CCAGCAGGAT GGAGACGACG
CCCTTGAATT CTCAGAAGCA GCTATCAGCG TGTGAAGATG GAGAAGATTG TCAGGAAAAC
GGAGTTCTAC AGAAGGTTGT TCCCACCCCA GGGGACAAAG TGGAGTCCGG GCAAATATCC
AATGGGTACT CAGCAGTTCC AAGTCCTGGT GCGGGAGATG ACACACGGCA CTCTATCCCA
GCGACCACCA CCACCCTAGT GGCTGAGCTT CATCAAGGGG AACGGGAGAC CTGGGGCAAG
AAGGTGGATT TCCTTCTCTC AGTGATTGGC TATGCTGTGG ACCTGGGCAA TGTCTGGCGC
TTCCCCTACA TATGTTACCA GAATGGAGGG GGGGCATTCC TCCTCCCCTA CACCATCATG"

Parte da sequência genética da Serotonina, 'substância da felicidade'
NCBI

"Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes".
Isaac Newton

RESUMO

A própolis é uma resina complexa produzida por abelhas cuja composição química depende da biodiversidade botânica da região onde ela é produzida. Na medicina popular é utilizada para o tratamento de várias doenças. Em vista de sua ampla utilização terapêutica e poucos estudos sobre seu mecanismo de ação e também considerando que as propriedades biológicas da própolis produzida no Cerrado de Mato Grosso do Sul que não tenham sido previamente investigados, o objetivo do presente estudo foi avaliar a efeito genotóxico de própolis obtida neste bioma em células da asa de *Drosophila melanogaster*, por meio do teste SMART/asa. A própolis foi sucessivamente extraída com hexano e etanol para obtenção dos extratos PEH e PEE, respectivamente. O extrato PEE foi adicionalmente submetido à partição com hexano (PFH), diclorometano (PFD), acetato de etila (PFA) e *n*-butanol (PFB). Avaliou-se também a atividade antirradicalar (ensaio do DPPH) e determinou-se o teor de fenóis totais (FT) das amostras de interesse. Os constituintes voláteis foram obtidos por destilação de arraste a vapor tipo Clevenger, em seguida, uma alíquota de óleo essencial (POE) foi submetido a CG/EM para em seguida ser analisado pelo índice de Kovats. Para avaliar os efeitos genotóxicos de PEH, PEE, PFA e PFB em células da asa *D. melanogaster*, dois cruzamentos foram utilizados: o padrão (ST) e o de alta bioativação (HB). Várias técnicas cromatográficas resultaram no isolamento de nove substâncias: ácido acetilisocuprêssico (**1**), artepilina C (**2**), ácido *p*-cumárico (**3**), ácido diidrocumárico (**4**), ácido cafeico (**5**), aromadendrina (**6**), *trans*-nerolidol (**7**), espatulenol (**8**) e 3-*epi*-lupeol (**9**), as suas estruturas foram estabelecidas com base em dados de ^1H e ^{13}C de RMN. Os valores mais significativos de atividade antirradicalar e FT foram observados nas fases mais polares: PEE, PFA, e PFB. Sob as condições experimentais, não foi observado genotoxicidade para PEH, PEE, PFA e PFB em todas as concentrações testadas (12,0, 6,0 e 3,0 mg/mL). O tratamento simultâneo com diferentes concentrações de PEE associado à doxorubicina (DXR) induziu à redução da frequência de manchas em comparação com o tratamento com DXR sozinha no cruzamento ST, enquanto que no HB observou-se efeitos genotóxicos, indicando a característica "Janus". Efeitos inibitórios também foram observados para todas as doses da PFB (1,37, 0,69 e 0,345 mg/ml) associada à DXR em ambos cruzamentos (ST e HB), sendo que a concentração mais elevada (1,37 mg/mL) do HB apresentou inibição de 96,2% das manchas mutantes. Entre os compostos isolados, o **1** foi testado e mostrou genotoxicidade na maior concentração (1,0 mg/mL) no cruzamento HB, ou seja, este diterpeno requer bioativação pelo citocromo P450. Este é o primeiro relato sobre o efeito genotóxico do ácido composto ácido acetilisocuprêssico (**1**). Não foi observada genotoxicidade para POE em todas as concentrações testadas (0,05, 0,1 e 0,2%) no cruzamento ST, este resultado pode ser relacionado com compostos principais presentes no POE: *trans*-cariofileno, δ -cadineno, espatulenol e *allo*-aromadendreno. Estes resultados contribuem para o conhecimento da composição química e atividade biológica de uma amostra de própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul como candidatos promissores para novos agentes anticancerígenos.

ABSTRACT

Propolis is a complex resinous bee product whose chemical composition depends on the botanic biodiversity of the region where it is produced. It is used as a folk medicine against several diseases. In view of its widespread therapeutic use and few studies on its mechanism of action and also considering that the biological properties of the propolis produced in the Cerrado of Mato Grosso do Sul have not been previously investigated, the aim of the present study was to evaluate the genotoxic effect of propolis obtained from this biome on *Drosophila melanogaster* wing cells, through SMART/wing test. A sample of propolis was successively extracted with hexane and ethanol to yield the crude extracts HEP and EEP, respectively. The EEP extract was further submitted to partition with the hexane (HPP), dichloromethane (DPP), ethyl acetate (APP) and n-butanol phase (BPP). We evaluated the activity against the DPPH radical and determined the total phenolic content (TP) of the samples of interest. The volatile constituents were obtained by steam distillation method in Clevenger extractor, then an aliquot of essential oil (OEP) was subjected to GC/MS for after analysis of Kovats index. To access the genotoxic effects of HEP, EEP, APP and BPP in *D. melanogaster* wing cells, two different crosses were used: the standard (ST) and the high bioactivation (HB) crosses. Several chromatographic techniques resulted in the isolation of nine substances: acetilisocupressic acid (**1**), artemillin C (**2**), p-coumaric acid (**3**), dihydrocoumaric acid (**4**), caffeic acid (**5**), aromadendrin (**6**), trans-nerolidol (**7**), spathulenol (**8**) and 3-epi-lupeol (**9**), their structures have established on the basis of ¹H and ¹³C NMR data. The most significant activity antiradicalar and TP were observed at polar phases: EEP, APP and BPP. Under the experimental conditions, no genotoxicity was shown by PEH, PEE, PFA and PFB at all evaluated concentrations (12.0, 6.0 and 3.0 mg/mL). Simultaneous treatment with different concentrations of EPP and Doxorubicin (DXR) led to a reduction in the frequency of spots compared to the treatment with DXR alone at ST cross, while at HB cross it display genotoxic effects, indicating the characteristic of a "Janus". Inhibitory effects were also observed for all doses of the PFB (1.37, 0.69 and 0.345 mg/mL) associated with DXR in both crosses (ST and HB), and the highest dose (1.37 mg/mL) in HB cross showed inhibition of 96.2% of the spots. Among the compounds isolated, the **1** was tested and showed genotoxicity at the highest concentration (1.0 mg/mL) in HB cross, namely this diterpene requires bioactivation by cytochrome P450. This is the first report about genotoxic effect of compound acetilisocupressic acid (**1**). No genotoxicity was found for EOP at all concentrations tested (0.05, 0.1 and 0.2%) in fly of the ST cross, this result may be related to major compounds *trans*-caryophyllene, δ -cadinene, and spathulenol *allo*-aromadendrene of EOP. These results contribute to the knowledge of chemical composition and biological activity of a propolis sample from the Cerrado of Mato Grosso do Sul as promising candidates for novel anticancer agents.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema da neutralização do radical do DPPH (coloração violeta) por uma substância com atividade antirradicalar (RH, antioxidante) com formação do DPPH reduzido (colocação amarelada) (Adaptado de YAMAGUCHI *et al.*, 1998). 21
- Figura 2 - Esquema do fracionamento da própolis para a obtenção dos extratos etanólico e hexânico, e das fases hexânica, diclorometânica, acetato de etila e *n*-butanólica. 25
- Figura 3 - Caracterização da linhagem *mwh* de *D. melanogaster* utilizada no teste SMART; Estrutura do par de cromossomos 3, com ênfase dos genes mutantes e características dos pelos das asas; Morfologia da asa em esquema e fotografia (VALADARES, 2000). 31
- Figura 4 - Caracterização da linhagem *flr³* de *D. melanogaster* utilizada no teste SMART; Estrutura do par de cromossomos 3, com ênfase dos genes mutantes e características dos pelos das asas; Morfologia da asa em esquema e fotografia (VALADARES, 2000). 32
- Figura 5 - Caracterização da linhagem Oregon R de *D. melanogaster* utilizada no teste SMART; Estrutura do par de cromossomos 3, com ênfase dos genes mutantes e características dos pelos das asas; Morfologia da asa em esquema e fotografia (VALADARES, 2000). 32
- Figura 6 : Representação do cruzamento padrão (ST) entre as linhagens mutantes de *D. melanogaster* (A) produzindo os descendentes heterozigotos balanceados (BH) com a borda da asa recortada e também com pelos normais na asa e, descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), caracterizados pela borda da asa lisa e a presença de pelos normais (VALADARES, 2000). 33
- Figura 7- Esquema do tratamento crônico (48 h) das larvas trans-heterozigotas *mwh* *+/+ flr³* com as substâncias testadas. As asas dos indivíduos adultos são pontuadas como: manchas simples (*mwh* ou *flr³*) e manchas gêmeas (*mwh* e *flr³*) (Adaptado de GRAF *et al.*, 1984). 34
- Figura 8 - Esquema representativo de uma lâmina com ponta fosca em vidro lapidado contendo asas de *D. melanogaster* para análise microscópica. 35
- Figura 9 - Ilustração do esquema genético de vários caminhos de formação de manchas no teste SMART com marcadores *mwh* e *flr³* nas células das asas. A prevalência de heterozigose promove pelos normais (A). No entanto, deleções (B), mutações de ponto (C) e eventos de não-disjunção (D) resultam em manchas simples *mwh* (Adaptado de GRAF *et al.*, 1984). 36
- Figura 10 - Ilustração do esquema genético de vários caminhos de formação de manchas ano teste SMART com marcadores *mwh* e *flr³* nas células das asas. Manchas gêmeas são obtidas por recombinação proximal para o marcador *flr³* (E), enquanto que a recombinação distal produz somente manchas *mwh* (F). Eventos de dupla recombinação originam somente pelos *flr³*(G). (Adaptado de GRAF *et al.*, 1984). 37

Figura 11 - Esquema representativo do mesotórax de e as regiões A-E da superfície da asa de <i>D. melanogaster</i> para o score das manchas mutantes (GARCIA-BELLIDO; MERRIAM, 1971 <i>apud</i> GRAF <i>et al.</i> , 1984).....	38
Figura 12 - Esquema representativo da classificação de manchas mutantes obtidas pelo teste SMART em asas de <i>D. melanogaster</i> . Destaque para pelos no aumento de 400x em microscopia óptica.	38
Figura 13 - Estrutura do ácido acetiliscupressico.	41
Figura 14 - Estrutura química da substância da artemilina C.	42
Figura 15 - Estrutura do ácido p-cumárico.	43
Figura 16 - Estrutura do ácido diidrocumárico.	44
Figura 17 - Estrutura do ácido cafeico.	44
Figura 18 - Estrutura da aromadendrina.	46
Figura 19 - Estrutura do <i>trans</i> -nerolidol isolado do óleo essencial da própolis.	47
Figura 20 - Estrutura do espatulenol isolado do óleo essencial da própolis.....	48
Figura 21- Estrutura do 3- <i>epi</i> -lupeol isolado da fase aquosa residual proveniente da extração do óleo essencial da própolis.....	49
Figura 22 - Curva padrão obtida a partir do ácido gálico para determinação do teor de fenóis totais da própolis sul-matogrossense.	50
Figura 23 - Conteúdo de fenóis totais (FT) das amostras analisadas. Os valores foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.....	51
Figura 24 - Ativação do carcinógeno aflotoxina. Uma transformação metabólica ativa muitos carcinógenos químicos antes deles causarem mutações por reagirem com o DNA. O composto ilustrado é a aflotoxina B1, uma toxina de um fungo (<i>Aspergillus flavus oryzae</i>) (ALBERTS <i>et al.</i> , 2010).	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Valores de IC ₅₀ (µg/mL) obtidos no ensaio com DPPH para o extrato bruto da própolis e das fases obtidas da partição do extrato, valores superiores a 1000 µg/mL foram considerados inativos.	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ASR	Atividade Sequestradora de Radical
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CG	Cromatografia gasosa
CN	Controle Negativo
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido dextrorribonucleico
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DXR	Cloridrato de Doxorubicina
EAC	Equivalentes de ácido <i>p</i> -cumárico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EM	Espectro de massas
EtOH	Etanol
FFNSC	<i>Flavour and Fragrance Natural and Synthetic</i>
Fr	Frequência
FT	Fenóis totais
HB	<i>High bioactivation</i> (Cruzamento de alta bioativação)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IC50	Inibição de 50%
MG	Mancha gêmea
MSG	Mancha simples grande
MSP	Mancha simples pequena
N	Normal
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
NIST05	<i>National Institute of Standards and Technology 05</i>
P450	Complexo de enzimas do citocromo
PEE	Extrato etanólico

PEH	Extrato hexânico
PFA	Fase acetato de etila
PFB	Fase <i>n</i> -butanólica
PFD	Fase diclorometânica
PFH	Fase hexânica
POE	Óleo essencial
POEAc	Resíduo aquoso da extração do óleo essencial
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP	<i>Reverse Phase</i>
ST	Standart (Cruzamento Padrão)
TM	Total de Manchas
TR	Tempo de Retenção
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dl	Dubleto largo
dt	Duplo tripleto
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	número
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
φ	Diâmetro
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
μg	Micrograma
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Propriedades biológicas.....	19
2.2. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)	19
2.3. Teste para avaliação de atividade antirradicalar	20
2.4. Óleo essencial	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Obtenção da própolis	24
4.2. Cromatografia clássica em coluna e em camada delgada (CCD)	24
4.3. Reagente revelador	24
4.4. Espectros de RMN.....	24
4.5. Estudo químico dos constituintes fixos da própolis	25
4.5.1. Extração da própolis e fracionamento dos extratos	25
4.5.2. Estudo químico do extrato hexânico	25
4.5.3. Estudo químico do extrato etanólico	26
4.5.3.1. Estudo da fase acetato de etila	26
4.6. Estudo químico dos constituintes voláteis da própolis	27
4.6.1. Obtenção do óleo essencial da própolis (POE)	27
4.6.2. Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM)	27
4.6.3. Identificação dos compostos voláteis.....	28
4.6.4. Fracionamento do POE.....	28
4.6.5. Estudo químico do resíduo da extração do POE.....	28
4.7. Avaliação da atividade antirradicalar	29
4.8. Determinação de fenóis totais	29
4.9. Ensaio SMART em asas de <i>D. melanogaster</i>	30

4.9.1. Manutenção das linhagens	30
4.9.2. Linhagens, cruzamento, coleta de larvas e tratamento	31
4.9.3. Montagem e Análise das Lâminas	35
4.9.4. Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Estudo químico da própolis	40
5.1.1. Constituintes fixos	40
5.1.1.1. Identificação das substâncias isoladas do extrato hexânico	40
5.1.1.1.1. Ácido acetiliscupressico	40
5.1.1.1.2. Artepilina C	41
5.1.1.2. Identificação das substâncias isoladas da fase acetato de etila (PFA) proveniente da partição do extrato etanólico	42
5.1.1.2.1. Ácido <i>p</i> -cumárico	42
5.1.1.2.2. Ácido cumárico + ácido diidrocumárico	43
5.1.1.2.3. Ácido cafeico	44
5.1.1.2.4. Aromadendrina	45
5.1.2. Constituintes voláteis	46
5.1.2.1. Identificação dos compostos do POE	46
5.1.2.2. Identificação das substâncias isoladas do POE	46
5.1.2.2.1. <i>trans</i> -nerolidol	46
5.1.2.2.2. Espatulanol	47
5.1.2.3. Estudo químico do resíduo da extração do POE	48
5.1.2.3.1. 3- <i>epi</i> -lupeol	48
5.2. Avaliação da atividade antirradicalar	49
5.3. Determinação de Fenóis Totais	50
5.4. Avaliação da atividade genotóxica e/ou antigenotóxica	51
5.4.1. Avaliação da atividade genotóxica dos extratos hexânico (PEH) e etanólico (PEE)	51
5.4.1. Avaliação da atividade antigenotóxica do extrato etanólico (PEE)	52
5.4.2. Avaliação da atividade genotóxica da fase acetato de etila (PFA) e fase <i>n</i> -butanólica (PFB)	54
5.4.3. Avaliação da atividade antigenotóxica da fase acetato de etila (PFA)	55
5.4.4. Avaliação da atividade antigenotóxica da fase <i>n</i> -butanólica (PFB)	55
5.4.5. Avaliação da atividade genotóxica do ácido acetiliscupressico	56
5.4.6. Avaliação da atividade genotóxica do POE	57
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto formado por material resinoso e balsâmico, elaborado na colmeia por abelhas a partir de material coletado de diversas partes de plantas. De modo geral, os constituintes encontrados em própolis são resinas, bálsamos, óleos essenciais, ácidos graxos e outros compostos orgânicos (GHISALBERTI *et al.*, 1978 *apud* MARCUCCI, 1995).

