

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE
EXTRATOS RESINOSOS DE PRÓPOLIS VERMELHA OBTIDOS POR
LÍQUIDOS PRESSURIZADOS**

FELIPE MENDES DE ANDRADE DE CARVALHO

Aracaju
Janeiro 2019

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO
DE EXTRATOS RESINOSOS DE PRÓPOLIS VERMELHA OBTIDOS
POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS**

Pesquisa apresentada à banca examinadora
como requisito para obtenção do título de
Mestre na área de concentração em Saúde e
Ambiente.

FELIPE MENDES DE ANDRADE DE CARVALHO

Orientadores

**Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, PhD.
Silvana Vieira Floresta Gomes, PhD.**

Aracaju
Janeiro 2019

C331c Carvalho, Felipe Mendes de Andrade de
Caracterização e avaliação do efeito citotóxico de extratos resinosos
de própolis vermelha obtidos por líquidos pressurizados / Felipe Mendes de Andrade
de; orientação [de] Prof.º Dr.º Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Prof.
ª Dr.ª Silvana Vieira Floresta Gomes – Aracaju: UNIT, 2018.

60 f. il ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2018
Inclui bibliografia.

1. Extrato. 2. Própolis. 3. Antitumoral I. Carvalho, Felipe Mendes de
Andrade de. II. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de. (orient.). III.
Gomes, Silvana Vieira Floresta. (orient.) IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 606: 638.135: 615. 277

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS RESINOSOS DE PRÓPOLIS VERMELHA OBTIDOS POR LÍQUIDOS PRESSURIZADOS

Felipe Mendes de Andrade de Carvalho

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior
Orientador

Silvana Vieira Floresta Gomes
Orientadora

Francine Ferreira Padinha
Universidade Tiradentes

Laíza Canielas Krause
Universidade Tiradentes

Margarete Zanardo Gomes
Universidade Tiradentes (Suplente)

Aracaju

Janeiro 2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria neste momento de muita emoção onde estou quase me tornando Mestre, agradecer a todos que fizeram e fazem parte desta jornada.

Agradeço a meus amigos e familiares por todo apoio e suporte para chegar até aqui, meus avós, por sempre estarem ao meu lado e me proporcionarem o melhor.

Aos meus professores por me darem a honra de receber um pouco dos seus conhecimentos, agradeço a família LMPE em especial a Rose Nely que acompanhou toda minha trajetória de perto auxiliando nas minhas vitórias e conquistas.

As professoras Francine Ferreira Padilha e Laíza Canielas Krause, por aceitarem fazer parte desta importante etapa da minha vida trazendo contribuições importantes para o desenvolvimento do meu trabalho, serem partes fundamentais na idealização e execução dos processos metodológicos, por toda disponibilidade em me receber para tirar dúvidas e me auxiliar nos momentos em que mais precisei. Serei eternamente grato ao que as senhoras fizeram por mim e espero poder um dia retribuir.

Agradeço ao Jaderson por me acompanhar no processo da cromatografia me ensinando parte dos seus conhecimentos com paciência e atenção estando sempre disponível para contribuir com esta pesquisa.

Aos colegas no NUESC que também estiveram presente nesta importante etapa da pesquisa.

Não posso deixar de mencionar as professoras Cleide Mara, Patrícia Severino e Luciana Nalone, que foram fundamentais em diversas etapas da metodologia da minha pesquisa.

Aos professores Marcos Almeida, Luciana Holanda, Margarete Zanardo, Adriana Karla, Juliana Cardoso, Edna Aragão, Maria Nogueira, Andressa Coelho, Cláudia Moura, Rubéns Madi, Veronica Sierpe, Marлизete Maldonado, Rodrigo Fujimoto, Cristiane Cunha. Foram meus professores no curso do mestrado e são grandes professores da vida. Gostaria que os senhores soubessem que são minha maior referência e que o meu objetivo é um dia ser pelo menos parecido com as grandes pessoas que respeito e admiro

Agradeço as agências de fomento CAPES e FAPITEC pelo investimento, por propiciarem a execução deste estudo.

E por último, mas não menos importante, de todo coração agradeço aos meus orientadores, professora Silvana Floresta por estar sempre perto proporcionando os recursos indispensáveis para a pesquisa, e ao professor Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, meu orientador desde a iniciação científica que incentiva e encoraja seus alunos no campo da ciência a se destacarem por suas capacidades. Obrigado professor por representar um exemplo profissional a ser seguido.

SUMÁRIO

RESUMO/ ABSTRACT	viii
RESUMO	ix
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 Câncer	16
3.1.2 Tratamentos mais frequentes para o câncer	16
3.2 Substâncias Naturais e Câncer	17
3.3 Própolis vermelha	19
3.6 Extração.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção da própolis vermelha	24
4.2 Processamento da amostra	24
4.3 Extração por líquidos pressurizados	24
4.3.1. Análise dos dados.....	26
4.4 Avaliação do rendimento.....	26
4.5 Cromatografia gasosa bidimensional acoplada à espectrometria de massas (CG/MS).....	27
4.6 Avaliação da citotoxicidade	27
4.6.1 Análise dos dados.....	28
4.6.2 Análise estatística	29
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 Desenvolvimento do método de extração no ASE™ 100	31

6.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)	35
6.3 Avaliação do efeito citotóxico dos extratos da própolis vermelha utilizando o ensaio colorimétrico MTT	46
7 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	53

RESUMO/ ABSTRACT

RESUMO

Entre as neoplasias malignas o câncer de cólon e o câncer de próstata estão entre os mais frequentes no Brasil, essas patologias acometem milhões de brasileiros todos os anos. Este fator incentiva pesquisas relacionadas ao tratamento adjuvante com a utilização de produtos naturais. Dentre eles, destaca-se a própolis vermelha, material resinoso de origem vegetal, sintetizado pelas abelhas da família *Appis mellifera*, possuem diversos compostos químicos que frequentemente apresentam atividades biológicas. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um método de extração utilizando a extração por líquidos pressurizados para obtenção de compostos com baixa polaridade da própolis vermelha com potencial atividade citotóxica. Para isto, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , com o intuito de avaliar as influências das variáveis independentes ou fatores (temperatura, nº de ciclos, e tempo de extração) em relação a variável dependente (resposta) que corresponde ao rendimento (%). Os extratos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) para a identificação dos compostos químicos, e para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio colorimétrico MTT em diferentes linhagens de células tumorais (HCT116 e PC3). Os resultados mostram que o extrato 5 obtido a partir de 70 °C e 1 ciclo de extração de 10 min apresentou forte atividade citotóxica frente as linhagens celulares testadas. A análise por CG/MS revelou a presença de hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, éteres e terpenos como lupeol, lupenona e o acetato de lupeol na maioria dos extratos. Contudo, foi possível concluir que o maior rendimento não significou a maior atividade citotóxica e que as condições ótimas de extração estão relacionadas a temperatura de 70 °C.

Palavras-chave: Extração; Própolis; Antitumoral.

ABSTRACT

Among malignant neoplasms, colon cancer and prostate cancer are among the most frequent in Brazil, these pathologies accompany millions of Brazilians every year. This incentive factor is related to the adjuvant treatment with the use of natural products. Among them, a red propolis, a resinous material of vegetal origin, synthesized by the bees of the *Apis mellifera* family, as well as the basic sources of biological resources stands out. Therefore, this is an extraction method used for pressurized extraction for the choice of components with the polarity of the red propolis with potential cytotoxic activity. In order to evaluate the influences of life variables or factors (temperature, number of cycles, and extraction time) in relation to a dependent variable (response), this study is a factorial planning in 2^3 . The extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) for the determination of chemical compounds, and for the evaluation of cell viability, the MTT colorimetric assay in different tumor cell lines (HCT116 and PC3). The results show that the extract 5 obtained from 70 °C and 1 cycle of extraction of 10 min presents strong cytotoxic activity in front like cell lines tested. GC/MS analysis is a presence of hydrocarbons, alcohols, ketones, esters and terpenes such as lupeol, lupenone and lupine acetate in most extracts. It was not possible to conclude what a large non-significant yield is and have an activity greater than the temperature of 70 ° C.

Keywords: Extraction; Propolis; Antitumor.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos e acomete a humanidade (BOSE *et al.*, 2017; FAKHRY *et al.*, 2017; SIEGEL *et al.*, 2017; POST *et al.*, 2018). Por se tratar de neoplasias que tendem a ser incontroláveis e agressivas, o Ministério da Saúde (MS), encoraja e incentiva pesquisas relacionadas ao controle, cura e qualidade de vida dos portadores, este fator agregado a elevada incidência nacional atrai a atenção das pesquisas direcionadas à neoplasia (BRASIL, 2009).

Avaliou-se o surgimento de aproximadamente 21,7 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo até 2030 (ZAIDI, 2019). No Brasil, foram estimados 314,55 novos casos em homens e 292,74 em mulheres para cada 100.000 habitantes para o ano de 2018 (INCA, 2018). Para cura ou controle do câncer alguns tratamentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia são os mais utilizados (SCHILDMANN, 2019). Estes consistem na remoção do tecido tumoral e adjacentes e interrupção do ciclo de replicação de células tumorais e não tumorais causando efeitos como diarreia, perda de cabelo, mucosites, imunodepressão, náuseas e vômito, podendo afetar a qualidade de vida dos pacientes (VAN EENBERGEN *et al.*, 2019).

Estima-se que boa parte da população de países em desenvolvimento faz uso de produtos derivados da natureza. Estes são utilizados por oferecerem efeitos promissores no tratamento de diversas doenças podendo provocar menores danos ao organismo e facilidade de aquisição (LI *et al.*, 2017).

Atualmente existe uma variedade de própolis como a verde, amarela, marrom e vermelha, esta é considerada um substrato natural produzido a partir da seiva de plantas nativas de manguezais, por este motivo distingue-se sua coloração de aspecto avermelhado. Estudos com os extratos de alta polaridade frequentemente apresentam atividades antimicrobiana (BUENO-SILVA *et al.*, 2017), anti-inflamatória (COLINA-COCA *et al.*, 2017), antioxidante (PELLATI *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2016; COLINA-COCA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017) cicatrizante (CORRÊA *et al.*, 2017) e antitumoral (RIBEIRO *et al.*, 2015; FROZZA *et al.*, 2017).

No estudo realizado por Nunes *et al.* (2009) foi demonstrado que, além das substâncias químicas obtidas por solventes de alta polaridade como compostos fenólicos, amostras de própolis vermelha também apresentam considerável quantidade de constituintes de baixa polaridade, como terpenos, *n*-alcanos, δ -cardinol e *trans*-anatól. Alguns destes compostos, como sesquiterpenos, apresentaram atividade antitumoral *in vitro* (ALARIF *et al.*, 2012).

O método de extração com líquidos pressurizados também pode ser utilizado para obtenção de compostos de baixa polaridade da própolis (BISCAIA; FERREIRA, 2009; MONROY *et al.*, 2018). Essa extração se destaca por utilizar solvente sob alta pressão permitindo maior dessorção do analito presente na matriz, podendo utilizar diversos solventes, sendo um processo rápido que conseqüentemente promove menor exposição do profissional aos solventes orgânicos podendo ser considerada uma tecnologia verde de extração, oferecendo extratos mais seletivos. Este processo consiste na passagem acelerada do solvente em estado transitório entre vapor e gás por toda amostra inerte, promovendo o arraste de uma diversidade de compostos (MONROY *et al.*, 2018).

Neste contexto, estudos com a porção de baixa polaridade da própolis vermelha são escassos, tornando pesquisas importantes para o conhecimento dos compostos presentes e suas atividades biológicas, podendo favorecer para o desenvolvimento de novas terapêuticas obtidas a partir de tecnologias menos agressivas ao meio ambiente.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o efeito de extratos de baixa polaridade da própolis vermelha obtidos por líquidos pressurizados sobre diferentes linhagens de células tumorais.

2.2 Específicos

- Desenvolver um método de extração de compostos de baixa polaridade da própolis vermelha utilizando líquidos pressurizados;
- Caracterizar quimicamente os extratos da própolis vermelha (EPV) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS);
- Investigar a atividade citotóxica dos EPV contra as linhagens tumorais PC3 e HCT116.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer

É caracterizado por um conjunto de doenças que tem em comum a replicação de células anormais de forma descontrolada que pode se difundir para outros tecidos provocando processos de formação tumoral (SIEGEL *et al.*, 2017).

No estudo realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que no ano de 2018 novos casos da neoplasia em homens atingem cerca de 300.140 provocando o óbito de 107.470 deles, enquanto nas mulheres, os novos casos chegam a 282.450 com a neoplasia e 90.228 casos de óbitos (INCA, 2018). Tornando o Brasil um dos países de maior incidência de câncer no mundo, este fator é atribuído aos hábitos alimentares ricos em comidas industrializadas, obesidade fatores genéticos e sedentarismo (PANIS *et al.*, 2018).

Esta neoplasia atinge a humanidade causando impactos socioeconômicos provocados pelo elevado índice de morbidade, avaliando que os tratamentos utilizados geram custos aos sistemas de saúde, pesquisas e produtos para tratamento ou prevenção de menores custos são incentivados a fim de minimizar os impactos gerados (SIEGEL *et al.*, 2017).

Além do custo elevado, os métodos convencionais de tratamento dispõem de substâncias e métodos potencialmente agressivos que muitas vezes são efetivos na atuação contra o câncer, mas podem trazer danos cumulativos agudos e/ou crônicos ao paciente influenciando na mobilidade implicando no mecanismo social e econômico (SCHEIN *et al.*, 2006; COSTA; SILVA, 2017).

3.1.2 Tratamentos mais frequentes para o câncer

Dentre as modalidades de tratamentos frequentemente utilizados para o controle e cura do câncer, destaca-se a quimioterapia antineoplásica e a radioterapia. A quimioterapia foi desenvolvida em 1946 utilizando agentes químicos provenientes do gás mostarda usado na segunda guerra mundial. Atualmente, com evoluções da ciência, a quimioterapia se tornou menos tóxica e mais eficaz, porém ainda gera danos cumulativos às células sadias, podendo causar efeitos deletérios precoces (0 à 3 dias), como vômitos, náuseas e inquietação; imediatos (7 à 21 dias) como, anemia, mucosites e cistites hemorrágicas; tardios (meses) como, alopecia, miocardiopatia e pneumonite; e ultratardios (meses ou anos) como, infertilidade, carcinogênese, mutagênese e sequelas no sistema nervoso

central, o que torna esse tratamento agressivo quando avaliado a curto e longo prazo (SCHEIN *et al.*, 2006).

A radioterapia, por sua vez, utiliza feixes de radiação direcionados afetando todas as células do campo de tratamento, atingindo também células vizinhas não acometidas pela neoplasia podendo causar prejuízos sintomáticos como náuseas, diarreia, perda de cabelo, alterações nas taxas sanguíneas, sintomas de gripe, reações cutâneas podendo ocasionar a apoptose (PAIVA *et al.*, 2010). Frente aos efeitos tóxicos e degenerativos causados pelos tratamentos descritos acima, é crescente a busca por tratamentos alternativos para melhoria da qualidade de vida do paciente portador de câncer (SAMPAIO; COSTA, 2013; COSTA; SILVA, 2017).

3.2 Substâncias Naturais e Câncer

A utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças é considerada uma das aplicações terapêuticas mais tradicionais e consolidadas do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), moléculas com princípios ativos podem ser encontradas em produtos naturais que se tornam importantes para os avanços farmacológicos e criação de novas substâncias, podendo ser úteis de forma direta como agente terapêutico ou como precursores para síntese de bioprodutos (BRASIL, 2009).

Pesquisas recentes comprovam que o uso de produtos naturais para finalidades curativas e preventivas vem aumentando (ZENI *et al.*, 2017; A'ATTIYYAH *et al.*, 2017). Alguns fatores como aspectos culturais, econômicos ou sociais contribuem para o aumento das buscas por substratos naturais com efeito terapêutico, a utilização destes produtos está difundida em grandes centros comerciais e regiões interioranas (ZENI *et al.*, 2017).

Em 2006, o Ministério da Saúde aprovou através da portaria N° 971, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no sistema único de saúde, a mesma reconhece a utilização de extratos naturais como um recurso terapêutico para a cura e tratamento de diversas doenças, através da aplicabilidade de diferentes formas farmacêuticas estimulando o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a inclusão social (BRASIL, 2009).

Não obstante, estudos na linha de produtos naturais demonstram que substratos de diferentes biologias podem ser efetivos para o tratamento antineoplásico e apresentam agentes potenciais para o desenvolvimento de bioprodutos efetivos (LUSTOSA *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2013; SAÚDE-GUIMARÃES *et al.* 2014; FROZZA *et al.*, 2017).

