

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

INGRITHY VENDRUSCOLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL DE EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DE PRÓPOLIS**

FRANCISCO BELTRÃO

2021

INGRITHY VENDRUSCOLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL DE EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DE PRÓPOLIS**

Evaluation of cytotoxic/antitumoral activity of propolis hydroalcoholic extract

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Elisângela Düsman.

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a. Irede Angela Lucini Dalmolin e Prof^a. Dr^a Maria Helene Giovanetti Canteri.

FRANCISCO BELTRÃO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

INGRITHY VENDRUSCOLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL DE EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DE PRÓPOLIS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 10 de dezembro de 2021.

Elisângela Düsman
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Irede Angela Lucini Dalmolin
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maria Helene Giovanetti Canteri
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.”

FRANCISCO BELTRÃO

2021

“Dedico este trabalho

A Deus, por ter me abençoado e guiado para chegar até aqui e realizar esse grande sonho de ter uma formação.

Aos meus pais, Darci Vendruscolo e Veronise Sautier, por sempre me apoiarem com todo amor e carinho, por toda a compreensão e incentivos constantes que, com certeza, contribuíram muito para que fosse possível essa conquista.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por toda a força e coragem que Ele me deu, me ajudando a não desistir nos momentos de dificuldade. Com fé e orações me mantive forte, concentrada e disciplinada para chegar até aqui.

Especialmente, quero agradecer a minha família, de modo especial ao meu pai, Darci Vendruscolo e minha mãe, Veronise Sautier, que sempre me apoiaram, auxiliaram e que mesmo com as dificuldades sempre se esforçaram para me dar uma educação de qualidade. Ao meu irmão, Deivid Vendruscolo, agradeço o apoio e por acreditar em mim. Ao meu namorado, Carlos Alberto Oliveira, agradeço por cuidar de mim e por sempre estar comigo nesses momentos difíceis e complicados durante a graduação. Ao meu tio postigo, Jaime Zanella, pelo amigo e irmão que é para meus pais, por sempre nos ajudar e considerar nós como da sua família. Aos meus sogros Karolina Moromizatto e Clóvis Oliveira por sempre me incentivarem e ajudarem como possível. As minhas avós Iracema Sautier e Olga Vendruscolo que sempre estiveram orando por mim e pelo meu sucesso. E aos outros familiares, pois certamente este parágrafo não irá atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas de que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Também gostaria de agradecer meus amigos e colegas de laboratório, Guilherme Berton e Mariana Biffi, que sempre estiveram comigo durante a realização desse projeto, me ajudando e auxiliando nos experimentos. Igualmente aos meus amigos e colegas de sala, Bruna Bernabé, Bruno dos Santos, João Airoldi, Jonas Rektenvald, Josceana knob, Kauany Pelizari e Laura Miranda, obrigada por toda a amizade e carinho.

Agradeço à minha orientadora Elisângela Düsman, por todo o carinho, dedicação e orientação para a realização desse projeto. Também agradeço à minha coorientadora Irede Dalmolin, por trazer o tema desse trabalho e acreditar em mim para a realização dele e por me fornecer todos os conhecimentos de engenharia necessários. À minha coorientadora, Maria Helene, que não mediu esforços e teve toda a paciência para me ajudar a realizar este trabalho.

Por fim, agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus de Francisco Beltrão, que em todos esses anos me deu oportunidades para a construção da minha vida acadêmica; aos técnicos laboratoristas, por sempre me auxiliarem e estarem a disposição quando precisei. E a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte do meu trajeto, mais uma vez, muito obrigada.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”