Sua composição química, portanto, é dependente da variabilidade genética das rainhas (KOO; PARK, 1997) e da biodiversidade da flora da região onde é produzida (PEREIRA *et al.*, 2002). A flora brasileira possui distintos biomas e esta característica proporcionou a classificação da própolis em 12 grupos: um grupo do Sudeste, seis do Nordeste e cinco grupos do Sul (PARK *et al.*, 2000). Posteriormente, a própolis vermelha encontrada no Nordeste foi classificada no grupo 13 (DAUGSCH *et al.*, 2006).

Em relação à origem botânica, a própolis do grupo 3 (região Sul) é produzida principalmente a partir de *Populus* (Salicaceae), do grupo 6 (Nordeste) de *Hyptis divaricata* (Lamiaceae), 12 (Sudeste) de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (PARK *et al.*, 2000) e 13 (Nordeste) de *Dalbergia ecastophyllum* (Leguminosae) (DAUGSCH *et al.*, 2006).

Por sua vez, estudos sobre a própolis da região Centro-oeste são escassos, no Estado de Mato Grosso do Sul, por exemplo, existem apenas estudos de quantificação por meio de Espectrometria de massas (SAWAYA *et al.*, 2004) e HPLC (MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008).

O uso de própolis na medicina popular é praticado desde a Antiguidade para o tratamento de lesões e úlceras por gregos, romanos e egípcios (GHISALBERTI, 1979 *apud* MARCUCCI, 1995). No Egito, fazia parte da composição da fórmula utilizada no embalsamento de cadáveres, sendo conhecidas suas propriedades antiputrefativas. Aristóteles, Dioscórides e Galeno, dentre outros, utilizavam este composto como antisséptico e cicatrizante para o tratamento de feridas. No entanto, somente no século XVII a própolis foi reconhecida oficialmente pela Farmacopeia de Londres (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Desde então, mais de 300 substâncias foram caracterizadas em amostras de própolis, com a predominância de compostos fenólicos, tais como fenilpropanoides e flavonoides (TAZAWA *et al.*, 1998; HAYASHI *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002;

TEIXEIRA *et al.*, 2006; SFORCIN, 2007), além de triterpenos e outras classes de metabólitos secundários (PEREIRA *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Essas substâncias apresentam diversas atividades biológicas, as quais garantem seu uso no tratamento e prevenção de doenças (BANSKOTA *et al.*, 2000; SFORCIN, 2007).

Embora algumas amostras de própolis brasileiras estejam caracterizadas quanto à sua composição e origem vegetal, as produzidas em outras regiões do país são carentes de estudo, sobretudo aquelas que apresentam índices elevados de desmatamento. Este é o caso, do bioma Cerrado, o qual está relacionado entre os mais ameaçados de extinção na lista de *hot spots* (CONSERVATION, 2009). A grande diversidade vegetal do Cerrado torna-se uma importante fonte de metabólitos secundários para a própolis, e conseqüentemente, pode contribuir para o seu potencial farmacológico. O fato de não existirem na literatura relatos sobre a composição química e avaliação de atividades biológicas de amostras de própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul estimulou, o desenvolvimento do presente trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Propriedades biológicas

As abelhas utilizam a própolis para proteger a colmeia, sendo tal característica a responsável pela sua denominação de origem grega (*pro* = em defesa, + *polis* = cidade). Essa função abrange desde o fechamento das frestas da colmeia até a esterilização do local e mumificação dos invasores (MARCUCCI, 1995). De fato, a própolis apresenta propriedade antibacteriana (BANKOVA *et al.*, 1995, CASTRO *et al.*, 1995, BURIOL *et al.*, 2009) e antifúngica (OTA *et al.*, 2001) as quais são primordiais para a vida na colmeia. Além disso, a própolis pode ser empregada no combate de diversas doenças, não só as de origem microbiana, como também as degenerativas do sistema nervoso central e de doenças genéticas (particularmente o câncer), devido à sua potencial atividade antitumoral (ORSOLIC; BASIC, 2005; VELIKOVA *et al.*, 2000). A literatura ainda sugere sua atividade antiviral contra a Influenza (SHIMIZU *et al.*, 2008) e variações do HIV-1 (GEKKER *et al.*, 2005).

Nesse contexto, identificar os efeitos da própolis no DNA é de suma importância, uma vez que substâncias antimutagênicas presentes em vegetais (PATEL *et al.*, 2007) podem auxiliar na prevenção de doenças como o câncer, pois a própolis mostrou-se capaz de reduzir danos no material genético (BARILIAK *et al.*, 1996, VALADARES *et al.*, 2008). Dentre os testes empregados para avaliação de toxicidade genética, destaca-se o teste SMART em asa de *Drosophila melanogaster* (GRAF *et al.*, 1984).

2.2. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O sequenciamento do genoma de *Drosophila melanogaster* revelou uma alta conservação evolutiva quando comparado ao genoma humano, não apenas em nível de sequência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas, demonstrando alta homologia genética entre as espécies (BIER, 2005; LEHMANN *et al.*, 2004).

São também relevantes os dados obtidos a partir de análises do proteoma, uma vez que 60% dos 289 genes relacionados a doenças humanas apresentam homólogos em *Drosophila*, dos quais 75% portam sequências protéicas similares

nestes dois organismos (TINCKOO; RUSSELL, 2002), dessa forma, existe uma alta conservação entre rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies (ST. JOHN e XU, 1997).

Tais informações colocam a *Drosophila melanogaster* como um modelo promissor não apenas para o estudo de doenças humanas, mas também para a avaliação de substâncias que possam ser efetivamente utilizadas no seu combate (BIER, 2005; LEHMANN *et al.*, 2004).

Conhecendo as vantagens promissoras desse modelo biológico, Graf e colaboradores (1984) desenvolveram o teste para detecção de mutação e recombinação somática (*Somatic Mutation And Recombination Test* - SMART) a partir de distintas linhagens de *Drosophila melanogaster*, o qual apresenta resultados considerados confiáveis, inequívocos e altamente reproduzíveis (GRAF *et al.*, 1984). Esse ensaio apresenta alta eficiência na detecção de atividade de substâncias mutagênicas de diversas classes químicas (GRAF *et al.*, 1984). Além disso, tem sido utilizado em tratamentos simultâneos com agente mutagênico conhecido para avaliar efeitos os inibitórios de compostos, dentre eles a própolis (VALADARES *et al.*, 2008). Assim, a bioprospecção de substâncias com potencial genotóxico e/ou antigenotóxico é uma área correlata e complementar da pesquisa de substâncias com atividade anticâncer.

2.3. Teste para avaliação de atividade antirradicalar

Como relatado anteriormente, a própolis pode ser associada à quimioprevenção de diversas doenças devido suas propriedades farmacológicas, dentre elas, a imunomodulatória (SFORCIN, 2007) e antioxidante (HAYASHI *et al.*, 1999; ISLA *et al.*, 2001).

De modo geral, as atividades biológicas conferidas à própolis têm sido atribuídas principalmente a compostos fenólicos, como os flavonoides e fenilpropanoides, os quais se destacam por suas atividades antioxidantes significativas, reduzindo os efeitos tóxicos dos radicais livres e o surgimento de doenças associadas (BANSKOTA *et al.*, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006; SFORCIN, 2007; ESTRADA *et al.*, 2008). De fato, estudos sobre medicina preventiva mostraram que os compostos fenólicos, incluindo aqueles encontrados em algumas

amostras de própolis, são os antioxidantes naturais mais eficientes (HAYASHI *et al.*, 1999; BANSKOTA *et al.*, 2000).

Por outro lado, substâncias antioxidantes em situações adversas podem se tornar pró-oxidantes (CASTRO *et al.*, 2008) e dessa forma provocar lesões no material genético (MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 2004). Por esse motivo, avaliar o potencial antioxidante de uma substância é de grande relevância, bem como conhecer sua ação no organismo.

Um dos ensaios utilizados para investigar o potencial antioxidante de produtos naturais está baseado na facilidade com que o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) recebe um átomo de hidrogênio de uma substância antirradicalar (BLOIS, 1958 *apud* YAMAGUCHI *et al.*, 1998). É possível realizar este ensaio quantitativamente, pois em solução o radical DPPH apresenta uma cor violeta muito intensa, consequência da conjugação do elétron desemparelhado. O radical DPPH absorve em 517nm, no entanto um decréscimo nesse comprimento devido à estabilização do radical pelo recebimento de um hidrogênio radicalar de uma substância doadora, promove a mudança da cor da solução para o amarelo (Figura 1) (BLOIS, 1958 *apud* YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

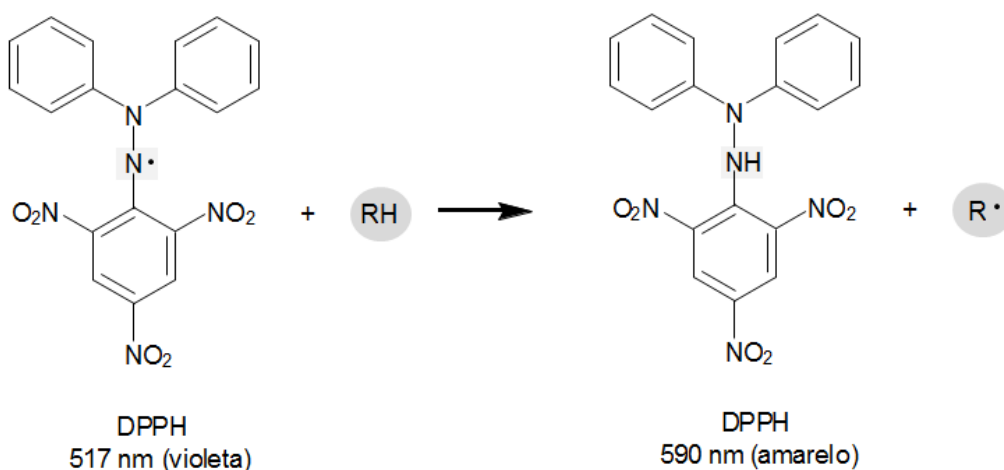


Figura 1 - Esquema da neutralização do radical do DPPH (coloração violeta) por uma substância com atividade antirradicalar (RH, antioxidante) com formação do DPPH reduzido (coloração amarelada) (Adaptado de YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

2.4. Óleo essencial

As abelhas possuem habilidade de coletar na natureza as melhores substâncias para proteger sua colmeia de ataques por micro-organismos (MELLIU

et al., 2007) e essa característica impulsionou estudos com óleo essencial da própolis que comprovaram sua atividade antifúngica *in vitro* (IOSHIDA *et al.*, 2010) e antibacteriana *in vitro* (MELLIU *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

No entanto, além de propriedades antimicrobianas, o óleo essencial da própolis pode apresentar outras atividades, como efeito terapêutico sobre a ansiedade, relatado recentemente numa amostra de origem chinesa (LI *et al.*, 2012), sugerindo linhas de investigações ainda não exploradas.

A avaliação sobre a toxicidade gênica de produtos naturais é primordial para se conhecer os riscos ou benefícios para os organismos vivos, inclusive os seres humanos (PÍCULO *et al.*, 2010). Uma vez que a presença de substâncias carcinógenas podem induzir alterações no material genético permanente por meio de interações com o DNA (SUGIMURA, 1992).

Nesse sentido, as alterações genéticas que promovem o desenvolvimento do câncer ocorrem em genes reguladores do crescimento presentes em células normais: 1) os proto-oncogenes os quais promovem o crescimento; 2) e os genes supressores de tumor que inibem o crescimento celular. As alterações ocorridas nesses dois genes podem provocar o desenvolvimento de células com crescimento descontrolado (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2008).

Dessa forma, a identificação dos constituintes químicos majoritários de produtos naturais, como os presentes no óleo essencial auxilia a interpretação dos resultados de avaliação dos seus possíveis efeitos genotóxicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades antioxidantes, genotóxicas e/ou antigenotóxicas de uma amostra de própolis produzida na região do Cerrado de Mato Grosso do Sul, a partir do estudo químico.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o estudo químico da própolis a partir dos extratos hexânico e etanólico e fases das partições do extrato etanólico.
- Avaliar o potencial antirradicalar dos extratos e fases obtidas, por meio do ensaio com DPPH.
- Determinar o teor de fenóis totais do extrato etanólico e suas partições.
- Avaliar os efeitos genotóxicos e/ou antigenotóxicos (por meio do ensaio SMART) dos extratos, fases obtidas da partição do extrato etanólico e de pelo menos uma das substâncias isoladas;
- Correlacionar o potencial antioxidante com os efeitos genotóxicos ou antigenotóxicos.
- Extrair, identificar e isolar os constituintes do óleo essencial da própolis e avaliar sua atividade genotóxica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da própolis

A amostra de própolis foi adquirida na forma de resina (1 kg) do Apiário Vovô Pedro® localizado no município de Campo Grande – Mato Grosso do Sul, em janeiro de 2010 (resultante da florada de 2009), e mantida sob refrigeração.

4.2. Cromatografia clássica em coluna e em camada delgada (CCD)

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se como fase estacionária, sílica gel (70-230 e 230-400 *mesh*, Merck), sílica gel 60 RP-18 (40-63 μm , Merck), Sephadex LH-20 (100 μm , Sigma®) e resina Amberlite XAD-2Aldrich®. As análises comparativas foram realizadas por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) realizada em placas cromatográfica sílica G TLC-UV 254 (200 μm , Sorbent Technologies®).

4.3. Reagente revelador

As placas cromatográficas foram inicialmente visualizadas por irradiação de luz ultravioleta (Monitor UV, modelo UVGL – 25, UVP com lâmpada Black Ray de 254 e 365 nm), em seguida reveladas com solução ácida de Sulfato Cérico (solução a 2% de sulfato de cério em H_2SO_4 2N). As placas cromatográficas foram colocadas sobre chapa de aquecimento a 100 °C até a revelação dos compostos.

4.4. Espectros de RMN

Os espectros de RMN unidimensionais de ^1H e ^{13}C e bidimensionais HSQC e HMBC foram registrados no espectrômetro Bruker, modelo DPX-300, operando a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em CD_3OD ou CDCl_3 . Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para o RMN ^1H e do solvente e/ou ao tetrametilsilano (TMS) para o RMN de ^{13}C .

4.5. Estudo químico dos constituintes fixos da própolis

4.5.1. Extração da própolis e fracionamento dos extratos

A própolis (500g) previamente congelada foi triturada em liquidificador e extraída com hexano, para obtenção do extrato hexânico (PEH). Em seguida, foi extraída com etanol à temperatura ambiente. O extrato etanólico (PEE), foi submetido a partições sucessivas, das quais originaram as fases hexânica (PFA), diclorometânica (PFD), acetato de etila (PFA) e *n*-butanólica (PFB) (Figura 2). Todos os extratos e fases foram concentrados sob pressão reduzida.