A prática da utilização de compostos advindos da natureza para cura do câncer é milenar. Os índios foram os pioneiros na cultura que até tempos modernos se propaga. Em tempos passados, índios americanos com o propósito curativo para o câncer de pele e verrugas veneras, faziam uso da mandrágora americana, isto devido a presença de um composto nomeado de podofilotoxina posteriormente descoberto. Consolidada a prática da utilização de produtos naturais, em 1958 foi evidenciada a presença de vinblastina e vincristina em *Catharanthus roseus*, também conhecida por vinca de Madagascar, estes compostos apresentaram potente atividade citotóxica, fazendo com que estes contribuíssem significativamente para o tratamento antineoplásico e a disseminação da prática da utilização de produtos naturais para esta finalidade (MANN, 2002).

3.2.1 Terpenos e atividade anticâncer

Atualmente diversos compostos químicos encontrados em produtos naturais estão sendo estudados no combate ao câncer, dentre eles destaca-se os compostos da classe dos terpenos, frequentemente identificados em óleos essenciais, são compostos químicos oriundos do metabolismo secundário de diversas espécies de planta (THOMPSON, 2005; SARMENTO-NETO *et al.*, 2016). E algumas atribuições biológicas como atividade antitumoral já podem ser encontradas na literatura. No estudo desenvolvido por Saúde-Guimarães *et al.*, (2014) foi possível avaliar que os compostos pertencentes a classe dos terpenos, demonstraram efeito antitumoral frente diferentes linhagem tumorais de câncer de cólon e reto, leucemia, câncer de ovário, renal e câncer de próstata. Neste sentido, o estudo referente a atuação dos terpenos em células HeLa da linhagem do colo de útero realizado por Wu *et al.*, (2009), demonstrou forte atividade inibitória do crescimento tumoral.

Alguns compostos químicos pertencentes a classe dos terpenos como lupeol, lupenona e acetato de lupeol também se mostraram eficaz no tratamento antineoplásico como agentes citotóxicos (FLORIANI *et al.*, 2003; PITCHAI *et al.*, 2014; AHMAD *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2017; NYABOKE *et al.*, 2018). Linhagens tumorais de carcinoma hepatocelular (HepG2), hibridoma de células B (A-431) e hepatoma (H-4IIE), carcinoma mucoepidermoide pulmonar (NCI-H292), carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma epidermoide de laringe (HEP-2), glioblastoma (U87MG), leucemia (CEM/ADR5000) e adenocarcinoma de cólon (HCT116) apresentaram inibição do crescimento frente a ensaios realizados com o lupeol (FLORIANI *et al.*, 2003; PITCHAI *et al.*, 2014; BASTOS *et al.*, 2017; NYABOKE *et al.*, 2018). Por outro lado, no estudo realizado por Mishra *et al.*, (2016) o acetato de lupeol demonstrou atividade citotóxica contra linhagens de carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de cólon (DLD-1), carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de

pâncreas (MIAPaCa-2), carcinoma de próstata (DU145), ovário (SK-OV-3), carcinoma de colo de útero (HeLa), carcinoma hepatocelular (PLC/PRF/5) e carcinoma renal (786-0, Caki-1). Neste sentido, o estudo realizado por Ahmad *et al.*, (2015), extratos com o terpeno lupenona apresentaram atividade citotóxica contra células MCF-7, HT-29 (cólon) e HeLa.

3.3 Própolis vermelha

A própolis vermelha é um conjunto de substâncias químicas provenientes de exsudados de brotos e botões de plantas coletadas por abelhas principalmente da espécie *Apis mellifera*. Este produto resinoso sofre uma reação enzimática na saliva das abelhas durante o transporte para a colmeia até serem sintetizadas em própolis. Na colmeia, a utilização da mesma serve principalmente como medida protetora, seja contra insetos maiores ou para microrganismos que podem contaminar o interior do habitat podendo comprometer a integridade estrutural quanto à oviposição da abelha rainha (BUENO-SILVA *et al.*, 2013; NOVAK *et al.*, 2014).

O uso popular deste produto é crescente, suas maiores atribuições a comunidade praticante da medicina alternativa são como, antimicrobianos, antitumoral, anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-leishmania (BUENO-SILVA, ALENCAR *et al.*, 2013; BUENO-SILVA, KOO *et al.*, 2013).

No estudo realizado por Ribeiro *et al.*, 2015, a utilização do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha foi eficaz na quimioprevenção e retardou a progressão da displasia epitelial induzida pelo DMBA em modelo experimental *in vivo* de carcinogênese labial, apresentando atividade antitumoral.

Neste mesmo sentido, Banskota *et al.* (1998), avaliaram o extrato metanólico da própolis brasileira obtido por extração aquosa que demonstrou perfil citotóxico considerável contra células de tumor de cólon, esta atividade foi atribuída devido ao elevado teor de compostos fenólicos presentes na amostra. Outros ensaios *in vitro* desta mesma amostra apresentou atividade antitumoral tanto citostática quanto citotóxica, reforçando o interesse das pesquisas com este produto natural para o controle e prevenção do câncer.

Em outro estudo mais recente realizado por Frozza *et al.* (2017), o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas obtido por maceração e posteriormente fracionado em clorofórmio, metanol, ácido acético e água Milli-Q, foi testado em carcinoma epitelial aderente de cólon uterino (HEP-2), demonstrou que as frações se destacaram frente ao extrato bruto apresentando potente atividade citotóxica no ensaio de viabilidade

celular (MTT), sendo este resultado relacionado a purificação das amostras fracionadas que pode diminuir a quantidade de compostos químicos e aumentar a concentração de bioativos.

Nunes *et al.* (2009), demonstraram que amostras de diferentes sazonalidade da própolis vermelha submetidas ao headspace dinâmico pôde apresentar alguns compostos de baixas polaridades a partir das técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia em camada delgada (CCD) como trans-anetol, α -copaeno, metil cis-isoeugenol, sesquiterpenóide, δ -cardinol, β -gurjuneno, isocariofileno e δ -cadineno, n-alcanos, monoterpénóide 1,8 cineol e o α -selineno, flavonóides, antraquinonas e terpenos como monoterpénos, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides.

Contudo, pesquisas relacionadas aos compostos de baixa polaridade da própolis vermelha são escassas, tendo em vista a quantidade de substâncias com atividade biológica presentes nos extratos obtidos por solventes não polares ou de baixa polaridade, estudos relacionados a esta porção da própolis vermelha tornam-se promissores para o conhecimento e identificação dos compostos químicos e suas atividades biológicas.

Modelos de extração para obtenção de compostos como terpenos requerem a utilização de solventes de baixa polaridade, isto devido a estrutura química do composto que também apresentam baixa polaridade. Este fator agregado a presença frequente em extratos apolares e óleos, justifica a necessidade da utilização de solventes de baixa polaridade para obtenção de extratos concentrados com terpenos e derivados (FLORIANI *et al.*, 2003; PITCHAI *et al.*, 2014; AHMAD *et al.*, 2015; BASTOS *et al.*, 2017; FROZZA *et al.*, 2017; NYABOKE *et al.*, 2018).

3.6 Extração

Os processos de extração mais comuns realizados com a própolis derivam de solventes de alta polaridade, como etanol (FROZZA *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2018; REGUEIRA-NETO *et al.*, 2018; RUFATTO *et al.*, 2018). Frente a isto, é frequente a obtenção de compostos de polaridade similar ao solvente utilizado devido ao arraste promovido pela afinidade entre o composto e o solvente.

No entanto, o método de extração para obtenção de compostos de baixa ou intermediária polaridade mais utilizado é por hidrodestilação pelo equipamento de Clevenger, resultando em um baixo rendimento e maior gasto de tempo (SENA-LOPES *et al.*, 2018). Enquanto, para obtenção de extratos ricos em compostos químicos de baixa polaridade, utiliza-se frequentemente o método de maceração com hexano como solvente

ou como co-solvente de fracionamento, resultando em um processo demorado com maior gasto e exposição do profissional aos solventes orgânicos (DAVID *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2018).

Em decorrência deste entrave, busca-se um método que potencialize e otimize o processo de extração e obtenção de compostos bioativos, permitindo maior seletividade, menor gasto com solvente, extração rápida e, conseqüentemente, diminuição da exposição do profissional e a contaminação ambiental. Entre os métodos de extração mais promissores, destaca-se a extração por líquidos pressurizados, este processo permite a realização de uma extração rápida dos analitos em um ambiente inerte sob alta pressão e temperatura as quais influenciam na eficiência do processo, garantindo maior seletividade dos substratos obtidos. Isso por que os solventes sob maior pressão permanecem em estado líquido, o que permite uma condição que favorece a interação analito-solvente, aumentando a solubilidade e a cinética de desorção dos compostos bioativos a partir das matrizes, o que diferencia a técnica dos demais métodos de extração comumente usados, como maceração, infusão, hidrodestilação por arraste e decocção (MIRON *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013).

Os processos de extração de compostos químicos alvos de amostras de própolis mais comumente utilizados são a extração por solventes como etanol, água, hexano, acetato de etila e clorofórmio. No entanto, esta técnica convencional tem algumas desvantagens, incluindo forte valor residual, possíveis reações adversas, prejudiciais ao meio ambiente, baixa qualidade do extrato e longo processo requisito de período. A extração sob altas pressões é uma técnica que vem sendo aplicada na extração, fracionamento, refinamento e desodorização de matrizes de amostras naturais em escala laboratorial e escala industrial, sendo o CO₂ supercrítico e etanol, usualmente utilizando como co-solvente, os compostos mais frequentemente utilizados neste processo extrativo (IDRUS *et al.*, 2018).

Entre os modelos de extração que utilizam a alta pressão, destaca-se a extração acelerada com solvente (ASE™), é um método que utiliza a alta pressão em ambiente fechado totalmente automatizado, possibilitando a determinação de variáveis como tempo, temperatura, quantidade de ciclos, pressão e solventes, permitindo extrações rápidas, podendo utilizar múltiplos solventes em menores quantidades garantindo a denominada tecnologia verde atribuída ao método (ANNUNCIAÇÃO *et al.*, 2018). Atualmente diversos estudos relacionados aos processos de obtenção de compostos bioativos fazem uso do ASE™, este recurso promissor promove o maior desempenho para desenvolvimento ou

otimização de modelos de extração de compostos químicos (ANNUNCIAÇÃO *et al.*, 2018; RAMIREZ-CADAVID *et al.*, 2018; AGUIAR *et al.*, 2018).

No estudo realizado por He *et al.*, (2018), foi possível avaliar a atividade antioxidante e o valor de compostos fenólicos totais de extratos de goji black berry obtidas a partir da extração acelerada com solvente, neste processo as variáveis como tempo (3 e 13 minutos) e temperatura (50 e 100 °C) foram aplicadas ao equipamento, solvente, pressão e número de ciclos (2) foram constantes. Os extratos obtidos demonstraram que o método de extração influenciou significativamente através das variáveis tempo e temperatura na obtenção de amostras concentradas de compostos fenólicos, o que consequentemente influenciou na elevada atividade antioxidante relatada.

Por outro lado, Ramirez-Cadavid *et al.*, (2018) com o objetivo de desenvolver um processo de extração otimizado com múltiplos solventes, utilizou o método de extração acelerada com solvente para melhorar a precisão da quantificação de compostos de baixa polaridade das raízes de *Taraxacum kok-saghyz*. Para isto foram selecionados solventes de polaridade decrescente como água, acetona e hexano, aplicadas as variáveis como, solvente, tempo e temperatura de extração, onde foi possível determinar as condições ótimas para obtenção dos compostos químicos.

Estes estudos contribuem para utilização da técnica na obtenção de extratos de diversas polaridades, podendo estes variar conforme a escolha dos solventes para o processo de extração, bem como, permite a aplicação de diversas variáveis avaliadas quanto as suas interações, possibilitando a determinação de modelos de extração ótimos com melhores repetibilidades.

Neste sentido, estudos com a utilização da técnica de extração acelerada com solvente utilizando o extrator ASE™, principalmente para obtenção de compostos de baixa polaridade da própolis vermelha são escassos, o que torna promissor os estudos relacionados a esta porção em particular, tanto para identificação dos compostos presentes quanto para suas aplicabilidades biológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da própolis vermelha

A própolis vermelha foi obtida do apiário Santo Antônio localizado no município de Barra de Santo Antônio, Alagoas, Brasil, sob as coordenadas 09° 24' 17" S 35° 30' 26", no mês de agosto de 2017.

4.2 Processamento da amostra

A própolis vermelha foi pesada, triturada por moinho de 4 facas e separadas frações de 16 mesh. Em seguida, a amostra foi armazenada em recipiente de polietileno vedado de forma hermética e refrigerado de 2 a 8 °C em geladeira.

4.3 Extração por líquidos pressurizados

O processo de extração (Fig. 1) foi realizado no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia (UFBA) em extrator Dionex ASE™ 100 (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA), utilizando cela extratora de aço inoxidável com capacidade de 34 mL, um frasco de lavagem (rinse) e frascos coletores de vidro transparente com capacidade de 250 mL.

Um planejamento fatorial completo 2^3 (**Tabela 1**) de três fatores (temperatura, número de ciclos e tempo de extração) e três níveis experimentais (ponto central) foi empregado para a definição da etapa de preparação do extrato, totalizando 11 ensaios. No estudo, os níveis foram codificados em nível mínimo (-1), ponto central (0) e máximo (+1). Executou-se o planejamento da **Tabela 2** e a resposta dos ensaios foi avaliada em termos de rendimento do extrato (%).

Tabela 1: Variáveis experimentais utilizados no Planejamento Fatorial Completo.

Fatores	Níveis		
	Valor mínimo (-)	Ponto central (0)	Valor máximo (+)
Temperatura	40 °C	55 °C	70 °C
Nº de ciclos	1	2	3
Tempo de extração	10	15	20

Para cada extrato, 10 g da própolis bruta foi inserida no interior da cela extratora, vedada de forma hermética e introduzida no equipamento. Foram ajustadas no equipamento de extração as variáveis, para todos extratos foi utilizada a pressão constante de 1450 psi (100 bar) exercida por pressurização pneumática por nitrogênio (N₂), *flushing* de 100%, purga de 60 s e hexano como solvente, seguindo metodologia de Gomes *et al*, (2017).

Tabela 2: Matriz de Planejamento Fatorial Completo 2³.

Ensaio	Nº Ciclos	Tempo (min)	T(°C)
1	-1 (1)	-1 (10)	-1 (40)
2	1 (3)	-1 (10)	-1 (40)
3	-1 (1)	1 (20)	-1 (40)
4	1 (3)	1 (20)	-1 (40)
5	-1 (1)	-1 (10)	1 (70)
6	1 (3)	-1 (10)	1 (70)
7	-1 (1)	1 (20)	1 (70)
8	1 (3)	1 (20)	1 (70)
9 (PC)	0 (2)	0 (15)	0 (55)
10 (PC)	0 (2)	0 (15)	0 (55)
11 (PC)	0 (2)	0 (15)	0 (55)

Posteriormente, cada extrato foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Evaporador Rotativo | RE-801-BW2) por 10 min, a 55 °C. Retirado do equipamento, o extrato foi levado para estufa de fluxo laminar por 72 h com temperatura constante de 45 °C. Dadas 72 h, os extratos secos passaram por uma balança de termogavimetria para determinação da umidade, em seguida foram armazenados em temperatura ambiente para aguardar avaliação do rendimento, caracterização química e avaliação citotóxica.

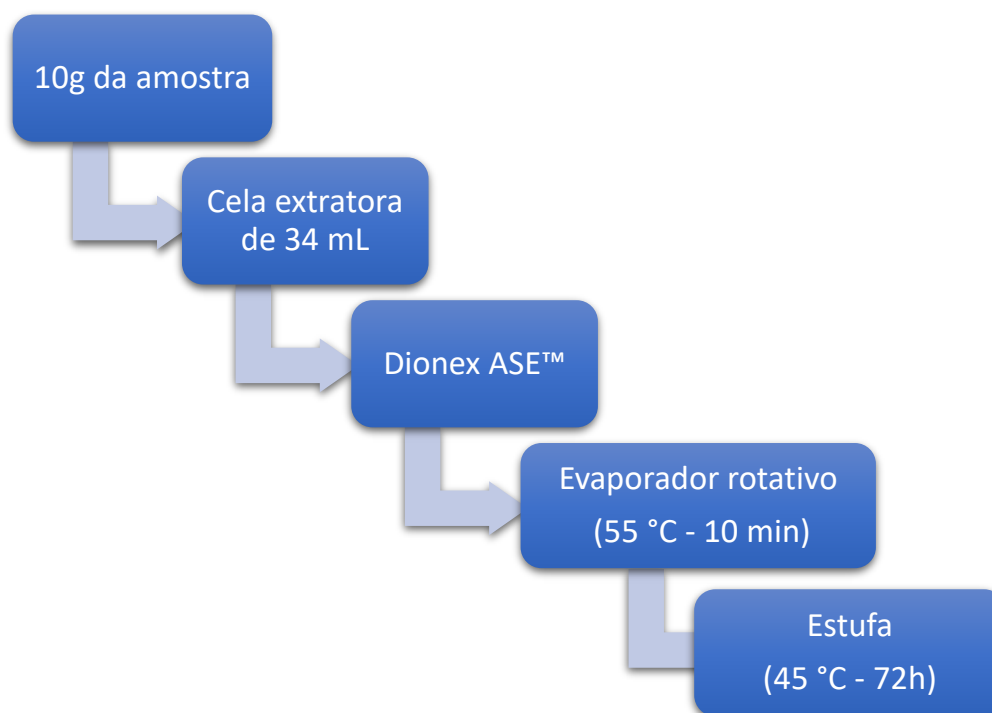


Fig. 1: Fluxograma de extração da própolis vermelha utilizando o método de extração por líquidos pressurizados.