Martin Luther King

RESUMO

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas, oriundo de brotos e botões florais de várias plantas, nas quais as abelhas adicionam secreções salivares, cera e pólen, completando sua composição. A própolis marrom é originada do sul do Brasil e apresenta grandes benefícios a saúde humana, devido ao conteúdo de compostos fenólicos encontrados na sua composição, importantes substâncias antioxidantes, impedindo malefícios causados pela oxidação. Com isso, o objetivo do presente estudo foi extrair compostos hidroalcóolicos da própolis marrom e avaliar sua atividade citotóxica frente células normais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2) e tumorais de fígado humano (HuH7.5), visando entender melhor o efeito desta própolis. O planejamento experimental para a produção do extrato, um DCCR (delineamento composto central rotacional) 2² com duas variáveis independentes (temperatura e concentração do solvente), mostrou que a temperatura de 80 °C e a concentração de 90% etanol e 10% água foram as melhores condições de extração sólido-líquido, em termos de compostos fenólicos. A determinação da capacidade antioxidante do extrato hidroalcóolico de própolis resultou em uma EC₅₀ igual a 3,34 ± 0,29 mg mL⁻¹ após 30 minutos de inibição. A análise físico-química deste extrato mostrou que possui caráter ácido, com valor de pH 4,77, 15,85% de acidez total, pouca umidade e cinzas totais, com um percentual de 0,72% e 0,017%, respectivamente; a percentagem de lipídios foi 4,44%, com valor de sólidos solúveis de 21,75 °Brix, além de não apresentar valores significantes de açúcares totais. O teste de citotoxicidade do MTT com as células LLC-MK2 não apresentou resultado estatisticamente diferente do controle negativo e, por isso, não apresentou efeito citotóxico para as células normais renais do presente estudo. Já para as células de carcinoma hepatocelular humano (HuH7.5) as diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100 µg mL⁻¹) apresentaram absorvâncias médias menores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica efeito citotóxico/antiproliferativo para essas células tumorais nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Assim, os dados do presente estudo demonstraram que esse produto merece destaque na busca de novas descobertas para identificar melhores atividades biológicas do extrato hidroalcóolico de própolis marrom.

Palavras-chave: própolis marrom; HuH7.5; LLC-MK2; MTT.

ABSTRACT

Propolis is a natural product produced by bees, coming from the buds and flower buds of various plants to which bees add salivary secretions, wax and pollen, completing its composition. Brown propolis originates from southern Brazil and has great benefits to human health, due to the content of phenolic compounds found in its composition, important antioxidant substances, preventing damage caused by oxidation. Thus, the aim of the present study was to extract hydroalcoholic compounds from brown propolis and evaluate their cytotoxic activity against normal *Macaca mullata* kidney cells (LLC-MK2) and human liver tumor cells (HuH7.5), in order to better understand the effect of this propolis. The experimental design to produce the extract, a DCCR (central composite rotational design) 2^2 with two independent variables (temperature and solvent concentration), showed that the temperature of 80 °C and at a concentration of 90% ethanol and 10% water were the better solid-liquid extraction conditions, in terms of phenolic compounds. The determination of the antioxidant capacity of the hydroalcoholic propolis extract resulted in an EC50 equal to $3.34 \pm 0.29 \text{ mg mL}^{-1}$ after 30 minutes of inhibition. The physicochemical analysis of this extract showed that it has an acidic character, with a pH value of 4.77, 15.85% of total acidity, low moisture and total ash, with a percentage of 0.72% and 0.017%, respectively, the percentage of lipids was 4.44%, with a soluble solids value of 21.75°Brix, in addition to not presenting significant values of total sugars. The MTT cytotoxicity test with LLC-MK2 cells did not show a result statistically different from the negative control and, therefore, did not show a cytotoxic effect for the normal renal cells in the present study. As for human hepatocellular carcinoma cells (HuH7.5) the different concentrations (0.25; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) presented lower mean absorbances and statistically different from the negative control, which indicates a cytotoxic/antiproliferative effect for these tumor cells at times of 24, 48 and 72 hours. Thus, the data from the present study showed that this product deserves to be highlighted in the search for new discoveries to identify better biological activities of the hydroalcoholic extract of brown propolis.