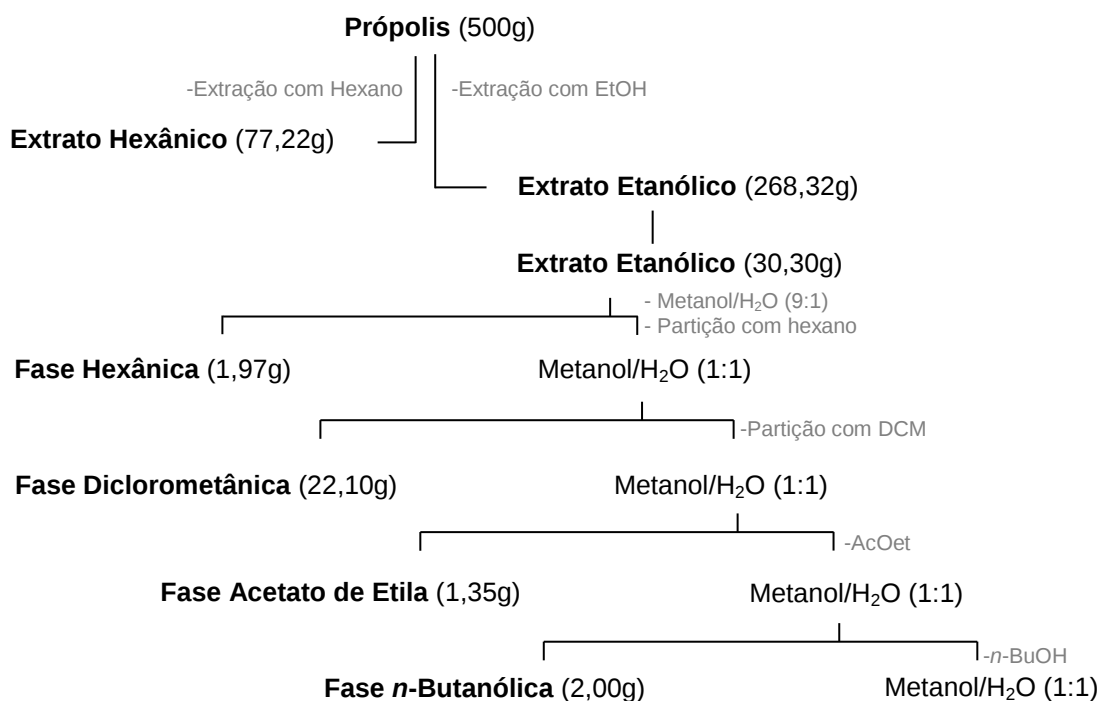


Figura 2 - Esquema do fracionamento da própolis para a obtenção dos extratos etanólico e hexânico, e das fases hexânica, diclorometânica, acetato de etila e *n*-butanólica.

4.5.2. Estudo químico do extrato hexânico

Parte do PEH (75,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 mesh), eluída com misturas de hexano-acetato de etila e acetato de etila-metanol, em gradiente de polaridade crescente. Sessenta e cinco frações de 125 mL cada (denominadas PEH 1 a 65) foram recolhidas, as quais foram concentradas num evaporador rotativo. As frações obtidas foram submetidas a separações posteriores,

em função de sua complexidade, pelo método cromatográfico que se mostrou mais adequado.

A fração PEH40 (2.49 g) foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20 eluída em sistema isocrático (clorofórmio), originando 112 frações (PEH40. 1 a 112). A fração PEH40.32 (51,0 mg) foi recromatografada em coluna de Sephadex LH-20 com hexano-diclorometano (2:8), resultando 50 frações de 5 mL cada.

As frações semelhantes, definidas por análise em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram combinadas, sendo a fração PEH40.32.21-33 constituída pelo **ácido acetilisocuprêssico**. Na fração PEH40.112 foi identificada a substância **artepilina C** como o componente majoritário.

4.5.3. Estudo químico do extrato etanólico

4.5.3.1. Estudo da fase acetato de etila

Uma alíquota da fase acetato de etila (1,0 g) foi submetida primeiramente ao método cromatográfico em coluna de sílica de fase reversa C-18 (coluna PFA-1). O sistema foi eluído, seguindo um gradiente de polaridade decrescente, com água/metanol (8:2), água/metanol (6:4), água/metanol (2:8), metanol e acetato de etila; resultando em 11 frações de 200 mL cada, que após concentradas em evaporador rotatório, foram analisadas por CCDA e escolhida a terceira fração (PFA-1-3) para novo fracionamento.

A fração PFA-1-3 (0,72 g), eluída em água/metanol (6:4) da coluna PFA-1, foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20 em metanol (Coluna PFA-2), coletando-se 5 mL de cada fração. Foram obtidas 51 frações, sendo estas submetidas à CCDA e reunidas as de perfil cromatográfico semelhante, resultando em cinco frações.

Nas frações 4 (PFA-2-4) e 5 (PFA-2-5) foram identificados os compostos **ácido p-cumárico** (3,2 mg) e uma mistura de **ácido p-cumárico** e **ácido diidrocumárico** (9,6 mg), respectivamente.

A fração 3 (PFA-2-3) também foi submetida a uma coluna de sílica gel 230-400 *mesh* (Coluna PFA-3) em clorofórmio/metanol de 5% a 30%, coletando-se 5 mL em cada fração. Foram obtidas 197 frações, sendo estas submetidas à CCDA e

reunidas as de perfil cromatográfico semelhante, resultando em 24 frações. Na fração resultante 4 (PFA-3-4) foi identificado o flavanonol **aromadendrina** (1,7 mg).

Outra alíquota da fase acetato de etila (0,30 g) foi fracionada por cromatografia em coluna de sílica gel de fase reversa C-18 (Coluna PFA-4). A coluna foi eluída com água/metanol 6:4, água/metanol 2:8, metanol e acetato de etila, sendo obtidas 4 frações de 300 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotativo, submetidas e analisadas por CCDA. A fração 1 (PFA-4-1, com 0,26 g) foi selecionada para fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 (Coluna PFA-5) em metanol/água 7:3, coletando-se 5 mL de cada fração. Foram obtidas 115 frações, estas submetidas à CCDA e reunidas as de perfil cromatográfico semelhante, resultando 21 frações. Na fração 15 (PFA-5-15) foi obtido o **ácido cafeico** (6,5 mg).

4.6. Estudo químico dos constituintes voláteis da própolis

4.6.1. Obtenção do óleo essencial da própolis (POE)

A extração do óleo essencial da própolis foi realizada a partir de 500 g de própolis (Apiário Vovô Pedro®) do Cerrado de Mato Grosso do Sul, empregando-se a técnica de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. O óleo essencial obtido foi mantido sob refrigeração (4 °C) até a análise.

4.6.2. Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM)

A análise da composição do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 *plus* em coluna Rtx® de 30 m de comprimento, ϕ 0,25 mm e espessura de filme de 0,25 μ m, nas seguintes condições: injetor a 220 °C, e coluna de 60-240 °C, 3 °C . min⁻¹ com vazão do gás de arraste (He) de 1 mL . min⁻¹, com razão *split* de 1:10, interface e fonte de íons a 240 °C.

4.6.3. Identificação dos compostos voláteis

Os compostos cuja porcentagem de área apresentou valores maior ou igual a 0,1%, foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca virtual *NIST05/FFNSC* e pela determinação experimental do índice de Kovats (IK), calculado a partir de um padrão de n-alcenos (C8-C20 Sigma®, C21 Fluka®):

$$IK = 100 \frac{(TR_{\text{amostra}} - TR_{\text{alcano anterior}})}{(TR_{\text{alcano posterior}} - TR_{\text{alcano anterior}}) + \text{número de carbonos alcano anterior}}$$

A análise foi realizada com os dados obtidos da injeção simultânea do óleo essencial e dos padrões supracitados. Dessa forma, os valores obtidos foram comparados com os índices de Kovats disponíveis na literatura (ADAMS, 2009).

4.6.4. Fracionamento do POE

O óleo essencial (POE, 252,8 mg) também foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (230-400 *mesh*) acoplada a uma pré-coluna de sílica gel (70-230 *mesh*), eluída com hexano e posteriormente com hexano/acetato de etila 2%, hexano/acetato de etila 10%; resultando em 314 frações de 5 mL cada. Nas frações POE.270 e POE.295 foram identificados os compostos, ***trans-nerolidol*** (6,8 mg) e ***espatulenol*** (5,2 mg), respectivamente.

4.6.5. Estudo químico do resíduo da extração do POE

A fase aquosa residual resultante da extração do óleo essencial foi submetida à partição líquido-líquido com acetato de etila. A fase acetato de etila obtida (POEAc) foi concentrada sob pressão reduzida, originando 5,18 g. Este material foi fracionado por cromatografia em coluna de Amberlite XAD-2 em gradiente de metanol/água 2:8, metanol/água 4:6, metanol/água 8:2, metanol, hexano, acetato de etila e acetona, da qual foram coletadas 17 frações contendo 50 mL cada.

A fração eluída com AcOEt (POEAcAc, 500 mg) foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20 no sistema de eluente hexano/diclorometano 2:8, hexano/diclorometano 1:1 e hexano/acetona 3:2, resultando em 121 frações de 5 mL, aproximadamente. A cromatografia de coluna em sílica gel (230-400 *mesh*) no eluente hexano, hexano:acetato de etila 2%, hexano: acetato de etila 50%, acetato de etila (122 frações de 5 mL cada) foi utilizada para purificar a substância **3-epilupeol** (3,4 mg) presente na fração POEAcAc20.

4.7. Avaliação da atividade antirradicalar

A avaliação quantitativa da atividade sequestradora de radicais livres (capacidade antioxidante) foi determinada em espectrofotômetro, utilizando-se o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), por meio do método da microdiluição com algumas modificações (ZHANG *et al.*, 2007; YAMAGUSHI *et al.*, 1998), em triplicata, tendo como controle positivo o ácido cafeico.

A atividade sequestradora de radical (ASR) foi determinada de acordo com a fórmula:

$$ASR(\%) = \frac{(\text{Absorbância do controle negativo} - \text{Absorbância da amostra})}{\text{Absorbância do controle negativo} \times 100}$$

O cálculo foi efetuado de acordo com o método de regressão linear para a obtenção da concentração que inibe 50% (CI₅₀) do teor de DPPH, ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a CI₅₀. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo.

4.8. Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais dos compostos presentes na amostra da própolis, presentes nos extratos e fases das partições, foi realizada de acordo com o protocolo descrito na literatura (SOUSA *et al.*, 2007a) utilizando-se o reagente de Folin–Ciocalteu e empregando-se espectrofotometria na região do visível. As amostras (100,0 mg) foram dissolvidas em metanol, transferidas

quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e seus volumes completados com metanol.

Alíquotas de 7,5 mL de cada uma destas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e completadas com metanol. Alíquotas de 100 µL destas últimas soluções foram agitadas cada uma com 500 µL do reagente Folin–Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 minuto; passado esse tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados às misturas, seguido de agitação por 30 segundos.

Finalmente, as soluções tiveram seus volumes acertados para 10 mL com água destilada. Após 2 horas, a absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro a 750 nm, utilizando-se cubetas de vidro e tendo como “branco” a mistura de todos os reagentes e solventes, menos as amostras provenientes da própolis.

Determinou-se o teor de fenóis totais por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (12,5 a 400 µg/mL) e expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

4.9. Ensaio SMART em asas de *D. melanogaster*

4.9.1. Manutenção das linhagens

As linhagens de *Drosophila melanogaster* foram cedidas pelo Prof. Dr. Mario Antônio Spanó, responsável pelo Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia. Os indivíduos foram mantidos em recipientes contendo uma alíquota de meio de cultura para *D. melanogaster* (25 g de fermento biológico - *Saccharomyces cerevisiae* - Fleischmann®, 11g de Ágar-ágar, 156 g de banana e 1 g de Metil Parabeno P.A. Vetec® e 820 mL de água) à temperatura aproximada de 22 °C e umidade relativa do ar de 65% em câmara B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) com fotoperíodo de 12 horas.

4.9.2. Linhagens, cruzamento, coleta de larvas e tratamento

Foram utilizadas três linhagens de *D. melanogaster* “multiple wing hairs” (*mwh*), *flare*³ (*flr*³) e *Oregon R*, *flare*³ (*ORR*; *flr*³).

A linhagem *mwh* (com constituição genética *y*; *mwh jv*) possui o marcador *mwh* que se localiza no cromossomo 3 (3-3,0) e que tem sua manifestação fenotípica caracterizada por três ou mais pelos por célula da asa (Figura 3).

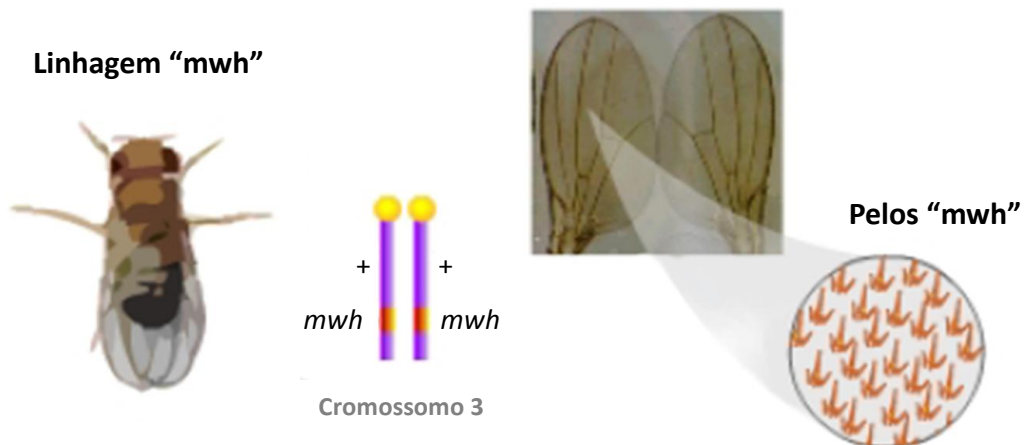


Figura 3 - Caracterização da linhagem *mwh* de *D. melanogaster* utilizada no teste SMART; Estrutura do par de cromossomos 3, com ênfase dos genes mutantes e características dos pelos das asas; Morfologia da asa em esquema e fotografia (VALADARES, 2000).

A linhagem “*flr*³” (de constituição genética *flr*3 / *ln*(3LR)*TM3*, *ri p^p sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^S) possui o marcador *flr*³, também no cromossomo 3, numa posição mais proximal (3-38,8) e sua manifestação fenotípica é caracterizada por um pelo modificado em forma de chama. O marcador *flr*³ em homozigose leva a letalidade dos indivíduos (GRAF *et al.*, 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

Dessa forma, pra manter a heterozigose da linhagem, foi construído um cromossomo balanceador *TM3*, *Bd*^S (*Third Multiple 3, beaded-serrate*). As múltiplas inversões presentes nesse cromossomo impedem que haja recombinação entre os cromossomos homólogos (LINDSLEY; ZIMM, 1992 *apud* GRAF *et al.*, 1996) (Figura 4).

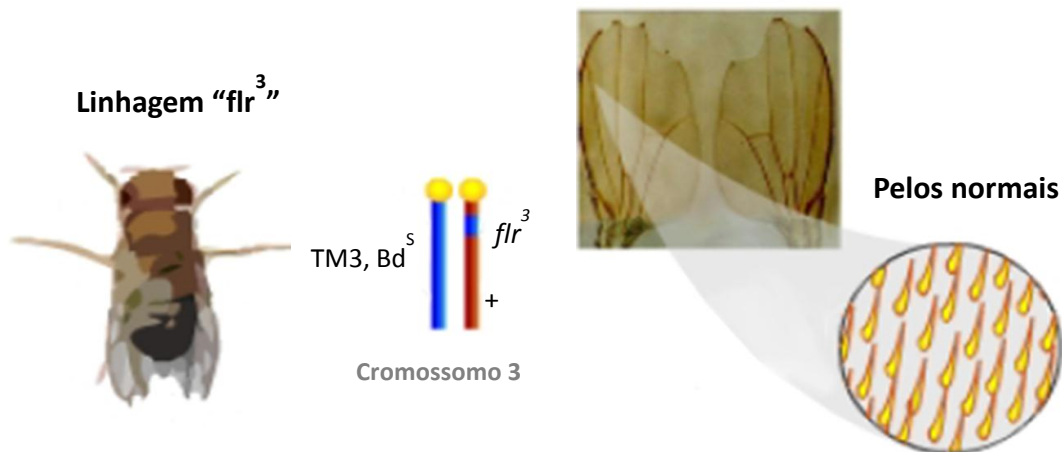


Figura 4 - Caracterização da linhagem *flr*³ de *D. melanogaster* utilizada no teste SMART; Estrutura do par de cromossomos 3, com ênfase dos genes mutantes e características dos pelos das asas; Morfologia da asa em esquema e fotografia (VALADARES, 2000).

Na linhagem "ORR; *flr*³" (de constituição genética *ORR; flr*³ / *ln(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) o marcador *flr*³ também encontra-se presente. No entanto, esta linhagem difere da linhagem "flare³" por apresentar nos cromossomos 1 e 2 uma alta atividade das enzimas citocromo P450 (HÄLLSTRÖM; BLANCK, 1985 *apud* GRAF; SCHAIK, 1992) as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de promutágenos e procarcinógenos (DAPKUS; MERELL, 1977) derivados da linhagem Oregon R, resistente ao Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) construída por FRÖLICH; WÜRGLER (1989) (Figura 5).



*Cromossomos 1 e 2 possuem alta atividade do citocromo P450

Figura 5 - Caracterização da linhagem Oregon R de *D. melanogaster* utilizada no teste SMART; Estrutura do par de cromossomos 3, com ênfase dos genes mutantes e características dos pelos das asas; Morfologia da asa em esquema e fotografia (VALADARES, 2000).