4.3.1. Análise dos dados

O planejamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando-se o Software Statistica 7. A significância dos efeitos relacionados às variáveis estudadas foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) para cada resposta e os efeitos foram verificados utilizando-se os valores p. Valores de p menores que 0,05 indica que a variável é significativa dentro do domínio experimental estudado, com um nível de confiança de 95%.

4.4 Avaliação do rendimento

O rendimento do material extraído foi calculado com base no percentual de massa obtida, tendo como referência a massa inicial da própolis antes da extração e o material obtido após extração e eliminação do solvente, conforme equação abaixo.

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{MSE}}{\text{MI}} \times 100$$

Na qual:

MSE = massa do extrato (g);

MI = massa inicial (g).

4.5 Cromatografia gasosa bidimensional acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)

Os extratos de própolis vermelha (EPV - 50 mg) foram dissolvidos em 5 mL de hexano destilado em balão volumétrico de 5 mL (10.000 ppm). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros de nylon 0,45 µm e adicionadas em vials de 2,0 mL para serem injetados no CG/qMS.

Para a análise cromatográfica foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a um detector de espectrometria de massas com analisador quadrupolar QP2010 Plus (Shimadzu, Tóquio, Japão).

O volume de amostra injetado foi de 1 µL no modo de injeção splitless realizado em injetor automático AOC 20i (Shimadzu, Japão). Foi utilizada uma coluna capilar DB-5 (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) com 30 m de comprimento, adquirida da Agilent Technologies - J&W Scientific (Palo Alto, CA, EUA). As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons foram mantidas a 300 °C e a energia de ionização por impacto eletrônico empregada foi 70 eV. O modo de análise adotado foi o de varredura de espectro total para cada pico (SCAN) com varredura de 45 a 500 Da.

Para as amostras de EPV a rampa de temperatura usada foi: temperatura inicial de 40 °C (permanecendo por 1 min), aquecimento de 3 °C.min⁻¹ até 300 °C (permanecendo por 15 min).

Os compostos químicos foram identificados conforme biblioteca do equipamento sem utilização de padrões, sendo eles comparados pelo índice de retenção descrito na literatura presente no NIST (National Institute of Standards and Technology), utilizando diferença máxima de 20 unidades.

4.6 Avaliação da citotoxicidade

Para determinação do efeito citotóxico dos EPV frente a linhagens de células tumorais, foi utilizado o método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). É um método rápido, sensível e barato, descrito primeiramente por MOSMANN (1983), usado principalmente para mensurar proliferação celular e para triagem de novas drogas anticâncer (AMARAL *et al.*, 2015)

Para todos os experimentos, em placa com 96 poços, as linhagens de células tumorais foram plaqueadas (100 µL/poço) nas concentrações de 0,7 x 10⁵ células/mL de HCT116 (câncer de cólon) e 0,1 x 10⁶ células/mL de PC3 (câncer de próstata). Após 24 h,

os extratos foram dissolvidos em 0,3% de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado a cada poço em concentração única de 50 µg/mL. O experimento foi realizado em três momentos independentes em triplicata, utilizando a doxorrubicina 0,25 µg/mL e o DMSO 0,3% como controle positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas por 72 h em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C.

Após incubação, as placas foram centrifugadas (15 g/15 min) a 4 °C e os sobrenadantes removidos. Foram adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL), e as placas foram incubadas por 3 h. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min) a 4 °C, os sobrenadantes descartados e os precipitados ressuspensos em 150 µL de DMSO estéril puro. Para a quantificação de formazan por células viáveis a absorbância foi lida usando leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc., Packard, ON, Canada) a 595 nm. Todos os valores foram convertidos para percentual de inibição de crescimento celular (% Ipc) através da seguinte fórmula: % Ipc = 100 – [(T / CN) x 100].

Sendo:

T = absorbância do extrato da própolis vermelha

CN = absorbância do controle negativo.

Os resultados foram analisados utilizando uma escala de % Ipc da seguinte forma: amostras com baixa atividade tem Ipc < 50%, moderada atividade tem Ipc entre 50% e 75% e elevada atividade tem Ipc > 75% para cada linhagem celular testada (MAHMOUD *et al.*, 2011).

Para determinação da concentração inibitória capaz de provocar 50% de seu efeito máximo (CC50), o mesmo protocolo descrito anteriormente para % Ipc, com as mesmas linhagens de células foram realizadas, variando apenas a concentração do Extrato de 0,39 - 50 µg/mL.

4.6.1 Análise dos dados

Para avaliação do grau de inibição das células, os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média. Para obtenção da CC50 (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), as amostras foram testadas em diluição seriada três vezes em triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x logaritmo da concentração e determinado suas CC50 (concentração inibitória média capaz

de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não linear. As análises e gráficos foram elaborados utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7.0.

4.6.2 Análise estatística

As variáveis quantitativas expressas sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média foram submetidas a testes de homoeostaticidade e normalidade de distribuição de valores. Para teste de normalidade, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, enquanto para análise de homoeostaticidade foram aplicados os testes de Bartlett (supõe que a variável tem distribuição normal) e Levene (supõe que os dados têm qualquer distribuição contínua). Dados com distribuição normal e com homoeostaticidade foram comparados entre si utilizando o teste ANOVA seguido da extensão post-hoc de Tukey. Dados que não obedeceram a estes pressupostos (distribuição normal e/ou homoeostaticidade) foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis com extensão post-hoc de Dunn. Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de p forem menores que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento do método de extração no ASE™ 100

Neste trabalho, foi aplicado um planejamento fatorial completo 2^3 para o desenvolvimento do método de extração de substâncias de baixa polaridade da própolis vermelha, visando a obtenção rápida com menores gastos com solvente e maiores percentuais de rendimento como resposta. Para isto, foi desenvolvido o planejamento para avaliar as variáveis separadamente, este modelo (2^3) permite uma combinação de 3 variáveis e 1 ponto central com 3 amostras, o que evita as dificuldades para análises das interações entre elas, favorecendo comparações simultâneas investigando os efeitos de uma variável experimental, enquanto mantém todas as outras constantes (NORIEGA *et al.*, 2005). Este modelo metodológico é frequentemente utilizado em estudos que envolvem otimizações e desenvolvimento de processos visando avaliar o rendimento como superfície de resposta em diversas amostras extrativas (PAULA *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2017; TORRES *et al.*, 2018). Contudo, estudos aplicando o planejamento fatorial para análise de processos extrativos de amostras de própolis utilizando líquidos pressurizados ainda não foram relatados na literatura.

Tem sido relatado que diferentes condições de extração podem gerar diferentes respostas em relação ao seu rendimento e sua composição química (FRANZEN *et al.*, 2018). Desta forma, o rendimento pode ser considerado uma importante variável respostas a ser avaliada em pesquisas com diferentes metodologias de extração de produtos naturais (BRITO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

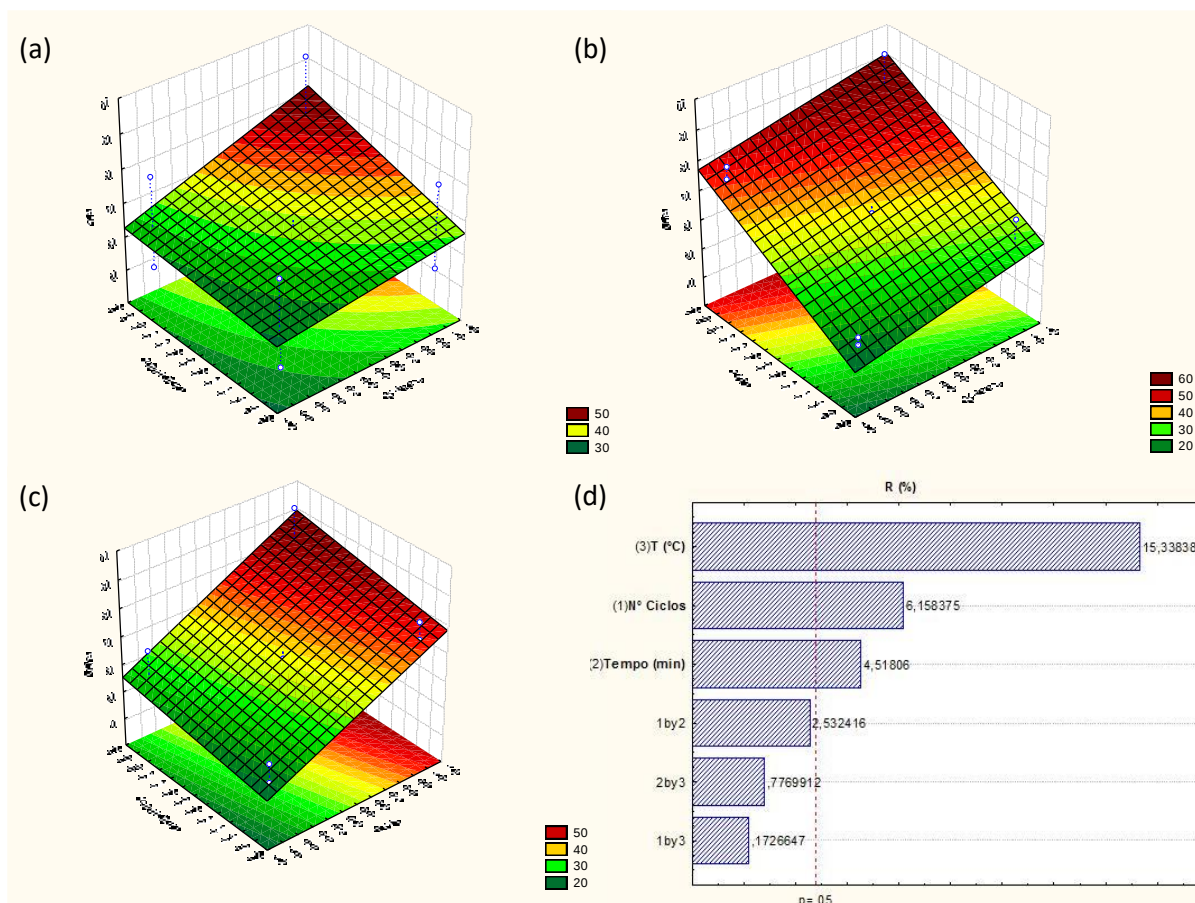


Fig. 2: (a) Gráfico de superfície de resposta do planejamento fatorial 2^3 , representando as interações de dois fatores distintos como tempo e ciclo, favorecendo na determinação das melhores condições de extração. (b) Gráfico de superfície de resposta representando interações entre variáveis temperatura e número de ciclos. (c) Gráfico de superfície de resposta representando interações entre as variáveis tempo e temperatura. (d) Gráfico de Pareto utilizado na avaliação de 2 interações entre as variáveis aplicadas para determinação do rendimento como resposta do planejamento fatorial desenvolvido. Onde ---- representa a significância das variáveis comparadas, podendo ser observado que os itens à direita do corte possuem representatividade significativa e os demais da esquerda não apresentam significância

O resultado das comparações entre as variáveis testadas na obtenção dos melhores rendimentos, encontra-se na Fig 2. Nesta, pode ser observado a superfície de resposta (a, b e c) e o gráfico de Pareto (d) demonstrando que as variáveis temperatura, ciclos e tempo influenciaram significativamente na obtenção dos melhores rendimentos ($p < 0,05$), enquanto que a combinação de variáveis entre si não demonstrou influência significativa ($p > 0,05$).

Poucos estudos podem ser encontrados na literatura científica relacionados aos constituintes de baixa ou intermediária polaridade da própolis vermelha que possuam atividade biológica (NUNES *et al.*, 2009). Nesse sentido, para extração de compostos de baixa polaridade, são utilizados solventes também de baixa polaridade devido a maior afinidade promovida pela interação entre as polaridades do soluto e do solvente, o que favorece a extração de substâncias semelhantes (AGUIAR *et al.*, 2018; FRANZEN *et al.*,

2018). Entre os solventes com essas características químicas, destaca-se o hexano, que tem sido utilizado frequentemente para extrações de compostos de baixa polaridade (CÂNDIDO SOBRINHO *et al.*, 2017; AGUIAR *et al.*, 2018; FRANZEN *et al.*, 2018).

No presente estudo, foi evidenciada grande variabilidade no rendimento dos processos extrativos dentro das diferentes condições testadas, variando de 18,2 a 64,63%. Portanto, o objetivo do planejamento experimental utilizado neste estudo foi desenvolver o processo extrativo com base no rendimento, foram pressupostas como condições ótimas aquelas que propiciassem valores iguais ou superiores a 11%. Devido a ausência de estudos prévios com extratos de baixa polaridade com própolis vermelha, este percentual de corte se baseou no valor de referência (11%) sugerido pelo Ministério da Agricultura do Brasil para extratos hidroetanólicos e etanólicos de amostras de própolis verde (MAIA *et al.*, 2013).

Conforme pode ser observado na Fig. 3, o rendimento obtido em todas as amostras pode ser considerado satisfatório frente ao estudo realizado com óleo essencial da própolis vermelha (SENA-LOPES *et al.*, 2018).

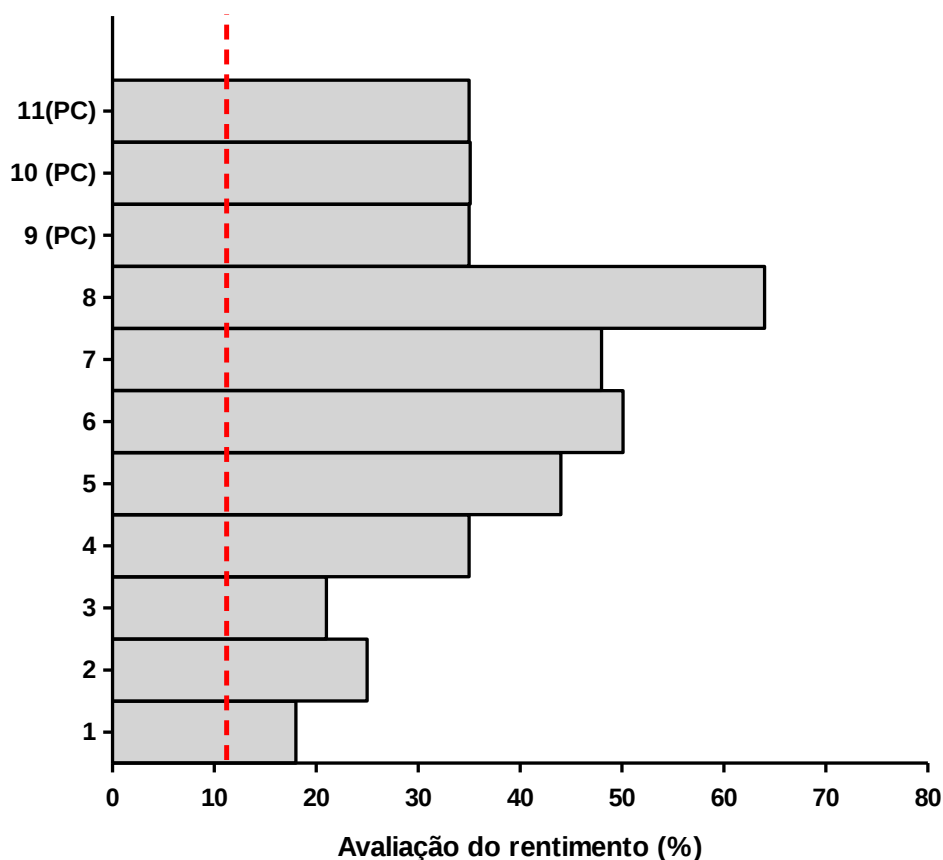


Fig. 3: Avaliação do rendimento das amostras de EPV obtidas por ASE™, onde - - - - representa o ponto de corte de 11% conforme sugerido pelo Ministério da Agricultura.