Foram realizados dois tipos de cruzamentos, (1) o Padrão (ST) (GRAF *et al.*, 1984), no qual fêmeas virgens da linhagem *flr³* foram selecionadas e cruzadas com indivíduos machos *mwh* (Figura 6a) e (2) o cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB) (GRAF; SCHAUK, 1992), cujas fêmeas virgens da linhagem *ORR/flr³* foram cruzadas com os machos *mwh*.

Ambos os cruzamentos originam dois tipos de descendentes heterozigotos com composição genética distinta. Os heterozigotos balanceados (BH) e os indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) (Figura 6b).

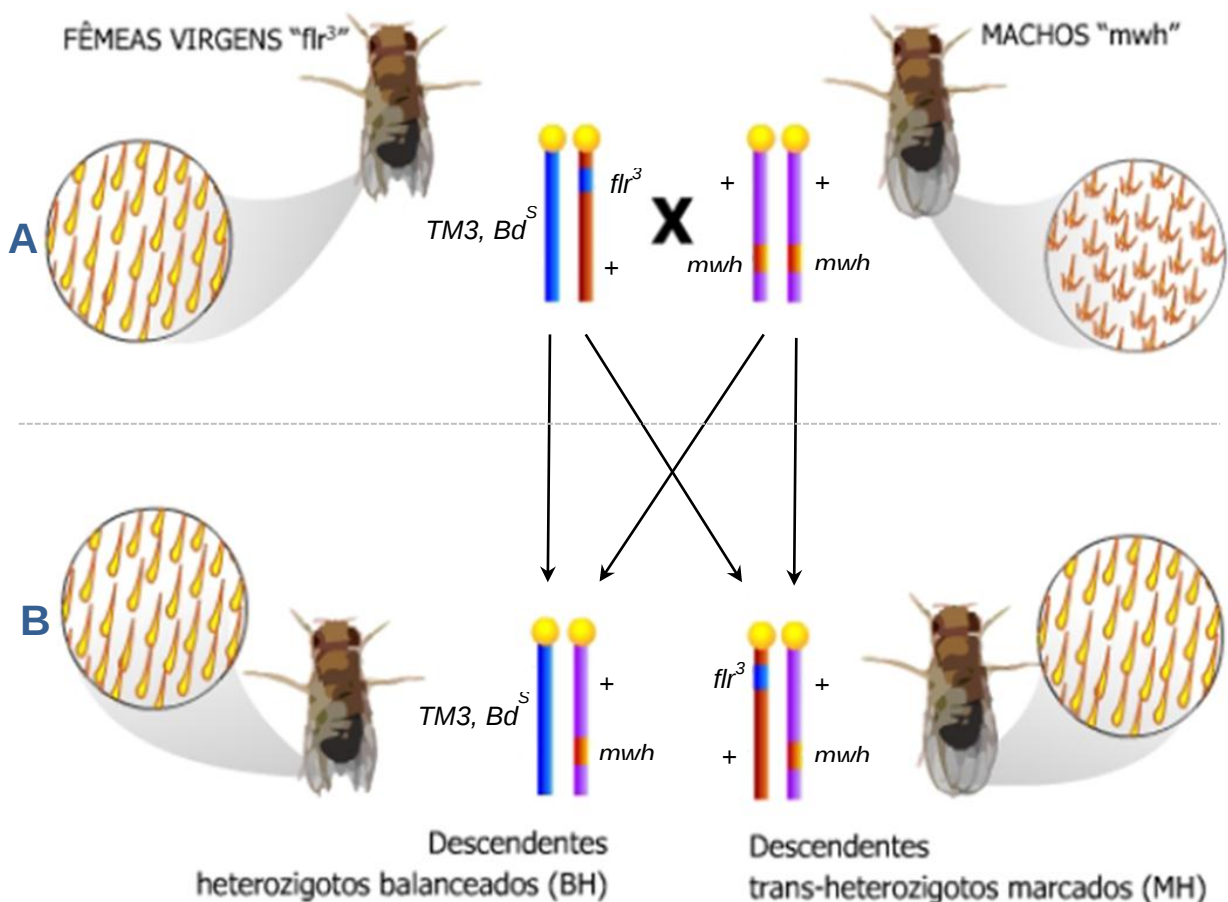


Figura 6 : Representação do cruzamento padrão (ST) entre as linhagens mutantes de *D. melanogaster* (A) produzindo os descendentes heterozigotos balanceados (BH) com a borda da asa recortada e também com pelos normais na asa e, descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), caracterizados pela borda da asa lisa e a presença de pelos normais (VALADARES, 2000).

Após esse período, os indivíduos foram transferidos para recipientes contendo o meio de cultura, específico para ovoposição composto por uma camada sólida de ágar (3% de ágar em água) e outra camada superficial composta de fermento biológico - *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®) e sacarose.

Nessas condições, as fêmeas realizaram a postura durante um período de 8 horas. Após o intervalo de 72 ± 2 h, indivíduos no terceiro estágio de desenvolvimento larval provenientes dos cruzamentos ST e HB foram coletados, lavados com água corrente e selecionados por meio de uma peneira de malha fina, em seguida foram transferidos para recipientes de tratamento contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (Purê de batata instantâneo, Yoki®) e 5 mL de diferentes concentrações dos extratos, partições e substâncias.

Como controle negativo, foi utilizado o solvente (Composto por água, 3% de Etanol e 1 % de Tween®40) e como controle positivo, foi utilizado o Cloridrato de Doxorrubicina Gleirmark® (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL. Para os ensaios de antigenotoxicidade a DXR (0,125 mg/mL) foi utilizada no tratamento simultâneo com a amostra.

As larvas foram submetidas ao tratamento crônico, por aproximadamente 48 horas. Após esse intervalo, as larvas sobem pelas paredes do recipiente e atingem o próximo estágio de desenvolvimento, a pupa.

Durante o período larval, caso haja alteração nas células primordiais dos discos imaginais das asas, devido à ação dos compostos testados, a perda da heterozigose poderá ser detectada nos pelos mutantes da asa do indivíduo adulto (Figura 7).

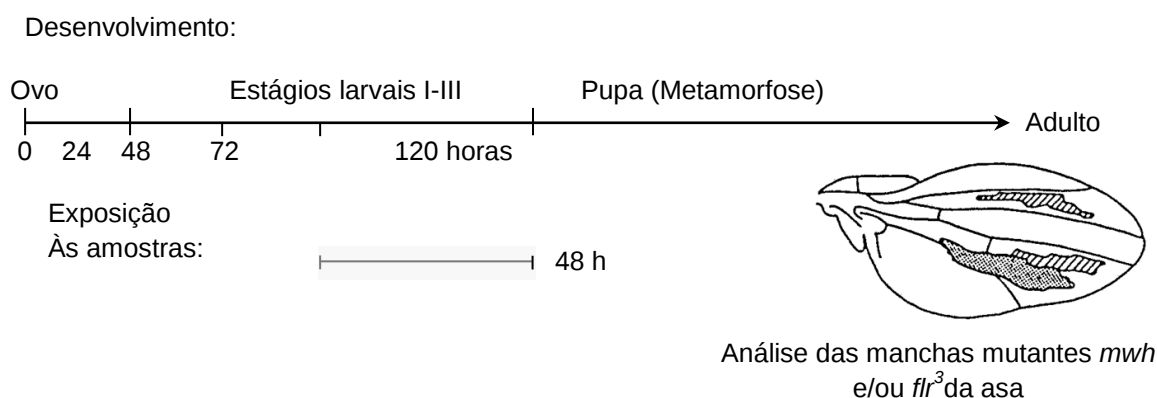


Figura 7- Esquema do tratamento crônico (48 h) das larvas trans-heterozigotas *mwh* *+/+* *flr*³ com as substâncias testadas. As asas dos indivíduos adultos são pontuadas como: manchas simples (*mwh* ou *flr*³) e manchas gêmeas (*mwh* e *flr*³) (Adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

Durante esse intervalo os indivíduos permaneceram em condições de temperatura ambiente controlada (22 °C) em câmara B.O.D. apropriadas para manutenção de linhagens de *D. melanogaster*. Após se alimentarem do meio e

completarem a metamorfose, os adultos emergentes foram coletados e preservados em etanol 70%.

4.9.3. Montagem e Análise das Lâminas

Os indivíduos (fêmeas e machos) foram separados aleatoriamente e suas respectivas asas foram destacadas e dispostas aos pares sobre lâminas (Figura 8). Em seguida, foram fixadas com solução de Faure (goma arábica 30 mg, glicerol 20 mL, hidrato de cloral 50 mg e 50 mL de água).



Figura 8 - Esquema representativo de uma lâmina com ponta fosca em vidro lapidado contendo asas de *D. melanogaster* para análise microscópica.

A célula que sofreu perda do alelo selvagem irá desenvolver o fenótipo mutante, durante a metamorfose no estágio de pupa, e pode ser diferenciada facilmente das demais (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, deleções, não-disjunções (Figura 9) e recombinações mitóticas proximais, distais e duplas (Figura 10). Por outro lado, nos indivíduos BH só é possível detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas, pois a presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador impede que as células resultantes de recombinação mitótica sejam viáveis.

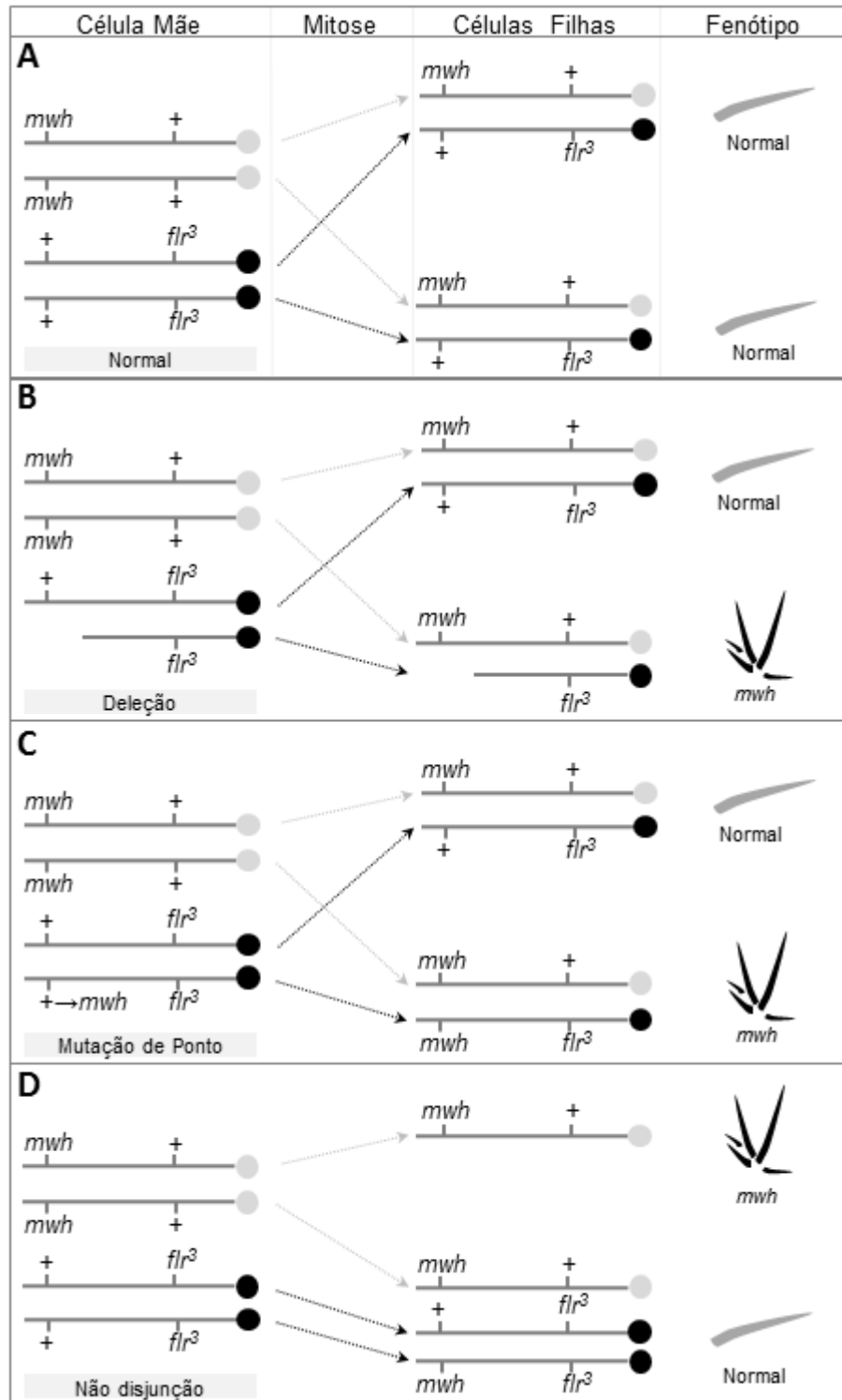


Figura 9 - Ilustração do esquema genético de vários caminhos de formação de manchas no teste SMART com marcadores *mwh* e *flr³* nas células das asas. A prevalência de heterozigose promove pelos normais (A). No entanto, deleções (B), mutações de ponto (C) e eventos de não-disjunção (D) resultam em manchas simples *mwh* (Adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

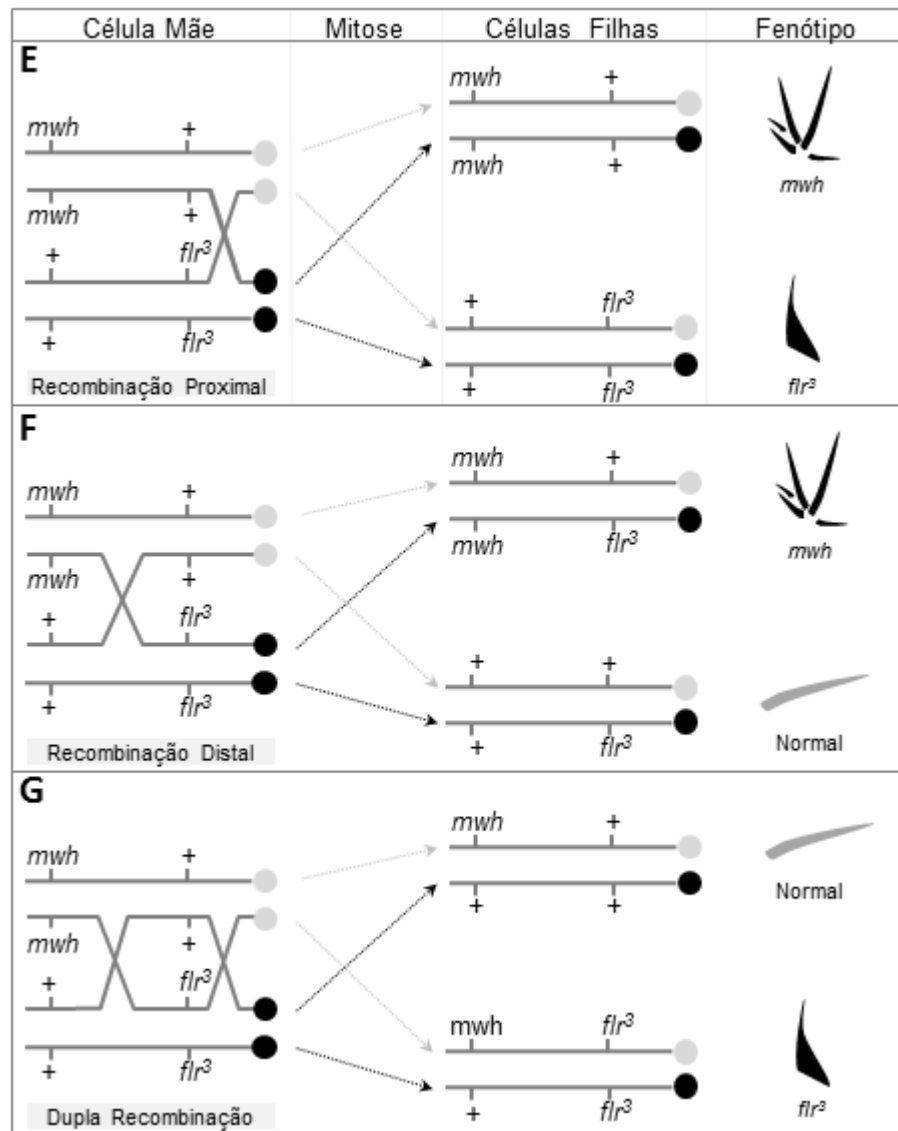


Figura 10 - Ilustração do esquema genético de vários caminhos de formação de manchas no teste SMART com marcadores *mwh* e *flr³* nas células das asas. Manchas gêmeas são obtidas por recombinação proximal para o marcador *flr³* (E), enquanto que a recombinação distal produz somente manchas *mwh* (F). Eventos de dupla recombinação originam somente pelos *flr³* (G). (Adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

A análise das manchas mutantes foi realizada em microscópio óptico de luz (Motic®) no aumento de 400x onde se analisou cerca de 24.400 células (folículos pilosos) das sete regiões (A, B, C', C, D', D e E) de cada asa (Figura 11) (GRAF *et al.*, 1984).