Existem poucos trabalhos analisando o rendimento de porções de baixa polaridade obtidos a partir de própolis vermelha. De fato, a maioria dos estudos se refere a extrações hidroalcoólicas, ricas em compostos polares, com rendimento variando entre 19,2% (AGUIAR *et al.*, 2018) a 43,5% (SIQUEIRA *et al.*, 2014). Por sua vez, Sena-Lopes *et al.* (2018) realizaram a extração por hidrodestilação de óleo essencial a partir de amostras de própolis vermelha, obtendo um rendimento extremamente baixo de apenas 0,25%. Contudo, é preciso destacar que nenhuma das extrações anteriormente descritas foi realizada dentro das condições testadas no presente estudo, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos. Por outro lado, Biscaia, Ferreira (2009) compararam os rendimentos de extração de própolis obtidos por diferentes procedimentos de extração utilizando fluido supercrítico (com CO₂ e etanol como co-solvente), assim como soxhlet e maceração como métodos de extração de baixa pressão usando etanol, acetato de etila, clorofórmio, hexano, água e misturas de água/etanol. O rendimento obtido para SFE foi de 24,8 ± 0,9%. No estudo realizado por Zordi *et al.* (2014), o maior rendimento da extração de amostra de própolis verde italiana utilizando CO₂ supercrítico e etanol (co-solvente) foi de 10,79%. Já no estudos de Machado *et al.* (2015) o rendimento obtido (também usando CO₂ supercrítico e etanol) foi extremamente baixo (aproximadamente 3%), embora tenha apresentado altos teores de fenólicos.

Contudo, os trabalhos anteriormente apontados se referem a amostras de própolis verde, o que também dificulta a comparação com os resultados obtidos no presente estudo. De fato, apenas um único trabalho realizando extração com hexano em alta pressão de amostras de própolis vermelha foi encontrado na literatura (BARBOSA, 2015), e o rendimento do processo extrativo utilizando hexano em condições supercríticas foi de 63±17%. Apesar deste valor ser bastante próximo ao obtido na amostra 8 do presente estudo (maior rendimento, representado por 64,63%), é preciso destacar que as condições de extração utilizadas pelo referido autor foram diferentes (200 bar, 45 °C, 1 ciclo). Além disso, conforme pode ser observado no presente estudo, variações nos parâmetros de extração podem determinar alterações importantes no rendimento do processo extrativo.

No presente estudo, foi observado os maiores rendimentos foram obtidos utilizando a temperatura de 70 °C. Estes valores podem ser justificados pelo fato de a própolis ser uma substância heterogênea de característica majoritária resinosa que ao ser submetida a condições de elevadas temperaturas e pressão, seu material de baixa polaridade pode ser solubilizado e arrastado junto aos compostos de maior afinidade com o solvente (AGUIAR *et al.*, 2018; CAVENDISH *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2013; PELLATI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013).

6.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS)

A cromatografia gasosa é frequentemente utilizada na caracterização dos compostos químicos de um determinado produto natural. Esta técnica é utilizada frequentemente para separação de compostos que apresentam baixa polaridade e elevado teor de volatilização. Tais características, associadas à disponibilidade de uma ampla biblioteca direcionada aos espectros de massa de cada substância, auxiliam na identificação dos compostos químicos presentes nas amostras (ALENCAR *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009; PELLATI *et al.*, 2013; SENA-LOPES *et al.*, 2018).

Visando vantagens dessa técnica de separação de compostos, e em consonância com a complexidade dos possíveis compostos presentes nos extratos obtidos, a cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS) foi utilizada nesta pesquisa. Foram obtidos cromatogramas com perfis semelhantes para todos os extratos, independente das condições testadas. Ao todo foram identificados 46 compostos representados nas **Tabelas 4 a 10**. Estes foram confirmados a partir da comparação com o índice de retenção dos picos, utilizando o NIST Livro de Química na Web SRD 69 como referência, dentre os compostos encontrados, destacou-se, lupeol - $C_{30}H_{50}O$ (Fig. a), acetato de lupeol - $C_{32}H_{52}O_2$ (Fig. b) e lupenona - $C_{30}H_{48}O$ (Fig. c).

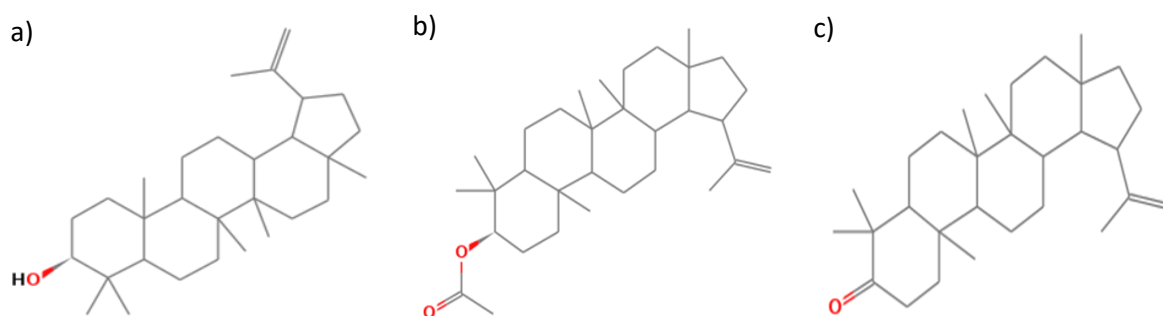


Fig. 4: Estrutura química das moléculas do lupeol (a), acetato de lupeol (b) e lupenona (c).

Como pode ser observado na **Tabela 3**, também foram encontrados diversos hidrocarbonetos aromáticos distribuídos nas diferentes amostras de EPV. Estes compostos não apresentam atividade biológica descrita na literatura científica. Contudo, a presença desses compostos pode estar relacionada à contaminação da água e solo dos locais de coleta realizada pelas abelhas (pasto apícola), principalmente por combustíveis. Segundo relatado por Cardoso *et al.* (2017), estes compostos são frequentemente encontrados ao redor de postos de combustível e são responsáveis por parte considerável da poluição atmosférica. Na **Tabela 4**, por sua vez, estão indicados diversos compostos pertencentes a classe dos hidrocarbonetos saturados encontrados nas amostras analisadas. Estes compostos são descritos por Castro *et al.*, (2008) como substâncias frequentemente

encontradas em plantas jovens. Entretanto, esta classe de compostos não apresenta atividade biológica descrita na literatura científica. Hidrocarbonetos insaturados como heptacos-1-eno e o nonacos-1-eno, também não representam atividade biológica descrita na literatura (**Tabela 5**).

A presença de compostos pertencentes à família dos álcoois pode ser evidenciada na **Tabela 6**. Estes compostos são frequentemente encontrados em produtos derivados da fermentação do açúcar em plantas (GONÇALVES *et al.*, 2006), e foram identificados no estudo realizado por Nunes *et al.* (2009), a partir da caracterização e separação de compostos pelo método de cromatografia gasosa com *headspace* dinâmico. Contudo, não foi encontrado na literatura científica atividades biológicas atribuídas a estes compostos.

Os compostos pertencentes a classe dos éteres observados na **Tabela 7**, não apresentaram atividade biológica com exceção do metileugenol. O composto citado, conforme descrito por Sousa *et al.* (2004), pode ser encontrado em elevadas concentrações no óleo essencial de cravo, sendo a ele atribuídas atividades estimulantes das funções digestivas, também sendo utilizado com frequência em condimentos e aromatizantes. No estudo realizado por Sayyah *et al.* (2002), foi possível observar que este composto encontrado no óleo essencial de folhas de louro, apresenta atividade promissora frente a hemorroidas, reumatismo, contusões e convulsões. De especial interesse foi o fato de que este composto também foi identificado por Nunes *et al.* (2009) na própolis vermelha brasileira, e que a presença deste composto químico aparenta não sofrer influência da sazonalidade, posto ter sido evidenciado em amostras coletadas nos meses de fevereiro, junho e outubro.

Conforme pode ser visto na **Tabela 8**, foram identificados dois compostos pertencentes à classe das cetonas, o 2 (3H) -furanona, 5-dodecildi-hidro-, que não apresenta atividade biológica descrita na literatura científica, e acetofenona, que possui diversas atividades biológicas comprovadas, dentre elas, antiinflamatória (FAVIER *et al.*, 1998), antiespasmódica (CECHINEL-FILHO *et al.*, 1995), antibacteriana (NIERO, *et al.* 1996) e antifúngica (CECHINEL-FILHO *et al.*, 1996). Segundo Favier *et al.* (1998), a acetofenona é um composto fenólico que representa um metabólito secundário encontrado frequentemente em plantas submetidas a estresse ambiental

Dentre os compostos encontrados nos EPV obtidos através de diversas condições de extração, destacaram-se os pertencentes a classe dos terpenos, estes como, lupeol e seus derivados, lupenona e acetato de lupeol (**Tabela 9**), são encontrados em diversos espécimes vegetais (DAVID *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2017. Estes apresentam efeitos biológicos descritas na literatura, tais como atividade hepatoprotetora (SUNITHA *et al.*,

2001), antiartrítica (KWEIFIO-OKAI; CARROLL, 1993), antiinflamatória, sendo descrito por Geetha; Varalakshmi. (2001) como composto promotor de atividade superior ao padrão mercadológico indometacina.

Deve ser destacado que Gallo, Sarachine (2009) demonstraram que o tratamento prévio de camundongos apresentando clastogenicidade induzida por benzo[α]pireno determinou a identificação de menores números de células aberrantes, DNA micronúcleos e de sinais morfológicos de citotoxicidade (e.g. picnose, cariólise e cariorrexe). Além disso, foi descrita ainda forte atividade antimutagênica do lupeol em modelos *in vitro* e *in vivo*, protegendo o DNA (LIRA *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que esse composto apresenta atividade anticarcinogênica quimiopreventiva. Além disso, tem sido relatada atividade citotóxica contra linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (Hep-G2) e melanoma (MEL-2), por meio da inibição da topoisomerase II e da proteína farnesil transferase (SETZER; SETZER, 2003). O lupeol também apresenta efeito antitumoral sobre tumores epidérmicos induzidos pelo carcinógeno TPA (12-tetradecanoilforbol-13-acetato) por meio da modulação das vias do NF- κ B e PI3K/Akt (SALEEM *et al.*, 2004). Adicionalmente, como descrito por Nigam *et al.* (2007), o lupeol aplicado no dorso de ratos apresentou efeito quimioprotetor contra a indução da carcinogênese por 7,12-dimetilbenz (a) antraceno (DMBA).

Tabela 3: Hidrocarbonetos aromáticos identificados nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tolueno	8,0	2,5	2,6	2,1	13,2	3,3	7,8	17,9	-	5,5	4,0
1,2,3-trimetil-benzeno	0,5	6,1	0,6	4,4	-	3,6	2,9	7,2	-	-	2,0
1,2,4-trimetil-benzeno	3,3	2,0	5,4	1,1	8,7	0,9	0,8	1,7	5,3	2,7	0,7
Indano	0,6	0,3	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-
1,4-dietil-benzeno	0,4	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
1-metil-3-propil-benzeno	0,4	0,3	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-
1,2-dietil-benzeno	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3-dietil-benzeno	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-
1-etil-3,5-dimetil-benzeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-etil-1,4-dimetil-benzeno	0,6	0,2	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-
4-etil-1,2-dimetil-benzeno	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-
1,2,3-trimetoxi-5-(2-propenil) benzeno	-	-	0,7	0,5	0,4	0,4	0,3	-	-	-	-

Tabela 4: Hidrocarbonetos saturados identificados nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tricosano	-	-	4,0	2,4	2,0	3,0	0,2	3,0	4,0	3,5	0,4
Pentacosano	15,1	10,5	14,5	8,4	6,1	7,9	0,6	10,5	11,1	10,3	0,8
Hexacosano	-	0,4	1,4	0,9	1,0	0,8	0,8	0,2	1,5	0,6	0,4
Heptacosano	0,2	24,6	25,0	19,1	19,9	-	-	-	-	-	1,2
Octacosano	0,5	1,0	0,7	0,8	0,8	0,7	0,4	1,3	0,4	0,3	0,1
Nonacosano	0,1	2,5	1,8	11,9	10,2	16,6	13,0	16,2	21,0	15,8	14,2
Triacotano	-	1,5	20,4	0,9	-	0,9	0,7	0,7	1,1	1,0	1,0
Untriacontano	0,2	23,0	-	17,6	-	18,5	20,0	22,4	31,0	21,3	19,9

Tabela 5: Hidrocarbonetos insaturados identificados nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Heptacos	-	-	-	-	0,3	0,9	2,1	0,3	0,8	0,5	20,2
Nonacos	-	-	1,4	1,1	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 6: Álcoois identificados nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2,3-dimetil-1-pentanol	-	-	-	-	0,4	-	-	0,7	-	-	-
2-Hexin-1-ol	-	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-
1-Butanol, 3-metil-, acetato	3,2	1,0	1,6	0,9	5,0	1,0	2,4	4,2	2,7	1,5	-
Álcool beénico	2,1	0,6	-	0,3	-	0,4	7,2	0,4	0,5	0,3	8,6
Octacosanol	-	-	-	3,7	-	4,8	3,8	2,7	1,1	3,7	5,1
1-Triacotanol	-	-	-	-	-	17,6	-	-	-	-	-
1-Heptacosanol	-	-	-	16,0	-	-	15,6	2,1	-	15,8	-

Tabela 7: Compostos pertencentes à classe dos éteres identificados nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Metileugenol	-	-	0,6	0,4	0,6	0,3	0,2	-	-	-	-
Isopropil tetracosil éter	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-

Tabela 8: Cetonas identificadas nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Acetofenona	-	-	-	-	0,5	-	-	-	3,0	-	0,8
2 (3H) -furanona, 5-dodecildi-hidro-	1,2	3,6	5,1	-	2,0	5,4	2,7	3,6	5,4	6,2	4,6

Tabela 9: Terpenos identificados nos EPV por CG/MS demonstrando área relativa (%) dos picos.

Compostos	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lupeol	-	-	-	-	20,3	6,6	8,8	0,1			
Lupenona	-	-	-	-					11,9	10,8	12,2
Acetato de lupeol	16,4	17,5	10,6	6,1	3,0	3,4	3,7	0,2	-	-	-

A seguir são apresentados os cromatogramas dos extratos obtidos agrupados de acordo com a temperatura de extração. Neles foram destacados os picos referentes aos terpenos encontrados na maioria dos EPV. Assim, os cromatogramas 1 a 4 (Fig. 5 a 8) foram obtidos com temperatura de 40 °C, e demonstram a presença do acetato de lupeol em picos de diferentes intensidades (6,1 a 17,5% de área relativa).

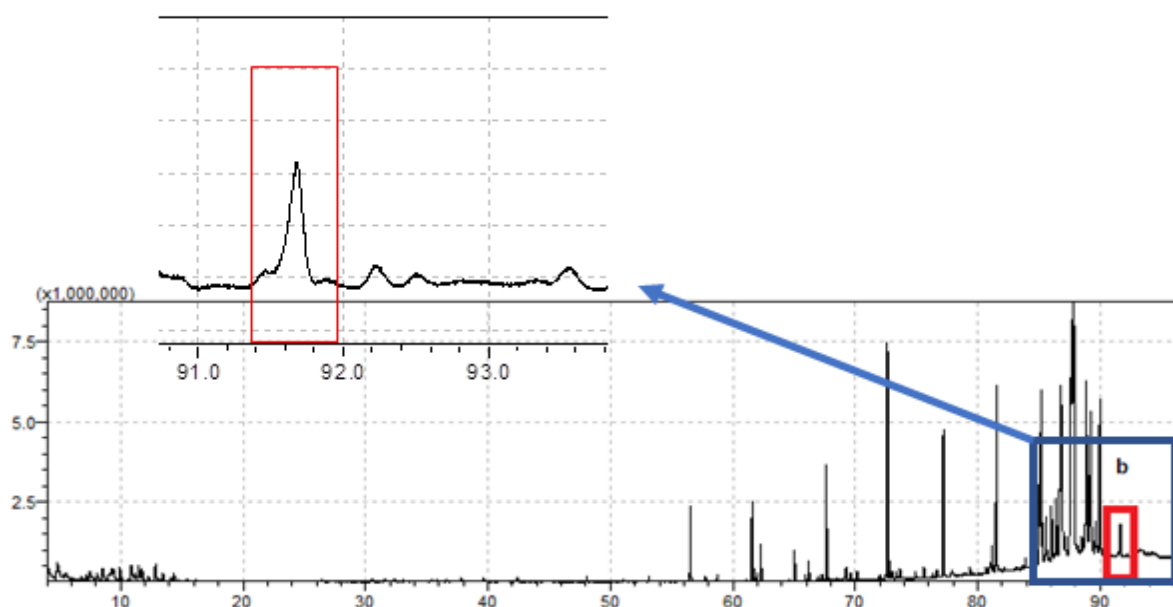


Fig. 5: Cromatograma da amostra 1 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 40 °C, 1 ciclo e 10 min de extração, onde o acetato de lupeol(b) foi encontrado em uma área referente a 16,4% como destacado em imagem com zoom acima.