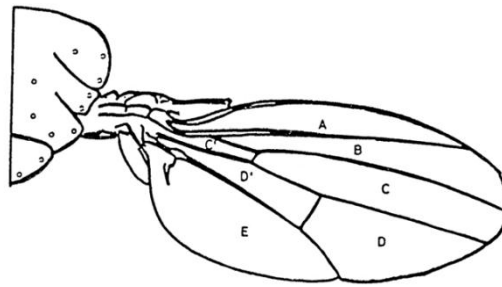


Figura 11 - Esquema representativo do mesotórax de e as regiões A-E da superfície da asa de *D. melanogaster* para o score das manchas mutantes (GARCIA-BELLIDO; MERRIAM, 1971 *apud* GRAF *et al.*, 1984).

Os grupos de pelos são classificados em manchas simples, quando expressam apenas um dos marcadores (*mwh* ou *flr*³), ou manchas gêmeas, quando expressam os dois marcadores (*mwh* e *flr*³) na mesma mancha (Figura 12). Em relação ao tamanho, as manchas foram classificadas em “pequenas”, no caso de expressão com um ou dois pelos mutantes e “grandes” ao apresentarem mais de dois tricomas.

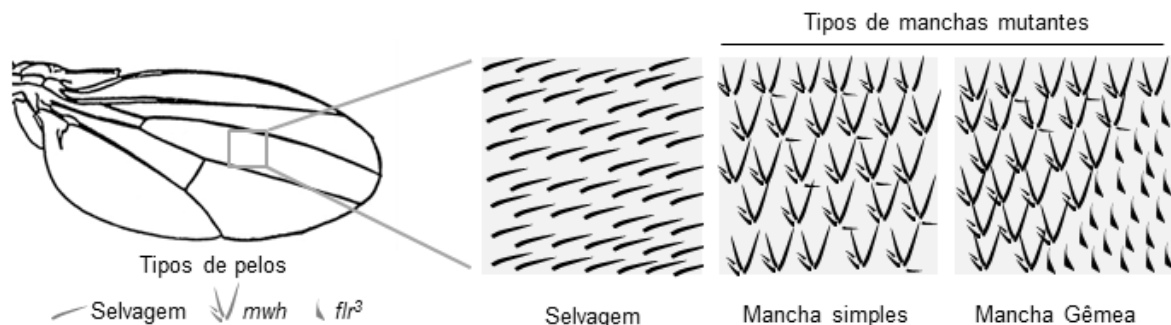


Figura 12 - Esquema representativo da classificação de manchas mutantes obtidas pelo teste SMART em asas de *D. melanogaster*. Destaque para pelos no aumento de 400x em microscopia óptica.

4.9.4. Análise estatística

Após a análise das asas, os dados foram tabelados por tipo e tamanho das manchas mutantes, posteriormente receberam tratamento estatístico segundo a metodologia descrita por Frei e Würgler (1988), onde se utiliza o teste do χ^2 para proporções, bicaudal, com nível de significância $\alpha=\beta=0,05$. Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo.

O cálculo de percentagem de inibição (PI) foi realizado a partir das frequências de mutações obtidas dos indivíduos que foram tratados com as amostras associadas à DXR, de acordo com Abrahan (1994):

$$PI = \frac{(\text{frequência de mutações DXR} - \text{frequência de mutações Amostra com DXR})}{\text{frequência de mutações DXR}} \times 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trata-se do primeiro relato sobre o estudo das atividades biológicas de uma amostra de própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul e dos seus constituintes fixos e voláteis.

No presente trabalho, foi realizado o estudo do extrato hexânico, do extrato etanólico (especificamente, a fase AcOEt resultante de sua partição) e do óleo essencial. O estudo dos dois primeiros diz respeito aos constituintes fixos da própolis, enquanto que o estudo do óleo essencial forneceu informações sobre seus constituintes voláteis.

5.1. Estudo químico da própolis

5.1.1. Constituintes fixos

5.1.1.1. Identificação das substâncias isoladas do extrato hexânico

5.1.1.1.1. Ácido acetilisocuprêssico

No presente estudo, foi isolado um diterpeno de esqueleto labdânico, identificado como ácido acetilisocuprêssico (Figura 13) após análise de seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , seguida de comparação com dados espectrais disponíveis na literatura (POPOVA *et al.*, 2009). A ocorrência deste composto já foi relatada na própolis brasileira (BANSKOTA *et al.*, 1998) e grega (POPOVA *et al.*, 2010).

Diterpenos são encontrados em própolis de diversas regiões do mundo. Na Grécia, por exemplo, a provável fonte dessa classe de substâncias são espécies da família Cupressaceae (POPOVA *et al.*, 2010). No Brasil, são as araucárias na região Sul (BANKOVA *et al.*, 1996), enquanto que a *Baccharis dracunculifolia* provavelmente origina esses terpenoides nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (MISSIMA *et al.*, 2007).

A literatura descreve o ácido acetilisocuprêssico como antibacteriano (POPOVA *et al.*, 2009) e citotóxico em células tumorais (BANSKOTA *et al.*, 1998). No entanto, não existem relatos sobre sua toxicidade genética.

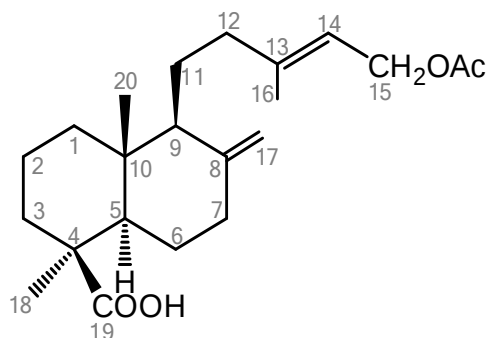


Figura 13 - Estrutura do ácido acetilisocuprêssico.

5.1.1.1.2. Artepilina C

No presente trabalho, foi identificado como componente majoritário da fração PEH40.112 o fenil propanoide prenilado conhecido por artepilina C (Figura 14). A elucidação estrutural deste composto foi efetuada com base na análise de seus dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C , os quais apresentaram uma boa correlação com os descritos na literatura para a artepilina C (CAMPOS *et al.*, 2011).

Em análises químicas realizadas com amostras de própolis brasileiras, compostos do tipo fenilpropanoides prenilados e seus derivados foram detectados como os mais comuns e mais abundantes, principalmente para a região Sudeste (SALATINO *et al.*, 2005).

Artepilina C é um dos ácidos fenólicos mais encontrados na espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae), popularmente denominada de “alecrim-do-campo” (PARK *et al.*, 2004). As folhas (KUMAZAWA *et al.*, 2003) e a resina dessa espécie são reconhecidas como a principal fonte botânica para a produção da própolis brasileira (ALENCAR *et al.*, 2005).

De fato, os extratos etanólicos de *B. dracunculifolia* e da própolis verde (denominada “verde” por conta da marcante presença dessa espécie vegetal na sua composição) apresentam similaridade no perfil cromatográfico (ALENCAR *et al.*, 2005) e na atividade biológica (LEITÃO *et al.*, 2004), tendo a substância artepilina C como componente principal em ambos os extratos.

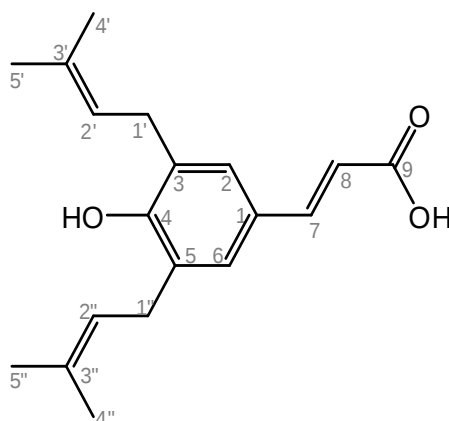


Figura 14 - Estrutura química da substância da artepilina C.

Devido à sua presença majoritária em amostras de própolis brasileira, esse fenilpropanoide tem sido avaliado biologicamente. Os estudos mostram diversos efeitos como, antitumoral (KIMOTO *et al.*, 2001), antitripanossoma (MARCUCCI *et al.*, 2001), antifúngico (FERESIN *et al.*, 2003), sendo sugerido que este composto seja provavelmente o responsável pela ação antibacteriana da própolis (AGA *et al.*, 1994).

Além disso, o seu potencial antioxidante (KUMAZAWA *et al.*, 2004) indica que essa substância reduz danos genéticos. De fato, a artepilina C inibiu mutações em células pelo teste do cometa e micronúcleo (NETO *et al.*, 2011).

Na própolis sul-matogrossense, a artepilina C foi quantificada por HPLC em amostras coletadas nas cidades de Angélica, Mundo Novo e Campo Grande, sendo que a maior concentração foi observada na amostra da capital do estado (MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2008).

5.1.1.2. Identificação das substâncias isoladas da fase acetato de etila (PFA) proveniente da partição do extrato etanólico

5.1.1.2.1. Ácido *p*-cumárico

O composto isolado da fração PFA-2-4 foi identificado como sendo o ácido *p*-cumárico (Figura 15), com base na análise de seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , confirmado posteriormente por meio da comparação com dados disponíveis na literatura (AN *et al.*, 2008).

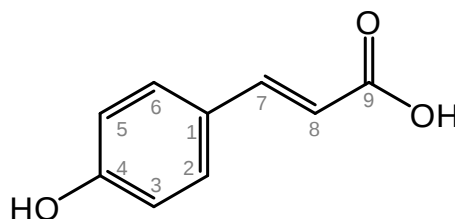


Figura 15 - Estrutura do ácido *p*-cumárico.

Previamente, esse fenilpropanoide havia sido identificado apenas por HPLC na própolis brasileira (PARK *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2007), europeia (SCHNITZLER *et al.*, 2010) e israelense (CROCI *et al.*, 2009) e portanto, seu isolamento e caracterização por meio de dados de RMN a partir de uma amostra de própolis está sendo descrito pela primeira vez.

A atividade antioxidante da própolis verde está relacionada, sobretudo à presença de flavonoides e derivados do ácido *p*-cumárico (SIMÕES *et al.*, 2004). De fato, esse ácido atua como agente antioxidante, pois inibe a peroxidação do ácido linoleico (HAYASHI *et al.*, 1999).

Além disso, Vauzour e colaboradores (2010) descreveram seu efeito neuroprotetor como sendo o mais eficaz que o dos flavonoides catequina e epicatequina. Outro ponto importante do ácido *p*-cumárico está na sua para-hidroxilação, a qual está associada à sua elevada atividade antitumoral (SZLISZKA *et al.*, 2009).

5.1.1.2.2. Ácido cumárico + ácido diidrocumárico

A análise dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da fração PFA-2-5 revelou que a mesma se tratava de uma mistura, contendo ácido *p*-cumárico como componente principal (já isolado da fração PFA-2-4, item 5.1.1.2.1.) e outro fenilpropanoide como constituinte minoritário, o qual foi identificado como sendo ácido diidrocumárico (Figura 16). Tais compostos são diferenciados apenas pela ausência de insaturação nos carbonos 7 e 8 do ácido diidrocumárico. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do ácido diidrocumárico apresentaram uma boa correlação com os descritos na literatura para este composto (OWEN *et al.*, 2003).

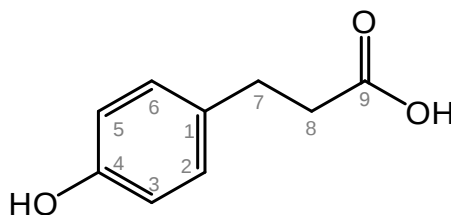


Figura 16 - Estrutura do ácido diidrocumárico.

A ocorrência do ácido diidrocumárico em amostras de própolis brasileira e egípcia foi detectada apenas por HPLC (CHANG *et al.*, 2008; EL-HADY *et al.*, 2007). Assim, este é o primeiro relato do isolamento deste composto de própolis e de sua identificação por dados espectrais de RMN.

5.1.1.2.3. Ácido cafeico

Da fração PFA-5-15 foi isolado um sólido amorfo, cujos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C permitiram caracterizá-lo como sendo o fenilpropanoide ácido cafeico (Figura 17). Os dados espectrais deste composto mostraram-se bastante semelhantes aos do ácido cafeico descrito na literatura (JEONG *et al.*, 2011).

O isolamento do ácido cafeico a partir de própolis foi relatado na Bratislava por Čižmárik; MATEL em 1970, posteriormente este composto foi identificado em amostras de própolis produzidas no Irã (MOHAMMADZADEH *et al.*, 2007) e no Brasil (BANKOVA *et al.*, 1995). Entretanto, esse é o primeiro relato de isolamento do ácido cafeico na própolis brasileira.

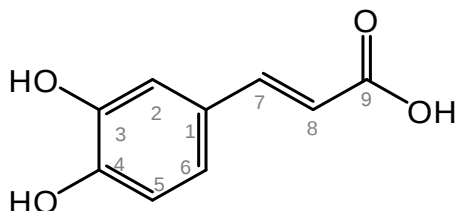


Figura 17 - Estrutura do ácido cafeico.

Em relação a suas atividades farmacológicas, o ácido cafeico apresenta potencial terapêutico, devido à sua ação antimetástica, antitumoral (CHUNG *et al.*,

2004), neuroprotetora (SUL *et al.*, 2009), antioxidante (GÜLÇİN, 2006) e bactericida (ČIŽMÁRIK; MATEL, 1970).

Quanto à toxicidade genética, esse composto apresentou antigenotoxicidade no teste de Ames e no cruzamento ST do ensaio SMART/asa (KAREKAR *et al.*, 2000).

5.1.1.2.4. Aromadendrina

Vários flavonoides foram relatados em amostras de própolis produzidas em várias regiões do mundo (SALATINO *et al.*, 2011). No presente trabalho, o composto isolado da fração PFA-3-4 foi caracterizado através da análise de seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , HSQC e HMBC como sendo o flavanonol aromadendrina (Figura 18). Os dados espectrais obtidos apresentaram uma boa correlação com os descritos na literatura para este flavonoide (HAN *et al.*, 2007).

Embora haja vários relatos na literatura sobre a presença de flavonoides em própolis, raros são os exemplos de flavonoides com esqueleto do tipo flavanonol. No que se refere especificamente à ocorrência de aromadendrina em própolis brasileira, há apenas um registro em uma amostra de própolis de Minas Gerais (NAFADY *et al.*, 2003).

Os flavonoides são conhecidos pela sua atividade antioxidante (PIETTA, 2000), a aromadendrina, por exemplo, protege células do estresse oxidativo ao inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (FUNARI *et al.*, 2011). Nesse contexto, as hidroxilas responsáveis pelo potencial antioxidante, parecem ser essenciais (aquelas localizadas nos carbonos 5 e 7) também à atividade antimutagênica (CHOI *et al.*, 1994). Entretanto, seu efeito protetor sobre aflatoxina B₁ foi relatado como sendo fraco (CHOI *et al.*, 1994), talvez devido ao seu potencial citotóxico moderado frente células tumorais (JEON *et al.*, 2008).

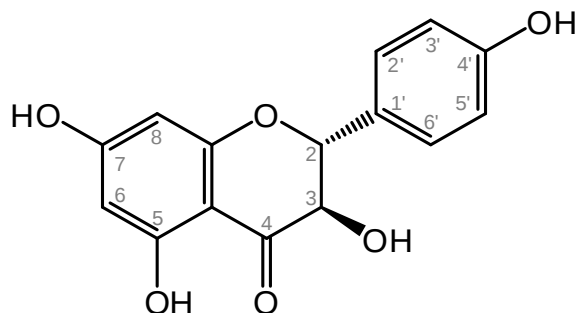


Figura 18 - Estrutura da aromadendrina.

5.1.2. Constituintes voláteis

5.1.2.1. Identificação dos compostos do POE

A análise da composição química do óleo essencial extraído da própolis (POE) foi realizada por meio da técnica de CG/EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas).

A composição dos constituintes voláteis da própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul apresentou quase que na sua totalidade de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (95%) dentre os constituintes químicos identificados. Nas amostras de óleo essencial de própolis brasileiras, os sesquiterpenos também foram predominantes em amostras do estado de Minas Gerais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008) e no Rio de Janeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2010), enquanto que no estado do Piauí ocorreu variação no percentual das classes de mono e sesquiterpenos de acordo com a região analisada (TORRES *et al.*, 2008).

5.1.2.2. Identificação das substâncias isoladas do POE

A partir da separação cromatográfica do POE, foi possível isolar dois de seus componentes, os sesquiterpenos *trans*-nerolidol e espatulenol.

5.1.2.2.1. *trans*-nerolidol

O composto obtido na fração POE-270, proveniente da coluna cromatográfica realizada com o óleo essencial (POE), foi indentificado com base em seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e confirmado por comparação com os dados

da literatura (MIYAZAWA *et al.*, 1996) como sendo o sesquiterpeno *trans*-nerolidol (Figura 19). Trata-se do primeiro relato do isolamento desse sesquiterpeno de uma amostra de própolis brasileira, pois anteriormente este composto apenas havia sido identificado por CG/EM na própolis brasileira (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008).

A presença de nerolidol (porém sem definição da estereoquímica) como componente principal do óleo essencial foi descrita em amostras de própolis das Ilhas Canárias (BANKOVA *et al.*, 1998) e do Paraná (BANKOVA *et al.*, 1999).

A literatura relata para o *trans*-nerolidol atividade tripanossomicida (HOET *et al.*, 2006) e apresentou excelente atividade anti-inflamatória (TUNG *et al.*, 2008).

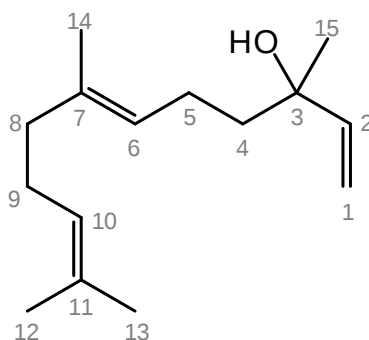


Figura 19 - Estrutura do *trans*-nerolidol isolado do óleo essencial da própolis.

5.1.2.2.2. Espatulenol

A substância espatulenol (Figura 20) foi isolada da fração POE-295 e teve sua estrutura identificada com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C os quais apresentaram grande semelhança com os do espatulenol descritos na literatura (MOREIRA *et al.*, 2007). Esse sesquiterpeno tem sido identificado em diversas amostras de própolis (TORRES *et al.*, 2008, MARÓSTICA-JUNIOR *et al.*, 2008). A literatura descreve seu efeito imunomodulatório (ZIAEI *et al.*, 2011) e também como sendo um dos principais responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo essencial de *Helichrysum cymosum* e *H. fulgidum* (BOUGATSOS *et al.*, 2004).

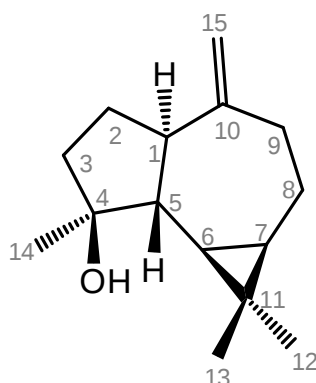


Figura 20 - Estrutura do espatulenol isolado do óleo essencial da própolis.

5.1.2.3. Estudo químico do resíduo da extração do POE

Além do estudo da composição química do óleo essencial, optou-se também por estudar a fase aquosa remanescente no balão de destilação após a extração do óleo essencial. Embora os componentes presentes nesta fase não sejam voláteis (não arrastáveis pelo valor d'água), os resultados obtidos do estudo da fase aquosa foram inseridos num sub-item do item 5.1.2, uma vez que esta foi obtida a partir do estudo do óleo essencial.

A fase aquosa foi particionada com AcOEt e a fase AcOEt obtida deste processo foi submetida a processos cromatográficos, que resultaram no isolamento de um composto amorfo (item 5.1.2.3.1.3)

5.1.2.3.1. 3-*epi*-lupeol

O sólido amorfo obtido após diversos fracionamentos cromatográficos da fase AcOEt foi identificado, por meio da análise dos sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , como sendo o triterpeno pentacíclico 3-*epi*-lupeol (Figura 21).

Este é o primeiro relato na literatura do triterpeno 3-*epi*-lupeol em uma amostra de própolis, sua estrutura foi identificada com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^1H ^{13}C .

Adicionalmente, 3-*epi*-lupeol isolado de *Glochidion eriocarpum* apresentou efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais (PUAPAIROJ *et al.*, 2005).

Esse triterpeno também apresentou moderada atividade anti-tuberculose (AKIHISA *et al.*, 2005).

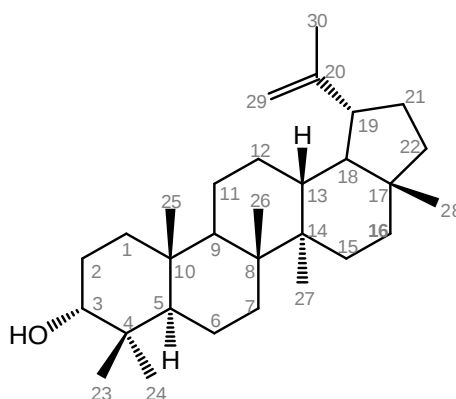


Figura 21- Estrutura do 3-*epi*-lupeol isolado da fase aquosa residual proveniente da extração do óleo essencial da própolis.

5.2. Avaliação da atividade antirradicalar

Os resultados obtidos no ensaio com DPPH para avaliação do potencial antioxidante dos extratos hexânico (PEH) e etanólico (PEE) e das fases provenientes da partição do segundo [as fases hexânica (PFH), diclorometânica (PFD), acetato de etila (PFA) e *n*-butanólica (PFB)] são apresentados na Tabela 1.

Com base nos valores de IC₅₀, verificou-se que as propriedades sequestradoras de radical livre ficaram concentradas no extrato etanólico, particularmente nas fases *n*-butanólica e acetato de etila.

Diversas amostras de própolis apresentam elevado potencial antioxidante, que tem sido atribuído aos compostos fenólicos (KUMAZAWA *et al.*, 2004), os quais podem estar concentrados nas fases orgânicas mais polares da partição do PEE (Fases PFA e PFB), conforme demonstrado pelos resultados obtidos na determinação de fenóis totais (item 5.3.).

De modo geral, os polifenóis possuem a estrutura ideal para o sequestro de radicais livres (BARREIROS *et al.*, 2006). Deste modo, a capacidade antioxidante dos polifenóis pode exercer efeitos protetores, por inibir ou estimular proteínas específicas por meio de sinalização celular em cascata.

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (µg/mL) obtidos no ensaio com DPPH para o extrato bruto da própolis e das fases obtidas da partição do extrato, valores superiores a 1000 µg/mL foram considerados inativos.

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato Hexânico	>1000
Fase hexânica	>1000
Fase diclorometânica	>1000
Extrato etanólico	532,17
Fase Acetato de etila	109,33
Fase Butanólica	38,78
Ácido Cafeico (Padrão)	3,47

5.3. Determinação de Fenóis Totais

Uma vez que as amostras de própolis são ricas em compostos fenólicos, muitos dos quais são responsáveis por sua ação sequestradora de radicais livres e, considerando-se o potencial antioxidante observado para o PEE e as fases PFA e PFB de sua partição, decidiu-se avaliar o teor de fenóis totais das amostras estudadas.

A determinação de fenóis totais foi realizada de acordo com o método de Folin–Ciocalteu (item 4.8). Utilizou-se o ácido gálico como padrão e o teor de fenóis foi expresso como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

A equação da curva de calibração do ácido gálico (EAG) foi $C = 0,12147A + 0,00443$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$ (Figura 22).

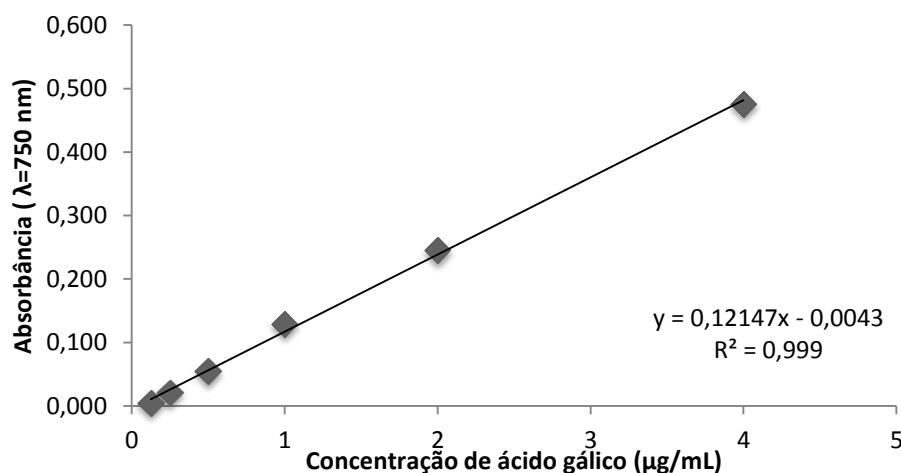


Figura 22 - Curva padrão obtida a partir do ácido gálico para determinação do teor de fenóis totais da própolis sul-matogrossense.

O PEE apresentou teor de compostos fenólicos de $194 \pm 21,75$ mg de EAG/g. Além disso, o teor de fenóis aumentou ao longo das partições do PEE, com destaque para as fases acetato de etila ($342,64 \pm 23,22$ mg de EAG/g) e *n*-butanólica ($348,12 \pm 25,36$ mg de EAG/g) (Figura 23). O teor de fenóis do extrato etanólico foi superior ao de fenóis totais determinados pelo mesmo método de extratos de própolis brasileiras de outras regiões. Estas amostras apresentaram variação de 22,26 mg de EAG/g (CASTRO *et al.*, 2007) à 105,08 mg de equivalentes de EAG/g (MELLO *et al.*, 2010).

A elevada presença de compostos fenólicos detectada, no presente trabalho, na amostra de própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul é um dado significativo, pois muitas substâncias dessa classe de metabólitos secundários podem apresentar potencial anticarcinogênico (LOHMAN *et al.*, 2001).

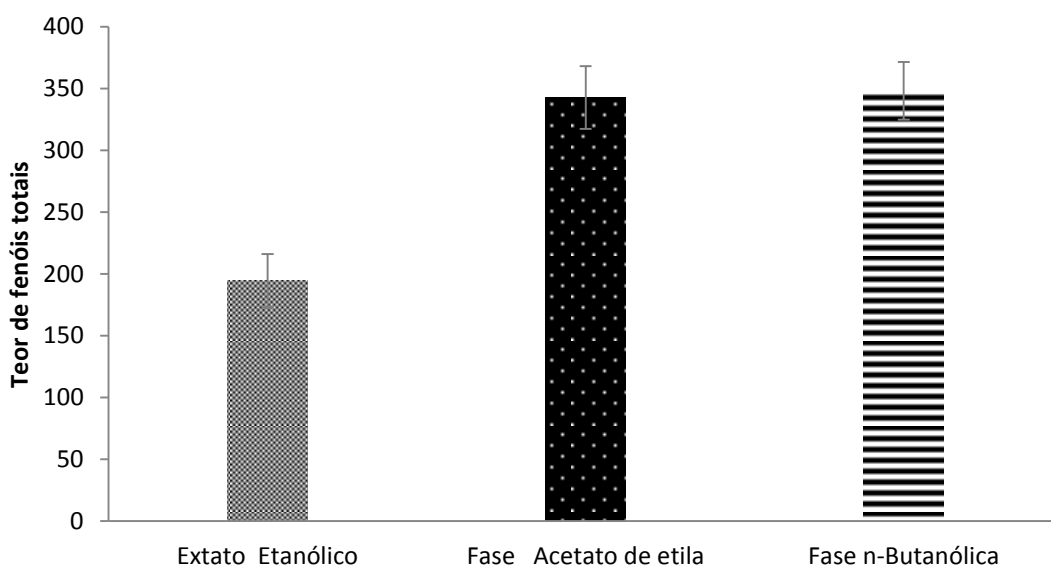


Figura 23 - Conteúdo de fenóis totais (FT) das amostras analisadas. Os valores foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

5.4. Avaliação da atividade genotóxica e/ou antigenotóxica

5.4.1. Avaliação da atividade genotóxica dos extratos hexânico (PEH) e etanólico (PEE)

O perfil genotóxico da amostra de própolis em estudo começou a ser delineado pela avaliação dos extratos etanólico (PEE) e hexânico (PEH). O teste

SMART/asa permite avaliação confiável, sendo esta metodologia usada para investigar a genotoxicidade de várias classes de substâncias (REZENDE *et al.*, 2009; SANTOS-CRUZ *et al.*, 2012)

Os resultados para ambos os cruzamentos (ST e HB) tratados com o PEH e o PEE (3,0, 6,0 e 12 mg/mL) não indicaram genotoxicidade nas concentrações testadas.

A ausência de genotoxicidade para o PEH pode estar relacionada à presença de fenilpropanoides prenilados, como a artepilina C identificada neste extrato (item 5.1.1.1.2.), visto que essa substância reduz danos genéticos (NETO *et al.*, 2011).

Em relação ao PEE, o resultado negativo para atividade genotóxica, aliado aos valores obtidos pelo teste de atividade antirradicalar (IC_{50} 532,17 μ g/mL) e teor de fenóis totais ($194,45 \pm 21,75$ mg EAG/g de PEE) os quais indicam potencial antioxidante, subsidiaram sua avaliação antigenotóxica.

5.4.1. Avaliação da atividade antigenotóxica do extrato etanólico (PEE)

Para o cotratamento com o extrato etanólico (PEE) (0,375, 0,75 e 1,5 mg/mL), foi utilizado o agente mutagênico cloridrato de doxorrubicina (DXR, 0,125 mg/mL), uma vez que esta substância tem apresentado resultados satisfatórios no teste SMART/asa para avaliações de atividade antigenotóxica (REZENDE *et al.*, 2009; VALADARES *et al.*, 2008).

A ocorrência de menores valores de frequência de mutações no tratamento com PEE associado à DXR indica que o extrato etanólico (PEE) reduz danos genéticos causados pela DXR, nos descendentes do cruzamento ST.

Esse efeito parece mediado por substâncias antioxidantes. De fato, esse extrato apresentou uma atividade antirradicalar significativa e alto teor de compostos fenólicos, os quais podem reduzir radicais livres gerados pela DXR (BENCHEKROUN *et al.*, 1993).

Considerando o cruzamento de alta bioativação (HB), os efeitos protetores do PEE frente ao agente mutagênico DXR foram observados apenas na menor concentração avaliada (0,375 mg/mL). Nas demais concentrações a ação inibitória não foi observada, pelo contrário, nas maiores concentrações as amostras do PEE foram genotóxicas.

Nesse contexto, os resultados do presente estudo revelam substâncias com a característica “Janus”, termo utilizado para designar substâncias que se comportam como agentes genotóxicos ou antígenotóxicos dependendo dos tipos celulares ou doses utilizadas (VON-BORSTEL; HIGGINS *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram obtidos por Tavares e colaboradores (2006), os quais observaram o fenômeno “Janus” no extrato etanólico da própolis verde, de modo que a menor concentração inibiu as lesões causadas pela DXR, enquanto que nas maiores houve aumento de danos genéticos.

Esse efeito é possível devido à capacidade de substâncias antioxidantes, como é o caso dos polifenóis, de se tornarem pró-oxidantes (CASTRO *et al.*, 2008). Compostos com atividade antirradicalar podem apresentar atividade antimutagênica devido a sua capacidade de sequestrar radicais livres, a qual é o mais importante mecanismo de antimutagenicidade (DE FLORA, 1998). Por outro lado, os efeitos pró-oxidantes dos flavonoides, onde muitos dos quais possuem hidroxilas fenólicas tem sido relatados, os quais seriam responsáveis por danos no DNA em concentrações elevadas (MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos da própolis também foram relatados por Pereira e colaboradores (2008) como sendo os responsáveis por efeitos mutagênicos nas células sanguíneas de camundongos por meio de consumo agudo avaliado (nas concentrações de 1.000, 1.500 e 2.000 mg/kg) pelo teste de Micronúcleo e Cometa.

Além disso, esse efeito também parece ser simultâneo à ação das enzimas do citocromo P450. Realmente, o efeito característico da classe P450 sobre produtos químicos tóxicos é a oxidação de substâncias, como a nicotina (CASHMAN *et al.*, 1992) e ativação da aflotoxina (Figura 24). Assim, a oxigenação pode converter uma substância química inofensiva em um composto carcinogênico (VON-BORSTEL; HIGGINS *et al.*, 1998).