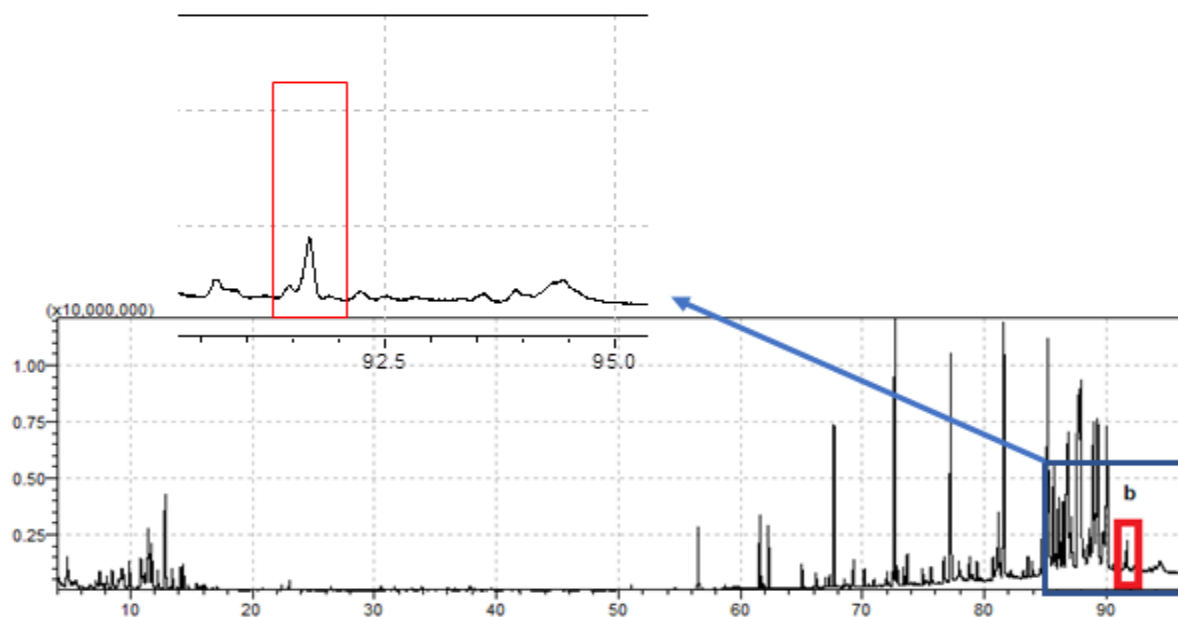


Fig. 6: Cromatograma da amostra 2 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 40 °C e 3 ciclos de 10 min de extração, onde o acetato de lupeol (b) foi encontrado em uma área referente a 17,5% como destacado em imagem com zoom acima.

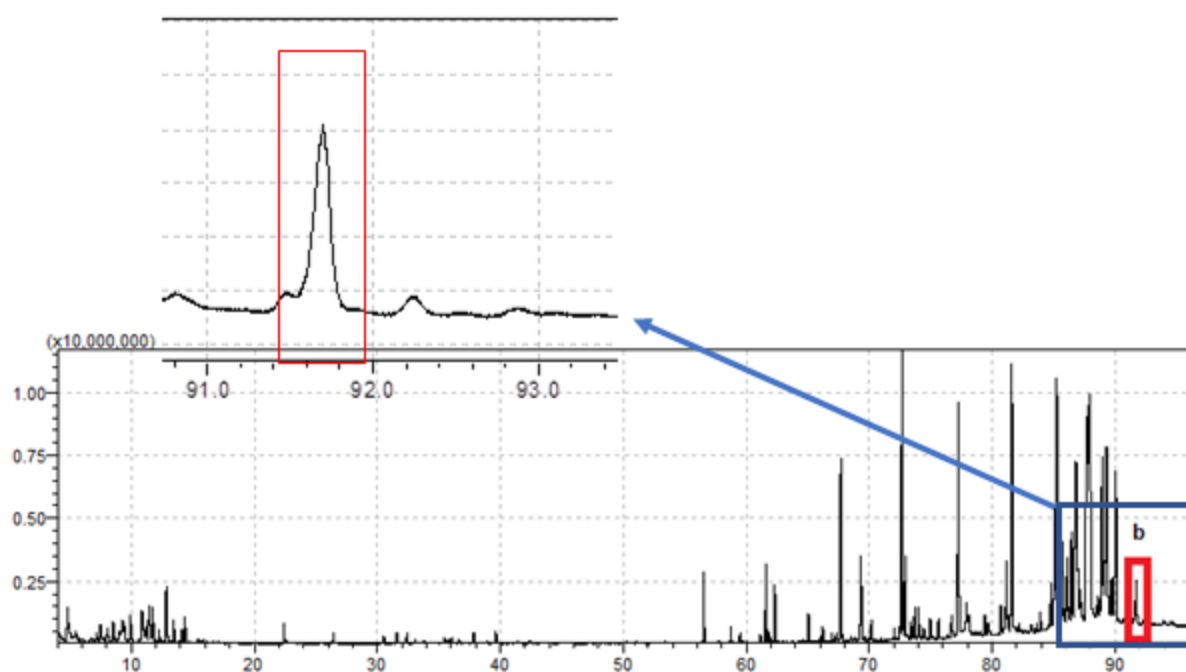


Fig. 7: Cromatograma da amostra 3 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 40 °C e 1 ciclo de 20 min de extração, onde o acetato de lupeol (b) foi encontrado em uma área referente a 10,6% como destacado em imagem com zoom acima.

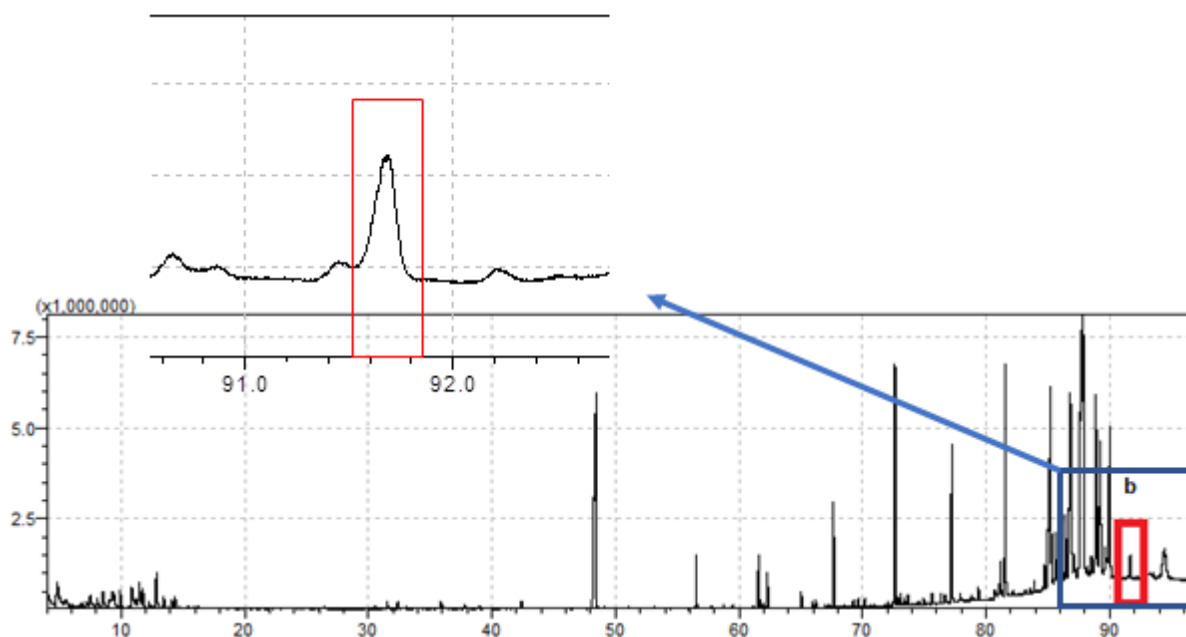


Fig. 8: Cromatograma da amostra 4 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 40 °C e 3 ciclos de 20 min de extração, onde o acetato de lupeol (b) foi encontrado em uma área referente a 6,1% como destacado em imagem com zoom acima.

Pode ser observado que a amostra 4 extraída com 3 ciclos de 20 min, apresentou 6,1% de área relativa, tendo a menor área dentre as 4 amostras testadas nas condições supracitadas, enquanto que a amostra 2, extraída com 3 ciclos de 10 min, apresentou 17,5% de área relativa, sendo a maior área entre as 4 amostras. Esta variabilidade está relacionada as diferentes condições de extração (SANTOS *et al.*, 2010).

Os cromatogramas das amostras de 5 a 8, obtidos à temperatura de 70 °C, são apresentados a seguir (Fig. 9 a 12).

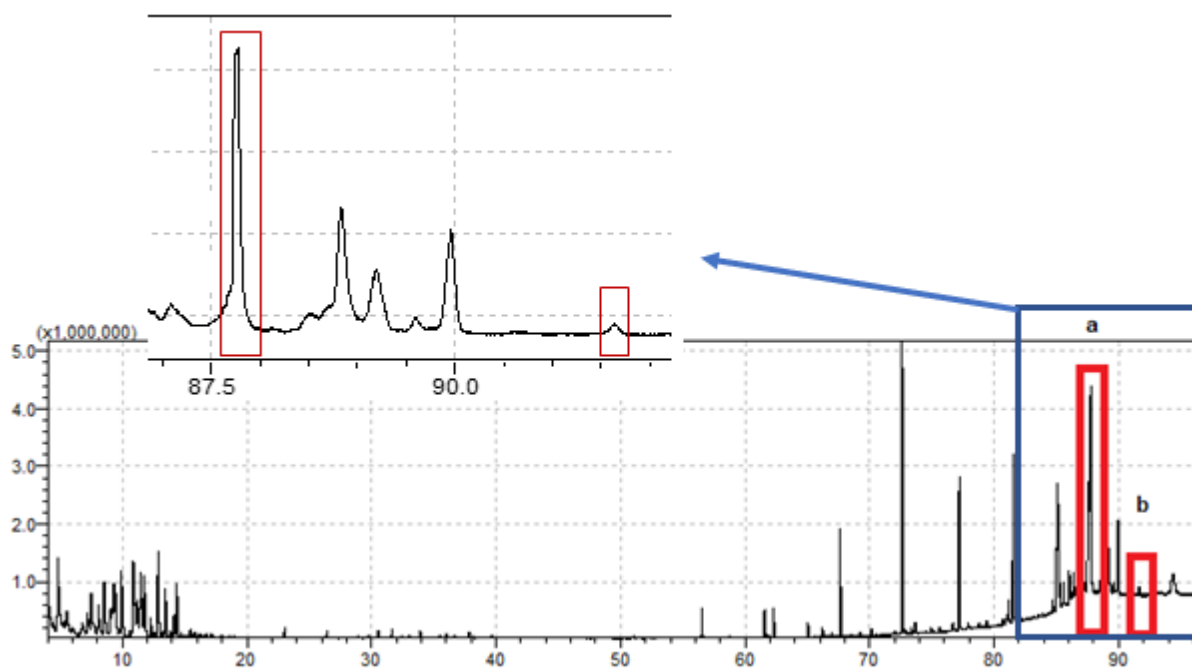


Fig. 9: Cromatograma da amostra 5 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 70 °C e 1 ciclo de 10 min de extração, onde o lupeol (a) foi encontrado em uma área referente a 20,3% e acetato de lupeol (b) a 3% como destacado em imagem com zoom acima.

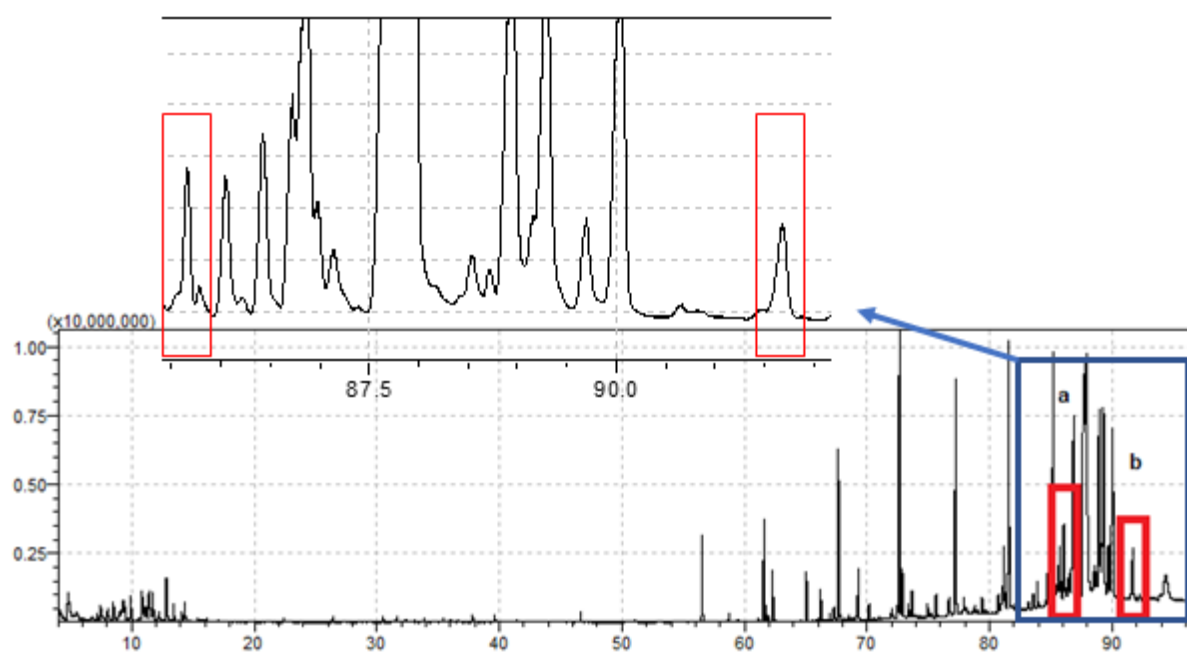


Fig. 10: Cromatograma da amostra 6 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 70 °C e 3 ciclos de 10 min de extração, onde o lupeol (a) foi encontrado em uma área referente a 6,6% e acetato de lupeol (b) a 3,4% como destacado em imagem com zoom acima.

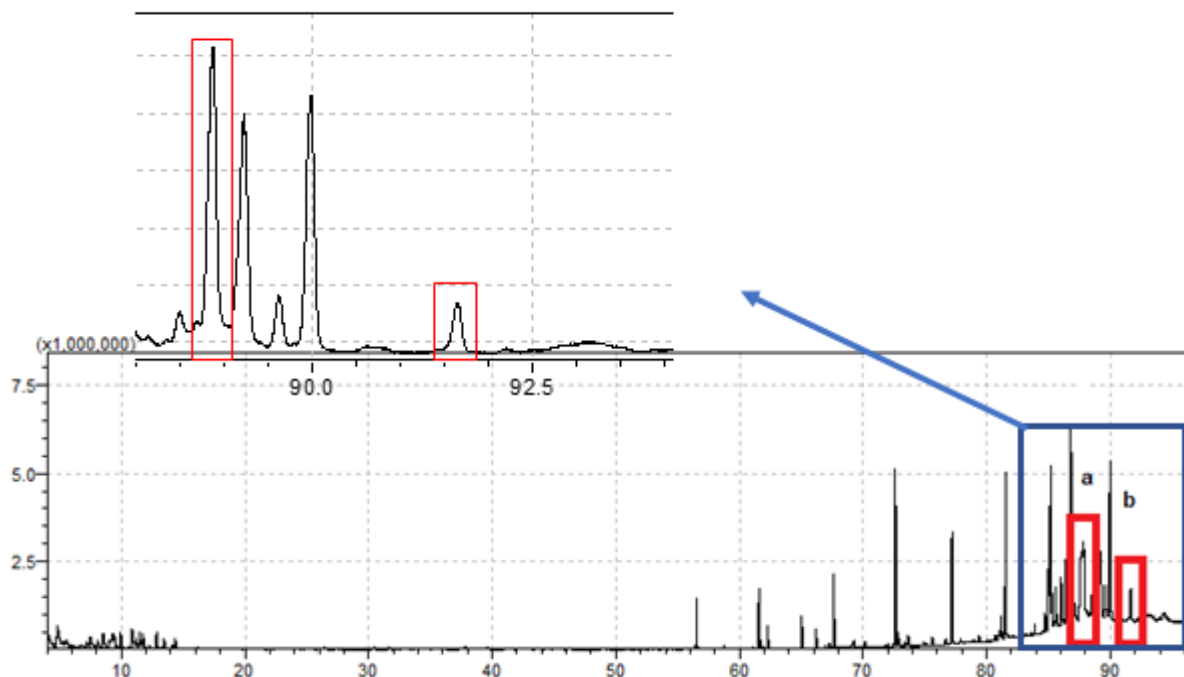


Fig. 11: Cromatograma da amostra 7 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 70 °C e 1 ciclo de 20 min de extração, onde o lupeol (a) foi encontrado em uma área referente a 8,8% e acetato de lupeol(b) a 3,7% como destacado em imagem com zoom acima.

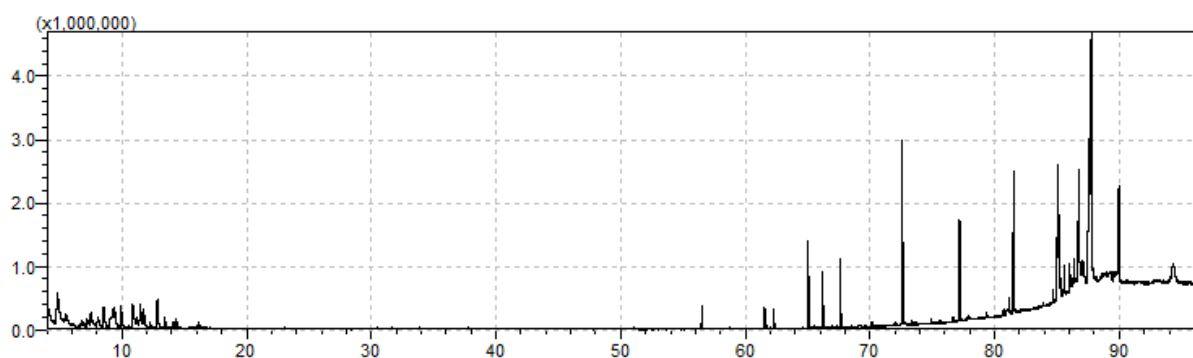


Fig. 12: Cromatograma da amostra 8 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 70 °C e 3 ciclos de 20 min de extração, onde o acetato de lupeol (0,2 %) e o lupeol (0,1%) apresentaram picos de baixa intensidade praticamente imperceptíveis em imagem com zoom.

O acetato de lupeol aparece em áreas de baixa intensidade, juntamente com picos de intensidades mais elevadas de lupeol. Pode ser observado que a área relativa do acetato de lupeol variou entre 0,1 e 3,7%, e o lupeol entre 0,2 e 20,3% em diferentes amostras; neste sentido, a amostra 8, extraída com 3 ciclos de 20 min, apresentou a menor área (0,2%) de lupeol e acetato de lupeol (0,1%), enquanto a amostra 5, extraída com 1 ciclo de 10 min, apresentou a maior área (20,3%) de lupeol e a amostra 7 apresentou maior área de acetato de lupeol com 3,7%. É possível observar que a amostra 8 apresentou os menores

áreas dos terpenos de interesse para o presente trabalho, isto pode ser explicado possivelmente devido ao maior tempo de exposição da amostra a condições de calor (70 °C), o que promoveu o arraste de maiores concentrações de outros compostos químicos e de cera que não apresentam atividade biológica, consequentemente, influenciando no maior rendimento obtido neste estudo. Porém, estudos que corroborem com a explicação do entrave ocorrido são escassos.

Ficou evidente que a obtenção do lupeol ocorreu apenas nas extrações realizadas à 70 °C. Este fato parece sugerir que temperaturas mais elevadas poderiam favorecer a dessorção deste composto químico, o que teria facilitado sua extração sob as condições trabalhadas no presente estudo. Suportando esta hipótese, estudos prévios têm demonstrado que o lupeol é frequentemente encontrado em óleos essenciais obtidos por hidrodestilação, cuja temperatura de extração é de 100 °C (ANDRÉ *et al.*, 2018; FELIPE; BICAS, 2016; MATTANA *et al.*, 2015; VALLILO *et al.*, 2006).

As amostras referentes ao ponto central foram obtidas a partir de 2 ciclos de 15 min e temperatura de 55 °C. Os cromatogramas obtidos sob estas condições estão apresentados nas Fig. 13 a 15, nestes, foi possível observar que a lupenona foi identificada em todas as amostras do ponto central.

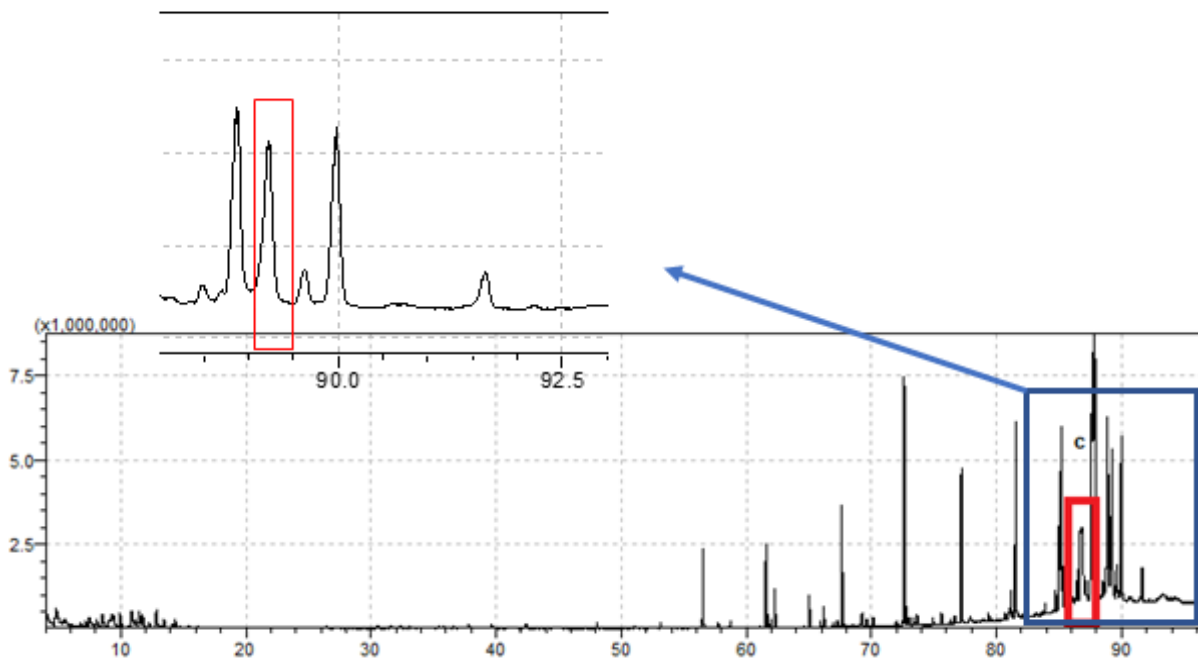


Fig. 13: Cromatograma da amostra 9 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 55°C e 2 ciclos de 15 min de extração, onde lupenona (c) foi encontrado em uma área referente a 11,9% como destacado em imagem com zoom acima.

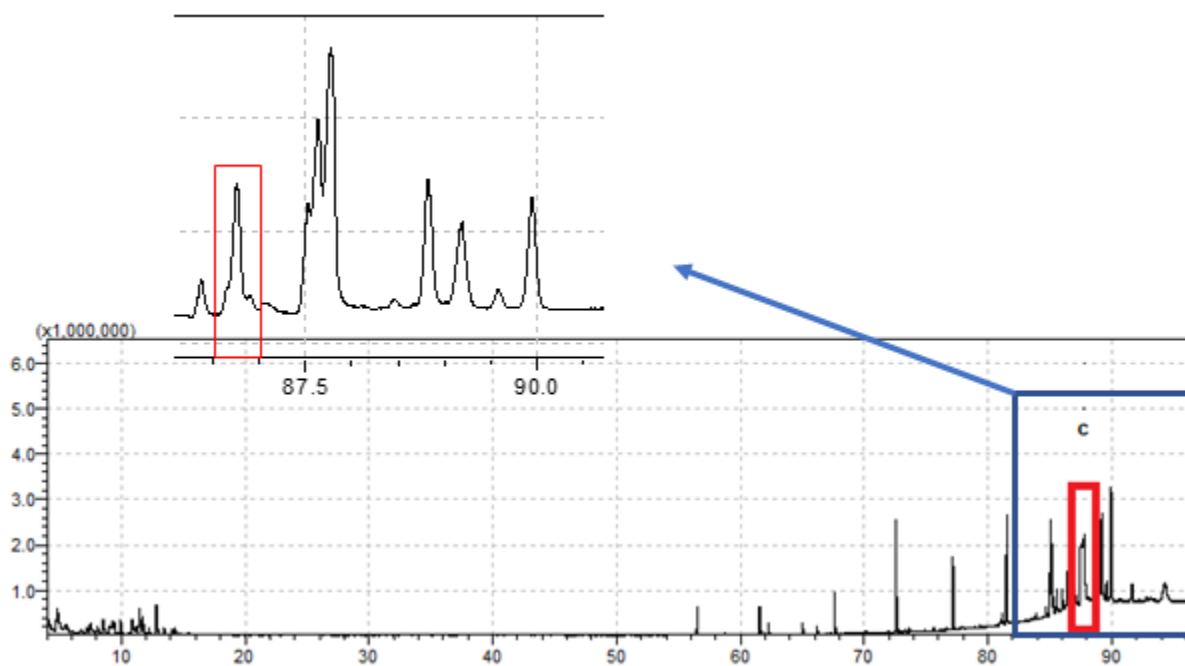


Fig. 14: Cromatograma da amostra 10 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 55°C e 2 ciclos de 15 min de extração, onde lupenona (c) foi encontrado em uma área referente a 10,8% como destacado em imagem com zoom acima.

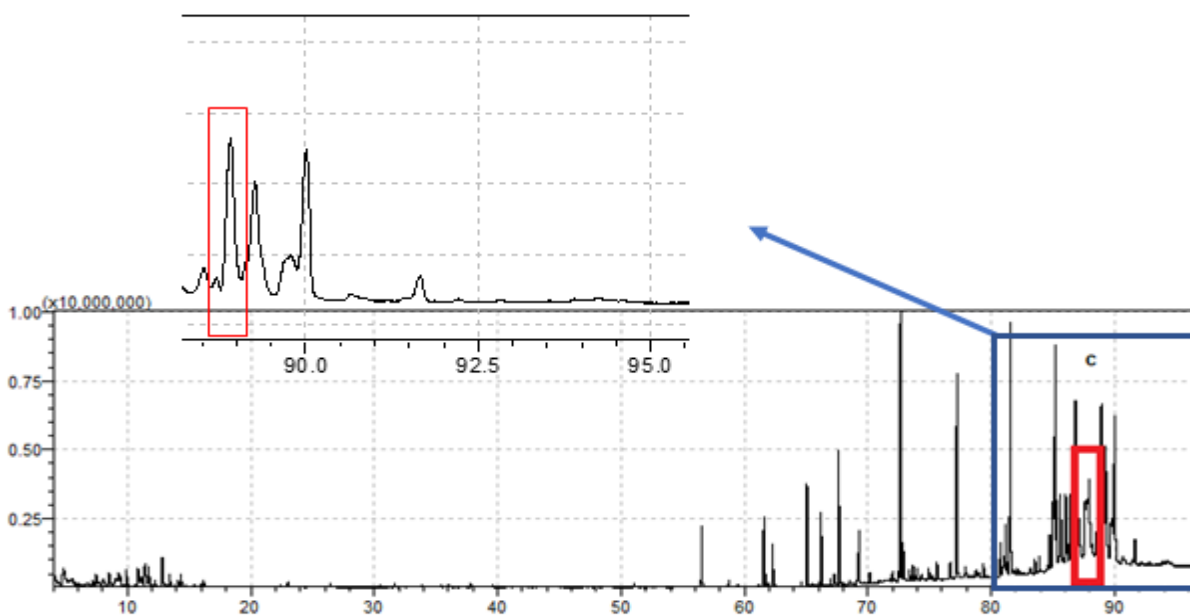


Fig. 15: Cromatograma da amostra 11 obtida por líquidos pressurizados com temperatura de 55°C e 2 ciclos de 15 min de extração, onde lupenona (c) foi encontrado em uma área referente a 12,2% como destacado em imagem com zoom acima.

Diante destes dados é possível sugerir que a temperatura, tempo e quantidade de ciclos são variáveis independentes que, além de influenciarem significativamente no rendimento da extração, também parecem interferir substancialmente no tipo e teor de compostos extraídos. De especial interesse foi o fato de que as amostras obtidas com 2 ciclos de 15 min, temperatura de 55 °C, mostraram a presença da lupenona, o que reforça a justificativa que a variação de temperatura influencia diretamente na solubilização dos compostos (TORRES *et al.*, 2018).

Contudo, não se pode perder de vista que, no presente estudo, foi determinada apenas as áreas relativas dos picos das diferentes substâncias identificadas nos cromatogramas anteriormente citados. Assim, extrapolações relacionando o percentual de área relativa com potencial atividade biológica dos extratos devem ser interpretadas com bastante parcimônia, uma vez que não foram obtidos valores quantitativos absolutos de cada composto. Portanto, áreas relativas menores podem, em alguns casos, representar teores maiores de substâncias, dependendo do rendimento total dos compostos (m/m).

Analisados em conjunto, os dados obtidos a partir do estudo de rendimento e caracterização química dos extratos da própolis vermelha demonstrou a eficiência do desenvolvimento do método de extração no ASE™.

6.3 Avaliação do efeito citotóxico dos extratos da própolis vermelha utilizando o ensaio colorimétrico MTT

O procedimento de análise colorimétrica 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) é utilizado com frequência por diversos autores (FROZZA *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2017; RAI *et al.*, 2018; SUNDAR; SUDARKODI, 2018; VAJRABHAYA; KORSUWANNAWONG, 2018). É uma análise baseada na conversão do MTT, composto hidrossolúvel de cor amarela, em azul de formazan, a partir da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis (BERRIDGE *et al.*, 2005). Neste sentido, é um ensaio que proporciona a avaliação das células vivas a partir do seu metabolismo ativo, permitindo um elevado grau de confiabilidade relacionada a viabilidade das células em contato com os extratos ou substâncias testadas. Assim, a determinação da atividade metabólica mitocondrial proporcionada pelos resultados do MTT é passível de ser correlacionada com uma estimativa da viabilidade celular, sendo um teste rápido e de baixo custo quando comparados com outros ensaios. Por outro lado, a desvantagem deste método é a incapacidade de avaliar lesões celulares (MOSMANN, 1983).

Para esta avaliação, segundo MAHMOUD *et al.* (2011), a atividade citotóxica de um dado produto contra linhagens de células tumorais, seja um composto complexo, como um extrato, seja uma molécula isolada, é considerada moderada quando o índice de viabilidade está entre 25 e 50% e forte quando este índice é menor que 25%. Destaca-se que a viabilidade celular acima de 50% após tratamento com um determinado composto é interpretada, para fins de triagem, como ausência de atividade citotóxica.

No presente estudo, o potencial citotóxico das 11 amostras foi testado frente a duas diferentes linhagens celulares tumorais, câncer de cólon (HCT116) e próstata (PC3), utilizando-se a análise da viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico de MTT.

A escolha dessas linhagens foi baseada no fato de que estas representam neoplasias malignas de elevada frequência no Brasil (INCA, 2018). Conforme pode ser observado na Fig. 16, a maioria das amostras apresentou atividade citotóxica pelo menos moderada (50% de atividade citotóxica) contra células HCT116, excetuando a amostra 8, e contra PC3, com a exceção das amostras 1 e 8. Contudo, apenas a amostra 5 apresentou atividade citotóxica forte (acima de 75% de atividade citotóxica) contra essas duas linhagens de células tumorais.