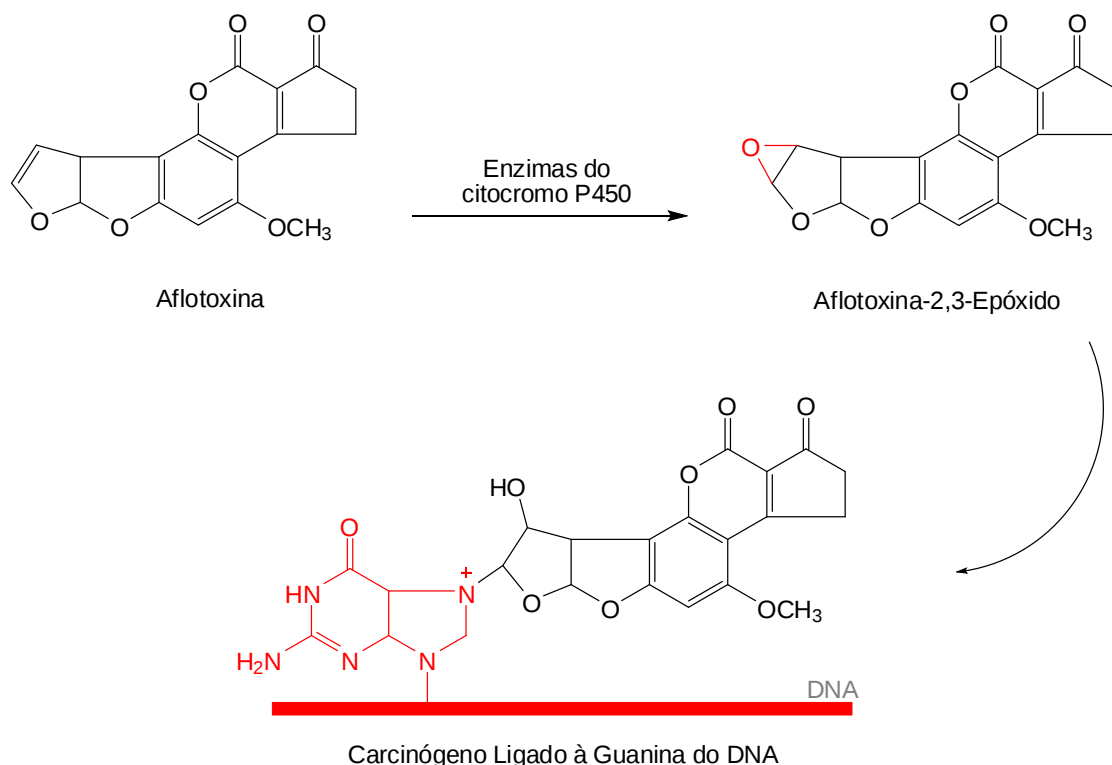


Figura 24 - Ativação do carcinógeno aflotoxina. Uma transformação metabólica ativa muitos carcinógenos químicos antes deles causarem mutações por reagirem com o DNA. O composto ilustrado é a aflotoxina B1, uma toxina de um fungo (*Aspergillus flavus oryzae*) (ALBERTS *et al.*, 2010).

5.4.2. Avaliação da atividade genotóxica da fase acetato de etila (PFA) e fase *n*-butanólica (PFB)

O resultado de antigenotoxicidade para o extrato etanólico PEE, aliado aos valores obtidos no ensaio relacionado à atividade antioxidante, nortearam o estudo de toxicologia gênica para as fases acetato de etila (PFA) e *n*-butanólica (PFB) provenientes do PEE.

Ambas as fases não apresentaram genotoxicidade quando comparadas ao controle negativo nos ensaios realizados com ambos os cruzamentos ST e HB.

Um fato que deve ser notado é a redução de frequências de mutações em quase todas as concentrações, quando comparadas ao grupo controle negativo para as duas fases (PFA e PFB). Essa redução de mutações basais (observadas nos indivíduos do controle negativo) pode estar associada ao potencial antioxidante dos componentes presentes nestas amostras.

Com base nos resultados, ambas as fases PFA e PFB foram submetidas à avaliação de suas possíveis propriedades antimutagênicas.

5.4.3. Avaliação da atividade antigenotóxica da fase acetato de etila (PFA)

Nos descendentes do cruzamento ST tratados com a menor concentração (0,69 mg/mL) foi observada atividade antigenotóxica estatisticamente significativa quando comparado com os tratados somente com DXR.

A presença dos ácidos fenólicos *p*-cumárico (item 5.1.1.2.1.1.), diidrocumárico (item 5.1.1.2.1.2.), cafeico (item 5.1.1.2.1.3.) e do flavonoide aromandendrina (item 5.1.1.2.1.4.) na PFA, assim como o potencial antioxidante apresentado por essa fase sustentam a ação antigenotóxica observada. Além disso, a literatura relata uma atividade antimutagênica para o ácido cafeico no teste SMART/asa (KAREKAR *et al.*, 2000) e também para a aromadendrina pelo teste de Ames (CHOI *et al.*, 1994).

Por outro lado, as maiores concentrações (1,37 mg/mL e 2,75 mg/mL) avaliadas do cruzamento ST e todas do HB, não apresentaram efeito protetor frente à DXR. Este resultado é similar ao apresentado pelo PEE, onde também houve ausência da correlação de dose-resposta, pois o aumento gradual da concentração de PFA não reduziu a os danos genéticos ocasionados pela DXR. De fato, elevadas concentrações de própolis (2.000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) causaram eventos de cito e genotoxicidade em linfócitos humanos avaliados por Montoro e colaboradores (2012). O evento de pró-oxidação sugerido para o extrato etanólico (PEE) também pode ser destacado para essa fase, assim como a bioativação de pró-mutágenos pelas enzimas do complexo P450 (VON-BORSTEL; HIGGINS *et al.*, 1998).

Por esse motivo, antes de estabelecer uma estratégia quimiopreventiva, é necessário conhecer sobre quais condições um componente é benéfico ou danoso ao genoma (TAVARES *et al.*, 2006).

5.4.4. Avaliação da atividade antigenotóxica da fase *n*-butanólica (PFB)

Ao avaliar a fase *n*-butanólica quanto a sua atividade genotóxica observou-se inibição de manchas mutantes estatisticamente significativa nos indivíduos avaliados pelo cotratamento em todas as concentrações da PFB, frente às duas linhagens ST e HB, sendo que a maior concentração (1,37 mg/mL) inibiu 79% das mutações provocadas pela DXR para o cruzamento ST.

De modo geral, estes resultados indicam uma correlação de dose-resposta. O efeito inibitório de clones mutantes foi proporcional ao aumento das concentrações da fase *n*-butanólica (PFB) para ambos os cruzamentos.

Existe mais um fator que deve ser notado, o elevado potencial inibitório da PFB no cruzamento HB. Essa atividade parece ser mediada pelas enzimas do complexo P450. Por meio da oxidação pelo P450, uma substância não tóxica pode se tornar anticancerígena (VON-BORSTEL; HIGGINS *et al.*, 1998).

Além disso, a menor concentração (0,345 mg/mL) inibiu 92,14% dos danos causados pela DXR. Nesse mesmo teste e cruzamento, Valadares e colaboradores (2008) observaram inibição de 26,6% na menor concentração avaliada (12,5 mg/mL) para o extrato aquoso da própolis verde.

Tais resultados podem estar correlacionados ao elevado teor de compostos fenólicos determinados nessa fase ($348,12 \pm 25,36$ mg EAG/g de PEE), assim como a sua significativa atividade antirradicalar ($IC_{50} = 38,78$ mg/mL), de maneira análoga aos resultados obtidos para a fase acetato de etila (PFA). Porém, diferentemente da PFA, as maiores concentrações da fase PFB testadas em ambas as linhagens ST e HB apresentaram atividade antigenotóxica significativa.

5.4.5. Avaliação da atividade genotóxica do ácido acetilisocuprêssico

Tendo em vista o grau de pureza e a quantidade obtida do ácido acetilisocuprêssico (item 5.1.1.1.1.), este diterpeno foi selecionado dentre os compostos isolados da própolis do presente trabalho para ser avaliado quanto à sua ação genotóxica frente a ambas as linhagens ST e HB.

No que se refere ao ensaio realizado com o cruzamento ST, o diterpeno ácido acetilisocuprêssico não apresentou efeito genotóxico nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1mg/mL. Entretanto, no cruzamento HB, este diterpeno apresentou genotoxicidade na maior concentração testada (1,0 mg/mL).

Estes resultados indicam que o ácido acetilisocuprêssico atua como um pró-mutágeno, o qual necessita da bioativação pelo mecanismo de oxidação realizado pelas enzimas do complexo P450 para ser genotóxico. Este é o primeiro relato sobre a atividade genotóxica deste composto. Em trabalhos anteriores, a literatura o

descrevia apenas como antibacteriano (POPOVA *et al.*, 2009) e citotóxico em células tumorais (BANSKOTA *et al.*, 1998).

5.4.6. Avaliação da atividade genotóxica do POE

No presente trabalho decidiu-se avaliar também o potencial genotóxico dos compostos voláteis da própolis, uma vez que, de acordo com o levantamento feito na literatura, não foram encontrados registros sobre a avaliação genotóxica do óleo essencial de própolis.

A avaliação genotóxica do óleo essencial da própolis foi realizada nas concentrações de 0,05, 0,1, e 0,2%. No cruzamento ST, as frequências de mutações obtidas nos indivíduos tratados com as três concentrações do POE indicam ausência de genotoxicidade, quando comparadas às frequências de clones mutantes observados nos indivíduos do controle negativo.

Outro fator que deve ser destacado no presente estudo se refere à ocorrência de menores valores de manchas mutantes, quando comparados aos do grupo controle, uma vez que este fato sugere que o óleo essencial da própolis reduz danos no material genético. Esse efeito parece ser mediado pelos constituintes majoritários identificados na amostra. De fato, de acordo com a literatura, os sesquiterpenos (+)-aromadendreno, avaliado pelo teste de Ames (GONÇALVES *et al.*, 2011), e o β -cariofileno testado no teste de Micronúcleos não possuem atividade genotóxica, sendo que este último atua como agente antígeno genotóxico no teste (DI SOTTO *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÕES

- Quanto à sua genotoxicidade, os extratos hexânico e etanólico, bem como as fases acetato de etila e *n*-butanólica resultantes da partição do extrato etanólico não apresentaram genotoxicidade no ensaio SMART/asa para ambos os cruzamentos (ST e HB).

- O extrato etanólico exerceu efeito protetor com relação à ação genotóxica da doxorubicina na linhagem ST em todas as concentrações avaliadas. No entanto, no cruzamento HB este extrato foi genotóxico nas maiores concentrações, o que sugere a presença de substâncias, as quais, após metabolização, exercem efeito Janus.

- A fase *n*-butanólica proveniente da partição do extrato etanólico apresentou efeito antigenotóxico significativo (dose-resposta) em ambas as linhagens ST e HB.

- A ação inibitória apresentada pelo extrato etanólico (na linhagem ST) e pela fase *n*-butanólica (nas linhagens ST e HB) provavelmente está relacionada às suas propriedades sequestradoras de radical livre (avaliadas através do ensaio quantitativo com DPPH) e à sua quantidade de fenóis totais.

- A fase acetato de etila somente apresentou atividade antigenotóxica na linhagem ST e apenas na menor concentração, sem correlação de dose-resposta, sugerindo a pró-oxidação de seus constituintes pelas enzimas do complexo P450.

- O estudo químico do óleo essencial da própolis resultou na identificação através de CG/EM de 20 componentes, na sua maioria hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo os constituintes principais (E)-cariofileno, δ -cadineno, espatulenol e *allo*-aromadendreno. Dois destes componentes, os alcoóis sesquiterpênicos *trans*-nerolidol e espatulenol, foram também isolados e caracterizados após fracionamento cromatográfico do óleo essencial.

- O óleo essencial da própolis não apresentou genotoxicidade para o cruzamento ST, sendo os resultados obtidos sugestivos de redução de danos no material genético.

- O estudo dos constituintes fixos da própolis resultou no isolamento e caracterização de duas substâncias do extrato hexânico (o fenilpropanoide artepilina C e o diterpeno ácido acetilisocuprêssico), quatro substâncias da fase acetato de etila resultante da partição do extrato etanólico (os fenilpropanoides ácidos cumárico, diidrocumárico, cafeico e o flavanonol aromadendrina) e uma do resíduo aquoso da extração do óleo essencial (o triterpeno 3-*epi*-lupeol). A ocorrência deste triterpeno em própolis está sendo relatada pela primeira vez.

- Na avaliação dos efeitos genotóxicos do ácido acetilisocuprêssico, verificou-se que este diterpeno não foi genotóxico para o cruzamento ST, porém

apresentou genotoxicidade na maior concentração testada (1,0 mg/mL) frente ao cruzamento HB. Estes resultados indicam que o ácido acetilisocuprêssico atua como um pró-mutágeno, necessitando de bioativação pelas enzimas do complexo P450 para exercer sua ação genotóxica. Trata-se do primeiro relato de genotoxicidade do ácido acetilisocuprêssico.

Os resultados obtidos deste estudo, além de contribuírem para o conhecimento da composição química de uma amostra de própolis de uma região ainda não investigada, fornecem subsídios para pesquisas futuras sobre a própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul e/ou de seus constituintes químicos como candidatos promissores a novos agentes anticâncer.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM SK. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*. 1994; 9(4):383–386.

ADAMS RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 4th Edition; 2009. p.804.

AGA H, SHIBUYA T, SUGIMOTO T, KURIMOTO M, NAKAJIMA S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1994; 58(5):945-946.

AKIHISA T, FRANZBLAU SG, UKIYA M, OKUDA H, ZHANG F, YASUKAWA K, SUZUKI T, KIMURA Y. Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae flowers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005; 28(1):158-160.

ALBERTS B, LEWIS J, RAFF MC. *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

ALBUQUERQUE IL, ALVES LA, LEMOS TLG, MONTE FJQ, BRAZ-FILHO R. 2007. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. *Química Nova*. 2007; 30(4):828-831.

ALBUQUERQUE IL, ALVES LA, LEMOS TLG. Constituents of the essential oil of brazilian green propolis from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*. 2008; 20(5):414-415.

ALENCAR SM, AGUIAR CL, PAREDES-GUZMÁN J, PARK YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. 2005; 35(4):909-915.

AN SM, LEE SI, CHOI SW, MOON SW, BOO YC. *p*-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quelpaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-

melanocyte stimulating hormone. *British Journal of Dermatology*. 2008; 159(2):292-299.

BANKOVA V, CHRISTOV R, KUJUMGIEV A, MARCUCCI MC, POPOV S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung - C*. 1995; 50(3-4):167-172.

BANKOVA V, MARCUCCI MC, SIMOVA S, NIKOLOVA N, KUJUMGIEV A, POPOV S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1996; 51(5-6):277–280.

BANKOVA VS, CHRISTOV RS, TEJERA AD. Lignans and other constituents of propolis from the canary islands. *Fitoterapia*. 1998; 49(5):1411–1415.

BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S, MARCUCCI MC, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*. 1999; 70(2):190–193.

BANSKOTA AH, TEZUKA Y, PRASAIN JK, MATSUSHIGE K, SAIKI I, KADOTA S. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*. 1998; 61(7):896-900.

BANSKOTA AH, TEZUKA Y, ADNYANA IK, MIDORIKAWA K, MATSUHIGE K, MESSAGE D, HUERTAS AAG, KADOTA S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72(1)239-246.

BARILIAK IR, BERDYSHEV GD, DUGAN AM. The antimutagenic action of apiculture products. *TSitologiya i genetika*. 1996; 30(6):48-55.

BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006; 29(1):113-123.

BENCHEKROUN MN, SINHA BK, ROBERT J. Doxorubicin-induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. *FEBS Letters*. 1993; 326(1-3):302-305.

BIER E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature*. 2005; 6(1):9-23.

BLOIS MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958; 181:1199-1200. IN: YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, TERAOKA J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry*. 1998; 62(6):1201-1204.

BOUGATSOS C, NGASSAPA O, RUNYORO DK, CHINOU IB. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2004; 59(5-6):368-372.

BURIOL L, FINGER D, SCHMIDT EM, SANTOS JMT, ROSA MR, QUINÁIA SP, TORRES YR, SANTA HSD, PESSOA C, MORAES MO, COSTA-LOTUFO LV, FERREIRA PMP, SAWAYA ACHF, EBERLIN MN. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*. 2009; 32(2):296-302.

CAMPOS VAC, JÚNIOR HMS, OLIVEIRA DF, CARVALHO HWP, MACHADO ART, TIRELLI AA. Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011; 35(6):1043-1049.

CASHMAN JR, PARK SB, YANG ZC, WRIGHTON SA, JACOB P, BENOWITZ NL. Metabolism of Nicotine by Human Liver Microsomes: Stereoselective Formation of trans-Nicotine N'-Oxide. *Chemical Research in Toxicology*. 1992; 5(5):639-646.

CASTALDO S, CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002; 1:1-6.

CASTRO AJ, GRISOLIA CK, DE ARAÚJO BC, DIAS CD, DUTRA ES, NEPOMUCENO JC. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Genetics and Molecular Research. 2008; 7(4):1375-1383.

CASTRO ML, CURY JA, ROSALEN PL. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. Química Nova. 2007; 30(7):1512-1516.

CASTRO SL, HIGASHI KO. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Journal of Ethnopharmacology. 1995; 46(1):555-8.

CHANG R, PILÓ-VELOSO D, MORAIS SAL, NASCIMENTO EA. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008; 18(4):549-556.

CHOI JS, PARK KY, MOON SH, RHEE SH, YOUNG HS. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella assay system. Archives of Pharmacal Research. 1994; 17(2):71-75.

CHUNG TW, MOON SK, CHANG YC, KO JH, LEE YC, CHO G, KIM SH, KIM JG, KIM CH. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. The journal of the federation of american societies for experimental biology. 2004; 18(14):1670-1681.

ČIŽMÁRIK J, MATEL I. Examination of the chemical composition of propolis I. Isolation and identification of the 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. Experientia. 1970; 26(7):713.

CONSERVATION INTERNATIONAL. 2009. The biodiversity hotspots. Serviço de Referência. Disponível em: <<http://www.conservation.org>> Acesso em: 28 mar. 2012.

CROCI AN, CIOROIU B, LAZAR D, CORCIOVA A, IVANESCU B, LAZAR MI. HPLC evaluation of phenolic and polyphenolic acids from propolis. *Farmacia*. 2009; 57(1):52- 57.

DAPKUS J, MERELL DJ. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1977; 87(4):685-697.

DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PACHECO E, LIMA IB, ABREU J, PARK, YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce*. 2006; 89. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>. Acessado em novembro de 2011.

DE FLORA S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*. 1998; 402(1-2):151-158.

DI SOTTO A, MAZZANTI G, CARBONE F, HRELIA P, MAFFEI F. Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 2010; 699(1-2):23-28.

EL-HADYA FKA, HEGAZIB AG, WOLLENWEBER E. Effect of Egyptian Propolis on the Susceptibility of LDL to Oxidative Modification and its Antiviral Activity with Special Emphasis on Chemical Composition. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2007; 62(9-10):645-655.

ESTRADA GOD, SILVA JFM, ANTUNES OAC. Artepillin C: A Review. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2008;5(2):88-92.

FERESIN GE, ALEJANDRO T, GIMENEZD A, RAVELO AG, ZACCHINO S, SORTINO M, SCHMEDA-HIRSCHMANN G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 89(1)73–80.

FREI H, WÜRGLER FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*. 1988; 203(4):297-308.

FRÖLICH A, WÜRGLER FE. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*. 1989; 216(3):179-187.

FUNARI CS, PASSALACQUA TG, RINALDO D, NAPOLITANO A, FESTA M, CAPASSO A, PIACENTE S, PIZZA C, YOUNG MC, DURIGAN G, SILVA DH. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. *Phytochemistry*. 2011; 72(16):2052-2061.

GARCIA-BELLIDO A, MERRIAM JR. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*. 1971; 24(1):61-87. In: GRAF U, WÜRGLER FE, KATZ AJ, FREI H, JUON H, HALL CB, KALE PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*. 1984; 6(2):153-188.

GEKKER G, HU S, SPIVAK M, LOKENSGARD JR, PETERSON PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 102(2):158-163.

GHISALBERTI EL, JEFFERIES PR, LANTERI R, MATISONS J. Constituents of propolis. *Experientia*. 1978; 34(2):157-158. In: MARCUCCI MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 26(2):83-99.

GHISALBERTI EL. Propolis: A review. *Bee World*. 1979; 60(1):59-84. In: MARCUCCI MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 26(2):83-99.

GONÇALVES O, PEREIRA R, GONÇALVES F, MENDO S, COIMBRA MA, ROCHA SM. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence

on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. *Mutation Research*. 2011; 723(1):18-25.

GRAF U, SCHAİK NV. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 1992; 271(1):59-67.

GRAF U, SPANÓ MA, GUZMÁN-RINCÓN J, ABRAHAM SK, ANDRADE HH. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. *The African Newsletter on Occupational Health and Safety*. 1996; 6(1):9–13.

GRAF U, WÜRGLER FE, KATZ AJ, FREI H, JUON H, HALL CB, KALE PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*. 1984; 6(2):153-188.

GÜLÇİN I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 2006; 16;217(2-3):213-220.

GUZMÁN-RINCÓN J, GRAF U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH FM, CORKUM LD, GUZMÁN-RINCÓN J. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, 1995 p 169–181.

HÄLLSTRÖM I, BLANK A. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P450-dependent reactions. *Chemico-Biological Interactions*. 1985; 56(2-3):151-171. In: GRAF U, SCHAİK NV. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 1992; 271(1):59-67.

HAN XH, HONG SS, HWANG JS, LEE MK, HWANG BY, RO JS. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. Archives of Pharmacal Research. 2007;30(1):13-17.

HAYASHI K, KOMURA S, ISAJI N, OHISHI N, YAGI K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1999; 47(11):1521-1524.

HOET S, STÉVIGNY C, HÉRENT MF, QUETIN-LECLERCQ J. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. Planta Medica. 2006; 72(5):480-482.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ações da enfermagem para o controle do câncer; 2008. Disponível: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/index.asp>, Acessado em: 06/08/2012.

IOSHIDA MDM, YOUNG MCM, LAGO JHG. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Brazilian Propolis. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2010; 13(5):633-637.

ISLA MI, MORENO MI, SAMPIETRO AR, VATTUONE MA. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 76(2):165-70.

JEON SH, CHUN W, CHOI YJ, KWON YS. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. Archives of Pharmacal Research. 2008; 31(8):978-982.

JEONG C, JEONG HR, CHOI GN, KIM D, LEE U, HEO HJ. Neuroprotective and antioxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. Chinese Medicine. 2011; 6(25):1-9

KAREKAR V, JOSHI S, SHINDE SL. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test. Mutation Research. 2000; 468(2):183-94.

KIMOTO T, KOYA-MIYATA S, HINO K, MICALLEF MJ, HANAYA T, ARAI S, IKEDA M, KURIMOTO M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Virchows archiv.* 2001; 438(3):259-270.

KOO MH, PARK YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 1997; 61(2):367-369.

KUMAZAWA S, YONEDA M, SHIBATA I, KANAEDA J, HAMASAKA T, NAKAYAMA T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo).* 2003; 51(6):740-742.

KUMAZAWA S, HAMASAKA T, NAKAYAMA T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry.* 2004; 84(3):329–339.

LEHMANN M, VILAR KSP, FRANCO A, REGULY ML, DE-ANDRADE HHR. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2004; 43(4):250-257.

LEITÃO DP, FILHO AA, POLIZELLO AC, BASTOS JK, SPADARO AC. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2004; 27(11):1834-1839.

LI YJ, XUAN HJ, SHOU QY, ZHAN ZG, LU X, HU FL. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Human and Experimental Toxicology.* 2012; 31(2):157–165.

LINDSLEY DL, ZIMM GG. The Genome of *Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press; 1992. p1133. In: GRAF U, SPANÓ MA, GUZMÁN-RINCÓN J, ABRAHAM SK, ANDRADE HH. The wing somatic mutation and recombination test

(SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. The African Newsletter on Occupational Health and Safety. 1996;6(1):9–13.

LOHMAN PH, GENTILE JM, GENTILE G, FERGUSON LR. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. Mutation Research. 2001; 496(1):1-4.

MARCUCCI MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 1995; 26(2):83-99.

MARCUCCI MC, FERRERES F, GARCÍA-VIGUERA C, BANKOVA VS, DE CASTRO SL, DANTAS AP, VALENTE PH, PAULINO N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 74(2):105-112.

MARÓSTICA-JUNIOR MR, DAUGSCH A, MORAES CS, QUEIROGA CL, PASTORE GM, PARK YK. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2008; 28(1):178-181.

MATSUDA AH, ALMEIDA-MURADIAN LB. Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis. Phytochemical Analysis. 2008; 19(2):179-183.

MELLIU E, STRATIS E, CHINO I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. Food Chemistry. 2007; 103(2):375–380.

MELLO BCBS, PETRUS JCC, HUBINGER MD. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. Journal of Food Engineering. 2010;96:533–539.

MERSCH-SUNDERMANN V, KASSIE F, BÖHMER S, LU WQ, WOHLFAHRTH R, SOBEL R, BRUNN HE, ELISOHLY MA, ROSS SA, STAHL T. Extract of

Toxicodendron quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. Food and Chemical Toxicology. 2004; 42(10):1611-1617.

MISSIMA F, SILVA-FILHO AA, NUNES GA, BUENO PCP, SOUZA JPB, BASTOS JK, SFORCIN JM. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2007; 59(3):463–468.

MIYAZAWA M, NANKAI H, KAMEOKA H. Biotransformations of acyclic terpenoids, (+/-)-*trans*-nerolidol and geranylacetone, by *Glomerella cingulata*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996; 44(6):1543-1547.

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

MONTORO A, SORIANO JM, BARQUINERO JF, ALMONACID M, MONTORO A, VERDÚ G, SAHUQUILLO V, VILLAESCUSA JI, SEBASTIÀ N. Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. Food and Chemical Toxicology. 2012; 50(2):216-21.

MOREIRA IC, ROQUE NF, CONTINI K, LAGO JHG. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007; 17(1): 55-58.

NAFADY AM, EL-SHANAWANY MA, MOHAMED MH, HASSANEAN HA, NOHARA T, YOSHIMITSU H, ONO M, SUGIMOTO H, DOI S, SASAKI K, KURODA H. Cyclodextrin-enclosed substances of brazilian propolis. Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo). 2003; 51(8):984-985.

NETO MABM, LIMA IMS, FURTADO RA, BASTOS JK, FILHO AAS, TAVARES DC. Antigenotoxicity of artemisinin *in vivo* evaluated by the micronucleus and comet assays. Journal of Applied Toxicology. 2011; 31(8):714–719.

OLIVEIRA AP, FRANÇA HS, KUSTER RM, TEIXEIRA LA, ROCHA LM. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis essential oil. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2010; 16(1):121-130.

ORSOLIC N, BASIC I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 102(1) 37-45.

OTA C, UNTERKIRCHER C, FANTINATO V, SHIMIZU MT. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. Mycoses. 2001; 44(9-10):375-378

OWEN RW, HAUBNER R, MIER W, GIACOSA A, HULL WE, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. Food and Chemical Toxicology. 2003; 41(5):703-717.

PARK YK, IKEGAKI M, ALENCAR SM. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Mensagem Doce. 2000; 58(9):02-07.

PARK YK, ALENCAR SM, AGUIAR CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50(9):2502–2506.

PARK YK, PAREDES-GUZMAN JF, AGUIAR CL, ALENCAR SM, FUJIWARA FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of the southeastern Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004; 52(4):1100–1103.

PATEL D, SHUKLA S, GUPTA S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (Review). International Journal of Oncology. 2007; 30(1): 233-245.

PÍCULO F, GUIRALDELI MC, ANDRADE SF, MAISTRO EL. *In vivo* genotoxicity assessment of nerolidol. Journal of Applied Toxicology. 2010; 31(7):633–639

PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000; 63(7):1035-1042.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, AQUINO-NETO FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. 2002; 25(2):321-326.

PEREIRA AD, ANDRADE SF, OLIVEIRA-SWERTS MS, MAISTRO EL. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(7):2580-2584.

POPOVA MP, CHINOUBI IB, MAREKOV IN, BANKOVA VS. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*. 2009; 70(10):1262-71.

POPOVA MP, GRAIKOU K, CHINOUBI I, BANKOVA VS. GC-MS profiling of diterpenic compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(5):3167–3176.

PUAPAIROJ P, NAENGCHOMNONG W, KIJJOA A, PINTO MM, PEDRO M, NASCIMENTO MS, SILVA AM, HERZ W. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Medica*. 2005; 71(3):208-213.

REIS SRA, SADIGURSKY M, ANDRADE MGS, SOARES LP, ESPÍRITO SANTO AR, BOAS DSV. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2002; 16:221-225.

REZENDE AAA, GRAF U, GUTERRES ZR, KERR WE, SPANÓ MA. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47(7):1466-1472.

SALATINO A, FERNANDES-SILVA CC, RIGHI AA, SALATINO ML. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*. 2011; 28(5):925-936.

SALATINO A, TEIXEIRA EW, NEGRI G, MESSAGE D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2005; 2(1):33–38.

SANTOS-CRUZ LF, ÁVILA-ACEVEDO JG, ORTEGA-CAPITAINE D, OJEDA-DUPLANCHER JC, PERDIGÓN-MOYA JL, HERNÁNDEZ-PORTILLA LB, LÓPEZ-DIONICIO H, DURÁN-DÍAZ A, DUEÑAS-GARCÍA IE, CASTAÑEDA-PARTIDA L, GARCÍA-BORES AM, HERES-PULIDO ME. Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50(3-4):1082-1090.

SAWAYA AC, TOMAZELA DM, CUNHA IB, BANKOVA VS, MARCUCCI MC, CUSTODIO AR, EBERLIN MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*. 2004; 129(8):739-44.

SCHNITZLER P, NEUNER A, NOLKEMPER S, ZUNDEL C, NOWACK H, SENSCH KH, REICHLING J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*. 2010; 24(1):S20-28.

SFORCIN JM. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 113(1):1-14.

SHIMIZU T, HINO A, TSUTSUMI A, PARK YK, WATANABE W, KUROKAWA M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 2008; 19(1):7-13.

SILVA MSS, CITÓ AMGL, CHAVES MH, LOPES JAD. Triterpenoides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI. *Química Nova*. 2005; 28(5):801-804.

SIMÕES LM, GREGÓRIO LE, DA SILVA FILHO AA, DE SOUZA ML, AZZOLINI AE, BASTOS JK, LUCISANO-VALIM YM. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 94(1):59-65.

SOUSA CMM, SILVA HR, VIEIRA-JR GM, AYRES MCC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO MS, CHAVES MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. 2007a; 30(2):351-355.

SOUSA JPB, FURTADO NAJC, JORGE R, SOARES AEE, BASTOS JK. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17(1): 85-93.

ST. JOHN MAR, XU T. Insights from model systems. Understanding human cancer in a fly? *American Journal Human Genetics*. 1997; 61:1006-1010.

SUGIMURA T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science*. 1992; 258:603-607.

SUL D, KIM HS, LEE D, JOO SS, HWANG KW, PARK SY. Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation. *Life Sciences*. 2009; 84(9-10):257-262.

SZLISZKA E, CZUBA ZP, DOMINO M, MAZUR B, ZYDOWICZ G, KROL W. Ethanolic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. *Molecules*. 2009; 14(2):738-754.

TAVARES DC, MAZZARON BARCELOS GR, SILVA LF, CHACON TONIN CC, BASTOS JK. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology In Vitro*. 2006; 20(7):1154-1158.

TAZAWA S, WARASHINA T, NORO T, MIYASE T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1998; 46(10):1477-1479.

TEIXEIRA EW, MESSAGE D, NEGRI G, SALATINO A. Bauer-7-em-3-yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. *Química Nova*. 2006; 29(2):245-246.

TINCKOO S, RUSSEL S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Current Opinion Pharmacology*. 2002; 2(5):555-560.

TORRES RNS, LOPES JAD, MOITA-NETO JM, CITOAMGL. Constituintes voláteis de própolis piauiense. *Química Nova*. 2008; 31(3):479–485.

TUNG YT, CHUA MT, WANG SY, CHANG ST. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology*. 2008; 99(9):3908-3913

VALADARES BLB. Ação protetora da própolis contra efeitos genotóxicos do cloridrato de doxorubicina. 2000. Dissertação (Mestrado em Genética) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

VALADARES BLB, GRAF U, SPANÓ MA. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(3):1103–1110

VAUZOUR D, CORONA G, SPENCER JP. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010; 501(1):106-111.

VELIKOVA M, BANKOVA V, MARCUCCI MC, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung - C*. 2000; 55(9-10):785-789.

VON-BORSTEL RC, HIGGINS JA. Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research*. 1998; 402(1-2):321-329.

YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, TERAOKA J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry*. 1998; 62(6):1201-1204.

ZHANG X, XU JK, WANG J, WANG NL, KURIHARA H, KITANAKA S, YAO XS. Bioactive bibenzyl derivatives and fluorenones from *Dendrobium nobile*. *Journal of Natural Products*. 2007; 70(1):24-28.

ZIAEI A, RAMEZANI M, WRIGHT L, PAETZ C, SCHNEIDER B, AMIRGHOFRAH Z. Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytotherapy Research*. 2011; 25(4):557-562.