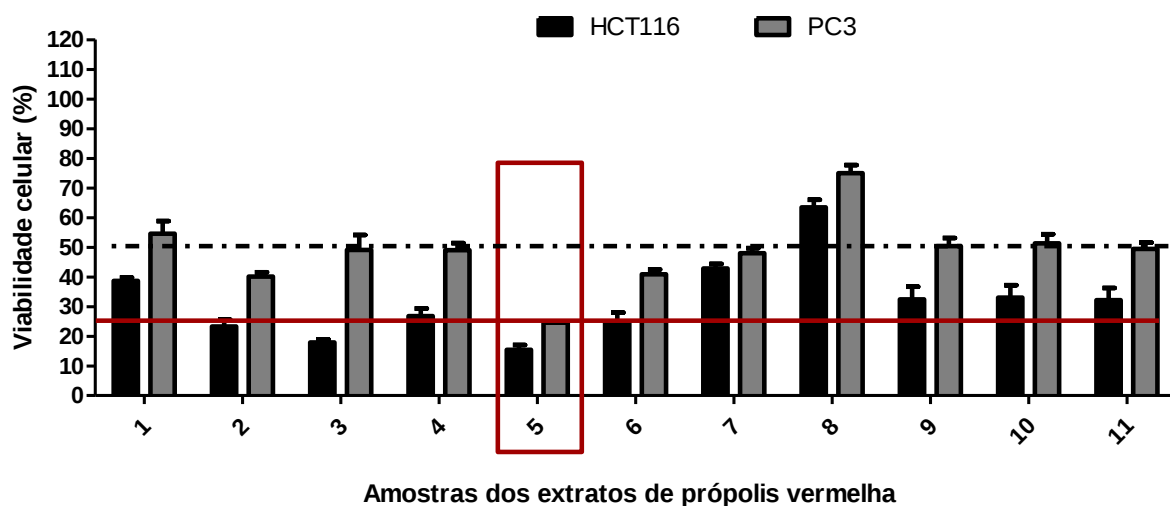


Fig. 16: Análise citotóxica contra linhagens de células tumorais derivadas de neoplasias malignas humanas HCT116 (adenocarcinoma de cólon) e PC3 (adenocarcinoma de próstata).

--- Limite percentual mínimo de atividade citotóxica considerada pelo menos moderada.

— Limite percentual mínimo de atividade citotóxica considerada forte.

A atividade citotóxica de diferentes triterpenos está bem estabelecida na literatura (CHUDZIK *et al.*, 2015). Mais especificamente, tem sido relatado que diferentes extratos apresentando lupeol e derivados demonstraram atividade citotóxica frente a uma série de

linhagens tumorais malignas, incluindo células de carcinoma hepatocelular (HepG2), hibridoma de células B (A-431), hepatoma (H-4IIE) (FLORIANI *et al.*, 2003), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide pulmonar), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe) (BASTOS *et al.*, 2017). Aliado a isso, estudos recentes demonstraram que o lupeol apresenta forte atividade citotóxica contra células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) (PITCHAI *et al.*, 2014), U87MG (glioblastoma), CEM/ADR5000 (leucemia) e HCT116 (adenocarcinoma de cólon), (NYABOKE *et al.*, 2018). Por outro lado, o acetato de lupeol apresenta atividade citotóxica contra linhagens de carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de cólon (DLD-1), mama (MCF-7, MDA-MB468), pâncreas (MIAPaCa-2), próstata (DU145) e ovário (SK-OV-3), carcinoma de colo de útero (HeLa), carcinoma hepatocelular (PLC/PRF/5) e carcinoma renal (786-0, Caki-1) (MISHRA *et al.*, 2016). E a lupenona, que no estudo realizado por Ahmad *et al.*, (2015), foi descrito que extratos que apresentavam este composto químico demonstraram atividade citotóxica contra células MCF-7, HT-29 (cólon) e HeLa.

Desta forma, a presença de triterpenos como lupeol, lupenona e acetato de lupeol nos extratos analisados no presente estudo, ainda que em concentrações aparentemente baixas, parece suportar a atividade citotóxica pelo menos moderada obtida na maioria das amostras. Ainda suportando esta teoria, a amostra 5 demonstrou elevado grau de citotoxicidade contra células HCT116 e PC3, o que poderia ser explicado presença conjunta de lupeol e acetato de lupeol.

Apesar de não ter representado o objetivo deste trabalho, é possível especular algumas hipóteses acerca dos prováveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos na atividade citotóxica. Mishra *et al.* (2016) comentam que este potencial anticancerígeno seria dependente em grande parte da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que posteriormente levaria à ruptura da membrana mitocondrial e potencial apoptose de células tumorais. Em concordância com essa teoria, Pitchai *et al.* (2014) observaram que triterpenos como lupeol são capazes de modular a expressão de genes envolvidos na indução da apoptose pela via mitocondrial, regulando negativamente a expressão do Bcl-2 e Bcl-x. No entanto, uma vez que o escopo metodológico deste trabalho ainda não permite avaliar a veracidade desta teoria, estudos posteriores são necessários a fim de evidenciar com clareza os mecanismos bioquímicos e moleculares associados aos efeitos citotóxicos do EPV sobre linhagens de células tumorais.

Após a realização dos ensaios de viabilidade celular, a amostra 5 foi selecionada com referência a atividade citotóxica representada na Fig 16. Esta amostra foi submetida a

ensaios para determinação da CC50 (concentração citotóxica média capaz de provocar 50% do efeito máximo) em células HCT116 (Fig. 27).

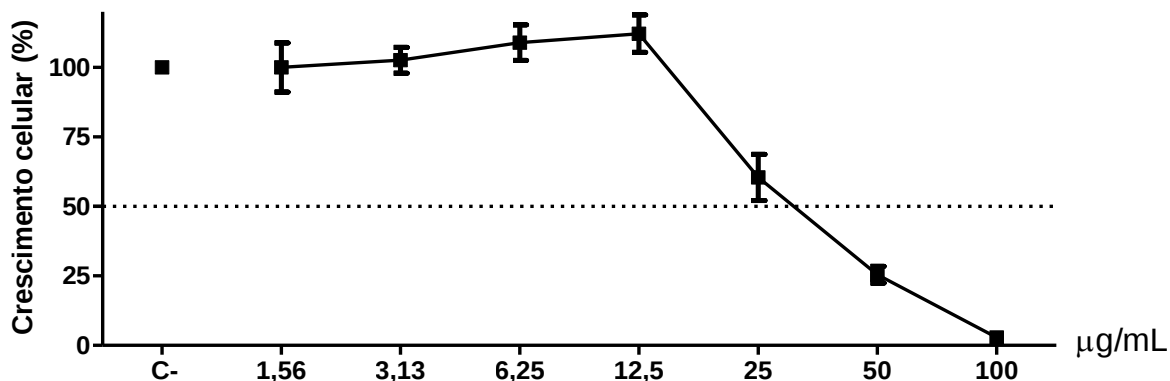


Fig. 17: Gráfico da Concentração Inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo em células HCT116.

O valor de CC50 obtido no presente estudo foi de 31,53 µg/mL, podendo ser considerado potencialmente tóxico. Diretrizes para ensaio de citotoxicidade com extratos derivados de plantas firmam que, CC50 <10 µg/mL é considerada como "muito tóxico"; CC50 entre 10 e 100 µg/mL seria "potencialmente tóxico"; CC50 100-1000 µg/mL "potencialmente prejudicial" e CC50 >1000 µg/mL "potencialmente não tóxico" (GADSHAYNE, 2009).

Os resultados de rendimento em consonância com o a atividade citotóxica e a CC50 apresentados neste estudo, corroboram com pesquisas posteriores que avaliem o possível mecanismo dos terpenos frente a inviabilidade das células testadas, atividade antitumoral em modelo animal, quantificação dos compostos de interesse e otimização do processo de extração.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Frente ao exposto conclui-se que:

- ✓ A maioria dos extratos com a exceção da amostra 8, apresentou atividade citotóxica pelo menos moderada frente as linhagens de células tumorais HCT116 e PC3.
- ✓ O desenvolvimento de extração partindo de um planejamento fatorial 2^3 , revelou que todas as variáveis influenciaram significativamente na obtenção dos melhores rendimentos. Entretanto, o rendimento da extração não foi diretamente proporcional à atividade citotóxica.
- ✓ Os extratos obtidos apresentaram composição química bastante semelhante, representada por hidrocarbonetos, cetonas, álcoois, éteres e terpenos.
- ✓ O extrato obtido nas condições onde temperatura a 70 °C e 1 ciclo de 10 min, apresentou forte atividade citotóxica frente as linhagens de células tumorais testadas, sendo esta atividade atribuída a presença de terpenos como lupeol e acetato de lupeol.
- ✓ Os resultados obtidos corroboram com a necessidade e viabilidade de execução de novas pesquisas avaliando possíveis mecanismos envolvidos na atividade citotóxica. Uma vez que, os extratos apresentaram bom rendimento conforme preconizado pelo ministério da agricultura, a amostra 5 apresentou forte atividade citotóxica frente as linhagens de células tumorais testadas neste estudo e a CC50 revelou que esta amostra pode ser considerada potencialmente tóxica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- A'ATTIYYAH, A.A.; WAN AFIQAH SYAHIRAH, W.G.; NOR AZAH, M.A.; KANNAN, T.P.; SUHARNI, M.; AHMAD, A. Phytochemical Properties and Traditional Uses of Selected Medicinal Plants in Malaysia: A Review. *J. of Biomed. & Clin. Sci.* 2017; 2(2): 14-25.
- AGUIAR, G.R.; LEMOS, T.L.G.; DORNELAS, C.A.; SILVA, A.M.; ALMEIDA, M.C.S.; FERREIRA, D.A. et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. *Revista Virtual de Química* 2018; 10(1): 2–12.
- AHMAD, S.; SUKARI, M.A.; ISMAIL, N.; ISMAIL, I.S.; ABDUL, A.B.; BAKAR, M.F.A. Phytochemicals from *Mangifera pajang* Kosterm and their biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2015; 15:83.
- ALARIF, W.; SULTAN, S.; LIHAIBI, A.; SEIF-ELDIN, N.; AYYAD, M.; ABDEL-RHMAN, F. Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumoreantimicrobial agentes. *Rev Badria European Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55(1): 462-466.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 113(2): 278–283.
- AMARAL, R.G.; FONSECA, C.S.; SILVA, T.K.M.; ANDRADE, L.N.; FRANÇA, M.E.; BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rotundifolone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2015; 67(8): 1100–1106.
- ANDRÉ, W.P.P.; RIBEIRO, W.L.C.; OLIVEIRA, L.M.B.; MACEDO, I.T.F.; RONDON, F.C. M.; BEVILAQUA, C.M.L. Essential Oils and Their Bioactive Compounds in the Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Acta Scientiae Veterinariae* 2018; 46(1).
- ANNUNCIAÇÃO, D.R.L.; ALMEIDA, F.V.; HARAD, E.L.Y.; GRASSIB, M.T.; SODRÉA, F.F. Éteres Difenílicos Polibromados (PBDE) como contaminantes persistentes: ocorrência, comportamento no ambiente e estratégias analíticas. *Quim. Nova* 2018; 41(7): 782-795.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products* 1998; 61(7): 896–900.
- BARBOSA, A.M. *Produção de membranas biodegradáveis utilizando extratos de própolis vermelha e nim obtidos por extração com líquido pressurizado* [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2015.
- BASTOS, I.V.; OLIVEIRA, T.B.; RODRIGUES, M.D.; MILITAO, G.C.; SILVA, T.G.; TURATTI, I.C.; LOPES, N.P. et al. Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *Phoradendron mucronatum* and *Phoradendron microphyllum* (Viscaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2017; 89(2): 991-1001.
- BATISTA, C.M.; ALVES, A.V.F.; QUEIROZ, L.A.; LIMA, B.S.; FILHO, R.N.P.; ARAÚJO, A.A.S. The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology* 2018; 180: 198–207.
- BERRIDGE, M.V.; HERNEST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology anual review* 2005; 11(5): 127–152.
- BISCAIA, D.; FERREIRA, S.R. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 2009; 51(1), 17-23.
- BOSE, R.; KARTHAUS, W.R.; ARMÊNIA, J.; ABIDA, W.; IQUINTA, P.J.; ZHANG, Z. et al. ERF mutations reveal a balance of ETS factors controlling prostate oncogenesis. *Nature* 2017; 546(7660): 671–675.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2009.

BRITO, A.U.; CHAVES, F.C.M.; OKA, J.M.; AZEVEDO, M.M.B.; BATISTA, A.C. Produção de biomassa aérea, teor e rendimento de extrato das folhas de caju [Arrabidaea chica (Bonpl.) B. Verl.] em função de adubação orgânica em Manaus, estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2015; 17(3): 444-453.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G.V.J. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. *Rev J Agric Food Chem* 2013; 61: 4546-4550.

BUENO-SILVA, B.; KOO, H.; FALSETTA, M.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN P.L. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Rev Biofouling* 2013; 29(10):1233-1242.

BUENO-SILVA, B.; MARSOLA, A.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. *Natural Product Research* 2017; 31(11): 1318-1324.

CÂNDIDO SOBRINHO, S.A.; TORRES, M.A.; SILVA FILHO, E.A.T.; VASCONCELOS, F.R.; GUEDES, M.I.F.; LIMA, D.R. et al. POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO COGUMELO COMESTÍVEL *Pleurotus ostreatus* FRENTE À *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 E *Escherichia coli* ATCC 25922. *Caderno de Cultura e Ciência* 2017; 15: 98-103.

CARDOSO, J.E.T.; LODI, P.C.; BARROS, A.M.T.C.; BARROS, A.M.T.C. Técnicas Associadas de Remediação de Contaminação da Água e do Solo por Hidrocarbonetos: Estudo de Caso em Posto de Combustível. *Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades* 2017; 5(36).

CASTRO, R.G.; SILVA, T.L.S.; FAMBRINI, G.L.; SOUZA NETO, J.A.; PEREIRA, R. Caracterização geoquímica de folhelhos betuminosos da formação Ipubi, bacia do Araripe, NE Brasil. *Geochimica Brasiliensis* 2008; 22(2): 103-112.

CAVENDISH, L.R.; SANTOS, J.S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; ARAUJO, E.D. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 173: 127-133.

CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O.G.; CALIXTO, J.B. Fungicide and fungistatic effects of xanthoxylone. *Journal of Ethnopharmacology* 1996; 53: 171-173.

CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O.G.; CALIXTO, J.B. Antispasmodic activity of Xanthoxylone derivatives structure activity relationships. *J. Pharm. Sci* 1995; 84: 473- 475.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; TIXIER, A.S.F.; ABERT-VIAN, M.; CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Rev Ultrasonics Sonochemistry* 2017; 34(1): 540-560.

CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA I.; KRÓL, W. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules* 2015; 20: 1610-1625.

COLINA-COCA, C.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C. Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats. *Journal of Functional Foods* 2017; 36: 300-309.

CORRÊA, F.R.S.; SCHANUEL, F.S.; MOURA-NUNES, N.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; DALEPRANE, J.B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 86: 162-171.

- COSTA, A.M.; SILVA, V.V. ESTRATÉGIAS NANOTECNOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER. *Revista Saúde e Meio Ambiente* 2017; 5(2): 1–13.
- DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; LENISE, M.; GUEDES, S. TRITERPENOS E FERULATOS DE ALQUILA DE *Maprounea guianensis*. *Quim. Nova* 2004; 27(1): 62-65.
- DIAS, G.T.; LIMA, C.M.B.L.; LIRA, A.B.; RAMALHO, J.A.; OLIVEIRA, K.M.; DINIZ, M.F.F.M. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. *Acta Brasiliensis* 2017; 1(1): 8.
- FAKHRY, C.; WESTRA, W.H.; WANG, S.J.; VAN ZANTE, A.; ZHANG, Y.; RETIRADO, E. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Câncer* 2017; 123(9): 1566–1575.
- FAVIER, L.; TONN, C.; GUERREIRO E.; ROTELLI U.M.; PELZER, L. Anti-inflammatory activity of acetophenones from *Ophryosporus axilliflorus*. *Planta Med.* 1998; 64: 657-659.
- FELIPE, L.O.; BICAS, J.L. Terpenos: compostos majoritários de óleos essenciais. *Química e Sociedade* 2016; 39(2): 120–130.
- FENALTI, J.M.; BACCEGA, B.; SANTOS, T.M.; SANTOS, P.C.; CARLOS JAMES SCAINI, C.J. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. *Rev. Vittal* 2016; 28(1): 39-48.
- FEUEREISEN, M.M.; BARRAZA, G.M.; ZIMMERMANN, B.F.; SCHIEBER, A.; SCHULZE-KAYSERS, N. Pressurized liquid extraction of anthocyanins and biflavonoids from *Schinus terebinthifolius* Raddi: A multivariate optimization. *Rev Food Chemistry* 2016; 2(14): 564-571.
- FINOTTI, A.R.; TEIXEIRA, C.E.; FREDIZZI, F.; CALGLIARI, J.; FILHO, I.N. Avaliação da influência do etanol sobre o grau de volatilização BTEX em solos impactados por derrames de gasolina/etanol. *Revista Engenharia Sanitária Ambiental* 2009 14(4): 443-448.
- FLORIANI, N.; VALDIR, V.; FILHO, C.; DELLE, M.; F.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE *Cynara scolymus* L. (ALCACHOFA) CULTIVADA NO BRASIL. *Quim. Nova* 2003; 26(3): 331-334.
- FRANZEN, L.F.; FRIES, L.L.M.; OLIVEIRA, M.S.R.; LIDÓRIO, H.F.; MENEGAES, J.F.; LOPES, S.J. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. *Acta Iguazu* 2018; 7(1): 9–21.
- FROZZA, C.O.S.; SANTOS, D.A.; RUFATTO, L.C.; SCARIOT, F.J.; ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017; 91: 951–963.
- FURNARI, F.B.; FENTON, T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J.M.; STEGH, A. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Development* 2007; 21: 2683-2710.
- GAD-SHAYNE C 2009. Alternatives to in vivo studies in toxicology. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen TLM, General and Applied Toxicology. v.6, John Wiley & Sons Inc.
- GALLO, M.B.C.; SARACHINE, M.J. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2009; 3(Special Issue 1): 46-66.
- GALLO, M.B.C.; MIRANDA J.; SARACHINE. Biological Activities of Lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2009; 3(1): 46–66.
- GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76(1): 77–80.
- GOMES, S.V.F.; PORTUGAL, L.A.; ANJOS, J.P.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-

- Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal* 2017; 132(1): 28-35.
- GONÇALVES, R.C.F.; TEODORO, M.M.G.; MACHADO, A.M.R.; GOMES, F.C.O.; BADOTTI, F.; CARDOSO, M.G. Compostos voláteis em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea. *MAGISTRA* 2006; 28(3/4): 285–293.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Rev Cell* 2011; 144(5): 646-674.
- HE, Q.; DU, B.; XU, B. Extraction Optimization of Phenolics and Antioxidants from Black Goji Berry by Accelerated Solvent Extractor Using Response Surface Methodology. *Appl. Sci.* 2018; 8: 1905.
- IDRUS, N.F.M.; YIAN, L.N.; IDHAM, Z.; ARIS, N.A.; PUTRA, N.R.; AZIZ, A.H.A. et al. Mini review: Application of supercritical carbon dioxide in extraction of propolis extract. *Synthesis* 2018; 14(4): 397-402.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2018
- KHAN, I.; BAJPAI, V. K.; CHUL, S.; BAHUGUNA, A.; KANG, S. C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Article in Bangladesh Journal of Pharmacology* 2017; 12: 115–118.
- KONISHI, S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CUSTÓDIO, A.R.; CUNHA, I.B.; SILVA, I.; SHIMIZU, M.T. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de 33 própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. *Rev Mensagem Doce* 2004; 75(1): 22-25.
- KWEIFIO-OKAI, G.; CARROLL, A.R. Antiarthritic effect of lupeol acetate. *Phytotherapy Research* 1993; 7(2): 213–215.
- LI, L.S.; GAN, R.; SONG, F.; KUANG, L.; LI, H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Rev Industrial Crops and Products* 2013; 2(51): 289-298.
- LIRA, W.M.; SANTOS, F.V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Modulatory Effect of *Byrsonima basiloba* Extracts on the Mutagenicity of Certain Direct and Indirect-Acting Mutagens in *Salmonella typhimurium* Assays. *Journal of Medicinal Food* 2008; 11(1): 111–119.
- LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET A. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2): 97-109.
- LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Propolis: Atualizações sobre a química e a farmacologia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008 18(3): 447–454.
- MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, A.S.; COSTA, S.S.; SILVA, R.P.D.; SILVA, D.F. et al. Determination of Parameters for the Super critical Extraction of Antioxidant Compounds from Green Propolis Using Carbon Dioxide and Ethanol as Co-Solvent. *PLoS ONE* 2015; 10(8): 1-26.
- MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O.; LOTUFO, LV.C.; MAGALHÃES, H.I.F.; MORAES, M.O. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2011; 21(3): 456–464.

- MAIA, Y.L.F.; SOUZA, C.O.; DRUZIAN, J.I.; PADILHA, F.F.; ORELLANA, S.C. Uso de biofilme de amido à base de própolis vermelha para a conservação de folhas de alface (*Lactuca sativa*). *Scientia Plena* 2013; 8(12A): 1–8.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature reviews câncer* 2002; 2: 143-148.
- MARTINS, M.L.; LEITE, K.L.F.; PACHECO-FILHO, E.F.; PEREIRA, A.F.M.; ROMANOS, M.T.V.; MAIA, L.C. *et al.* Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Archives of Oral Biology* 2018; 93: 56–65.
- MATTANA, R.S.; MAIA E ALMEIDA, C.I.; OLIVEIRA, P.F.C.; LIMA, L.P.; HABER, L.L.; MING, L.C.; MARQUES, M.O. Efeitos de diferentes tempos de extração no teor e composição química do óleo essencial de folhas de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.]. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2015; 17(1): 150–156.
- MIRON, T.L.; PLAZA, M.; BAHRIM, G.; IBANEZ, E.; HERRERO, M. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Rev Journal of Chromatography A* 2011; 12(18): 4918-4927.
- MISHRA, T.; ARYA, R.K.; MEENA, S.; JOSHI, P.; PAL, M.; MEENA, B. *et al.* Isolation, characterization and anticancer potential of cytotoxic triterpenes from *Betula utilis* bark. *PloS one* 2016; 11(7): 1-14.
- MONROY Y M.; RODRIGUES, R.A.F.; RODRIGUES, M.V.N.; CABRAL, F.A. Fractionation of ethanolic and hydroalcoholic extracts of green propolis using supercritical carbon dioxide as an anti-solvent to obtain artemillin rich-extract. *The Journal of Supercritical Fluids* 2018; 138: 167-173.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.
- NASCIMENTO, T.G.; SILVA, P.F.; AZEVEDO, L.F.; ROCHA, L.G.; MORAES PORTO I.C.; LIMA E MOURA T.F. *et al.* Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Research Letters* 2016; 11(1): 301.
- NIERO, R.; AMARAL, F.L.; PIZZOLATTI M.G.; CALIXTO, J.B.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. Isolation of triterpenes and an acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. Ex Boiss (Euphorbiaceae). *Acta Farmacéutica Boanaerense* 1996; 15: 239-242.
- NIGAM, N.; PRASAD, S.; SHUKLA, Y. Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin. *Food and Chemical Toxicology* 2007; 45(11): 2331–2335.
- NORIEGA, P.; RÖPKE, C.D.; CAMILO, C.M.; FREITAS, P.C.D.; BARROS, S.B.M.; NORIEGA, P. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005; 41(2).
- NOVAK, E.M.; SILVA, M.S.C.; MARCUCCI, M.C.; SAWAYA, A.C.H.F.; LÓPEZ, B.G.C.; FORTES, M. *et al.* Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. *Rev J Funct Food* 2014; 11: 91-102.
- NUNES, L.C.C.; GALINDO, A.B.; DEUS, A.D.S.O.; RUFINO, R.D.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H.S. *et al.* Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2009; 19(2): 524–529.

- NUNES, L.C.C.; GALINDO, A.B.; LUSTOSA, S.R.; BRASILEIRO, M.T.; EGITO, A.A.; FREITAS, R.M.; *et al.* Influence of Seasonal Variation on Antioxidant and Total Phenol Activity of Red Propolis Extracts. *Advanced Studies in Biology* 2013; 5(3): 119–133.
- NYABOKE, H.O.; MORAA, M.; OMOSA, L.K.; MBAVENG, A.T.; VADERAMENT-ALEXE, N.N.; MASILA, V. *et al.* Cytotoxicity of Lupeol from the Stem Bark of *Zanthoxylum gillettii* against Multi-factorial Drug Resistant Cancer Cell Lines. *Investigational Medicinal Chemistry and Pharmacology* 2018; 1(1):10.
- OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clac-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 2016; 18(1): 230–239.
- ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Controle integral do câncer do colo do útero. Guia de práticas essenciais. Washington, 2016.
- PAIVA, M.D.E.B.; BIASE, T.C.G.; MORAES, J.J.C.; ANGELO, A.R.; HONORATO, M.C.T.M. Complicações orais decorrentes da terapia antineoplásica. *Rev Arquivos em Odontologia* 2010; 46(1): 48-55.
- PANIS, C.; KAWASAKI, A.C.B.; PASCOTTO, C.R.; JUSTINA, E.Y.D.; VICENTINI, G.E.; LÉIA CAROLINA LUCIO, L.C.; PRATES, R.T.C. Revisão crítica da mortalidade por câncer usando registros hospitalares e anos potenciais de vida perdidos. *Einstein* (São Paulo) 2018;16(1): 1-7.
- PAULA, C. D; BARROS, F. J. S; CORREIA, L. M; VIEIRA, R. S. Avaliação de catalisador a base de conchas de ostras para a produção de biodiesel utilizando planejamento fatorial. *HOLOS* 2017; 1, 316-324.
- PELLATI, F.; PRENCIPE, F.P.; BENVENUTI, S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; 84: 103–111.
- PITCHAI, D.; ROY, A.; IGNATIUS, C. In vitro evaluation of anticancer potentials of lupeol isolated from *Elephantopus scaber* L. on MCF-7 cell line. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2014; 5(4): 179.
- POST, R.S.V.D.; DIEREN, J.V.; GRELACK, A.; HOOGERBRUGGE, N.; KOLK, L.E.V.D.; SNAEBJORNSSON, P. *et al.* Outcomes of screening gastroscopy in first-degree relatives of patients fulfilling hereditary diffuse gastric cancer criteria. *Gastrointestinal Endoscopy* 2018; 87(2): 397–404.
- RAI, Y.; PATHAK, R.; KUMARI, N.; SAH, D. K.; PANDEY, S.; KALRA, N. *et al.* Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 1531.
- RAMIREZ-CADAVIDA, D.A.; VALLES-RAMIREZA, S.; CORNISHA, K.; JÚNIOR MICHEL, F.C. Simultaneous quantification of rubber, inulin, and resins in *Taraxacum koksaghyz* (TK) roots by sequential solvent extraction. *Industrial Crops & Products* 2018; 122: 647–656.
- REGUEIRA-NETO, M.S.; TINTINO, S.R.; ROLÓN, M.; CORONAL, C.; VEGA, M. C.; BALBINO, V.Q.; COUTINHO, H.D.M. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. *Food and Chemical Toxicology* 2018; 119: 215–221.
- RIBEIRO, D.R.; ALVES A.V.; DOS SANTOS, E.P, PADILHA, F.F.; GOMES, M.Z.; RABELO, A.S. *et al.* Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Rev Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015; 117(2): 85-95.

- RUFATTO, L. C.; LUCHTENBERG, P.; GARCIA, C.; THOMASSIGNY, C.; BOUTTIER, S.; HENRIQUES, J. A. P. *et al.* Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiological Research* 2018; 214: 74-82.
- SALEEM, M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004; 23(30): 5203–5214.
- SAMPAIO, J; COSTA, M.F. MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA DOR EM CRIANÇAS COM CÂNCER. *Alumni revista discente da UNIABEU* 2013; 5(10): 4-13.
- SANCHES, M.A.; PEREIRA, S.M.A.; SERRÃO, J.E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). *Rev Journal of Apicultural Research* 2017; 56(1): 50-57.
- SANTOS, J.A.A.; SANTOS, E.C.B.; MAGNATA, S.S.L.P.; GARCIA, J.E.; MARTINS, R.D. Diagnóstico e educação em saúde no uso de plantas medicinais: relato de experiência. *Rev. Ciênc. Ext.* 2016; 12(4): 183-196.
- SANTOS, M.S.; PETKOWICZ, C.L.O.; HAMINIUK, C.W.I.; CÂNDIDO, L.M.B. Polissacarídeos extraídos da gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): propriedades químicas e perfil reológico. *Polímeros* 2010; 20(5): 352–358.
- SANTOS, R.L.; PEREIRA, D.S.; XAVIER JÚNIOR, S.R.; VENTURIERI, G.C. Levantamento fitogeográfico de Dalbergia L.f. (Leguminosae-papilionoideae) com potencial produtivo para própolis vermelha no Estado do Pará. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 2017; 12(3): 590
- SARMENTO-NETO, J.F., DO NASCIMENTO, L.G., FELIPE, C.F.B., DE SOUSA, D.P. Analgesic potential of essential oils. *Molecules* 2015; 23; 21(1): 1-29.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; RASLAN, D.S.; OLIVEIRA, A.B. In Vitro Antitumor Activity of Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpa*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2014; 16(2): 275–282
- SAYYAH, M.; VALIZADEH, J.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis*, against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine* 2002; 9: 212-216.
- SCHEIN, C.F.; MARQUES, A.R.; VARGAS, C.L.; KIRSTEN, V.R. Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados. *Disc. Scientia. Série Ciencias da Saúde* 2006; 7(1): 101–107.
- SENA-LOPES, A.; BEZERRA, F.S.B.; NEVES, R.N.; PINHO, R.B.; SILVA M.T.O.; SAVEGNAGO, L. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLOS ONE* 2018; 13(2).
- SETLIK, J.; SILVA, R.C. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não melanoma. *Rev. Saúde de Desenvolvimento* 2015; 7(4): 195-206.
- SETZER, W.; SETZER, M. Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2003; 3(6): 540–556.
- SHOUQIN, Z.; JUN, X.; CHANGZHENG, W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2005; 80: 50-54.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; FEDEWA, S.A.; AHNEN, D.J.; MEESTER, R.G.S.; BARZI, A.; JEMAL, A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians* 2017; 67(3): 177–193.

- SILVEIRA, M.V.; LOPES, T.J.; ROSA, G.R. N-arilação do imidazol via Cul: um tutorial para otimização de um sistema catalítico através do planejamento experimental. *Educación Química* 2017; 28(1): 44-50.
- SIQUEIRA, A.L.; DANTAS, C.G.; GOMES, M.Z; PADILHA, F.F.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. *Rev Odontol UNESP* 2014; 43(6): 359-366
- SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras, Ed. UFC: 2004
- SOUSA, S.A.A.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.A. Constituintes do óleo essencial da própolis produzida na cidade de Pío IX- Piauí. *Rev. Brasileira de Plantas Medicinais* 2006; 8(4): 1-3.
- SUNDAR, S.K.; SUDARKODI, C. Anticancer activity of l-asparaginase from *aspergillus oryzae* against hep g2 and hela cell lines. *International Journal of Recent Scientific Research* 2018; 9(3): 25328–25330.
- SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 2001; 72(5): 516–523.
- TEDESSE, S.K. Socio-economic and cultural vulnerabilities to cervical cancer and challenges faced by patients attending care at Tikur Anbessa Hospital: a cross sectional and qualitative study. *Rev BMC Women's Health* 2015; 15(75): 2-12.
- THOMPSON, R.Q. Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition (Worsfold, Paul; Tonshend, Alan; Poole, Colin), in: Journal of Chemical Education. Division of Chemical Education, p. 1313. 2005
- TORRES, D.; PREIRA, E.C.V.; SAMPAIO, P.A.; SOUZA, N.A.C.; FERRAZ, C.A.A.; OLIVEIRA, A.P. *et al.* Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *cnidoscolus quercifolius pohl* (euphorbiaceae) e atividade antioxidante. *Química Nova* 2018; 41(7): 743–747.
- VAJRABHAYA, L.-O.; KORSUWANNAWONG, S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *Journal of Analytical Science and Technology* 2018; 9(15): 1–6.
- VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg - *Myrtaceae*. *Revista Instituto Florestal* 2006; 18: 15–22.
- VIEIRA, H.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ell-pbt) para piretróides em água e análise por cg. *Química Nova* 2007; 30(3): 535–540.
- WU, J.; ZHOU, T.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; XUAN, L. Cytotoxic Terpenoids from the Fruits of *Vitex trifolia* L. *Letter Planta Med* 2009; 75: 367–370.
- ZENI, A.L.B.; PARISOTTO, A.V.; MATTOS, G.; HELENA, E.T.S. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 2017; 22(8): 2703–2712.
- ZHAO, M.; ARAÚJO M.M.; DAL, S.; SIGRIST, S.; BERGAENTZLÉ, M.; RAMANITRAHASIMBOLA, D. *et al.* Development and validation of a selective and effective pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry method for 36 the determination of fructosazine analogues in the ammonia treated extract of *Eugenia jambolana* Lamarck seeds. *Rev Journal of Chromatography A* 2016; 14(73): 66-75.

ZORDI, N.; CORTESI, A.; KIKIC, I.; MONEGHINI, M.; SOLINAS, D.; INNOCENTI, G., et al. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis: a central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids* 2014; 95; 491-498.