Keywords: Brown propolis; HuH7.5; LLC-MK2; MTT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis codificados e reais do planejamento central composto (DCCR) com 2 fatores na extração de compostos fenólicos da própolis marrom	26
Tabela 2 - Planejamento central composto (DCCR) detalhado com 2 fatores e cinco níveis na extração de compostos fenólicos da própolis marrom.....	27
Tabela 3 - Diluições do extrato de própolis marrom para a análise da capacidade de antioxidantes.....	28
Tabela 4 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio de extração com as diferentes concentrações de própolis marrom.....	31
Tabela 5 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio de extração com diferentes tempos de extração.....	33
Tabela 6 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio das extrações do planejamento experimental	34
Tabela 7 - Tabela ANOVA para determinação do teor de compostos fenólicos totais	35
Tabela 8 - Características físico-químicas do extrato etanólico de própolis marrom	38
Tabela 9: Percentual de viabilidade de células (VC) normais de rim de <i>Macaca Mullata</i> LLC-MK2, tratadas com o extrato etanólico de própolis marrom	40
Tabela 10: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado humano HuH7.5, tratadas com o extrato etanólico de própolis marrom.	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Calibração para quantificação do teor de fenólicos totais para a razão soluto solvente	31
Gráfico 2 - Calibração para quantificação do teor de fenólicos totais para diferentes tempos de extração.....	32
Gráfico 3. Calibração para quantificação do teor de fenólicos totais do planejamento central composto rotacional	34
Gráfico 4 - Gráfico de Pareto para a determinação de fenólicos totais	35
Gráfico 5 - Gráfico de Superfície de Resposta com dois fatores (concentração de etanol e temperatura) para a determinação do teor de compostos fenólicos.....	36
Gráfico 6: Curva da atividades antioxidante total do extrato hidroalcolico de própolis marrom em triplicata	37
Gráfico 7: Absorbância média e desvio-padrão de células normais de rim de <i>Macaca mulata</i> LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico de própolis marrom.	39
Gráfico 8: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado humano HuH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico de própolis marrom	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AAT	Atividade Antioxidante Total
CHC	Carcinoma hepatocelular
EC ₅₀	Concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% a do radical DPPH
SFE	Extração com fluido supercrítico
DF	Graus de liberdade
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INATEL	Instituto Nacional de Telecomunicações
HuH7.5	Linhagem de células de carcinoma hepatocelular adulto
A549	Linhagem de células humanas de adenocarcinoma pulmonar de não pequenas células
LLC-MK2	Linhagem de células normais de rim de Macaca mulata
MQ	Média Quadrática
MS	Ministério da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

AG	Ácido Gálico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio
MMS	Metil metanossulfonato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	Câncer	17
3.2	Alimentos funcionais	18
3.3.1	Própolis marrom	19
3.4	Atividades antioxidante da própolis	20
3.5	Extração de compostos	22
3.6	Teste de atividade citotóxica/antitumoral	23
3.6.1	Ensaio de citotoxicidade (MTT)	23
4	METODOLOGIA	25
4.1	Obtenção da própolis bruta	25
4.2	Obtenção dos extratos da própolis	25
4.2.1	Teste inicial para definição da razão soluto solvente	25
4.2.2	Modelagem de misturas para definição do tempo de extração	25
4.2.3	Otimização das condições de extração	26
4.3	Análises físico-químicas e de compostos bioativos	27
4.3.1	Análise de compostos fenólicos totais	27
4.3.2	Análise da capacidade antioxidante	28
4.3.3	Análises físico-químicas	28
4.4.1	Solução tratamento	29
4.4.2	Teste do MTT	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Determinação da condição da razão soluto solvente	31
5.2	Determinação da condição de tempo de extração	32
5.3	Determinação dos fatores do planejamento experimental	34
5.4	Determinação da capacidade antioxidante do extrato etanólico de própolis marrom	37
5.5	Características físico-químicas do extrato etanólico de própolis marrom	37
5.6	Avaliação da atividade antitumoral do extrato de própolis marrom	39
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles que, ao serem consumidos na dieta convencional, devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas. Dentre essas estão a capacidade de produzir efeitos metabólicos e apresentar componentes fisiologicamente ativos no organismo, capazes de regular funções corporais de forma a promover a saúde e, conseqüentemente, auxiliar na proteção contra doenças (BAPTISTA *et al.*, 2013; MACIEL *et al.*, 2018).

O termo “alimentos funcionais” surgiu no Japão na década de 1980, referindo-se aos alimentos que continham pelo menos um ingrediente com funções benéficas para a saúde. Também, para os quais tenham sido reivindicados seus efeitos fisiológicos no corpo humano e aprovados por entidades competentes (ADADI *et al.*, 2019).

Esses alimentos podem ser classificados pela presença de bioativos, por exemplo: básicos como a cenoura, com alto conteúdo de β -caroteno, produto que naturalmente contém bioativos; processados como iogurte e pré e/ou probióticos, nos quais adicionam-se bioativos durante seu processamento; fortificados, compostos naturalmente por bioativos, porém com uma quantidade alterada ou concentrada, como tomates contendo maior teor de licopeno; e com componentes eliminados, que seriam produtos alimentares com remoção com seu deletério removido ou reduzido e substituído por outro benigno (GUL *et al.*, 2016). Os compostos bioativos encontrados nos alimentos funcionais têm como objetivo agir em alvos fisiológicos específicos, melhorando a defesa antioxidante e de processos inflamatórios e mutagênicos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Nesse sentido, a própolis é um produto natural utilizado há muitos anos pela humanidade, com uso registrado desde o tempo dos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (PEREIRA *et al.*, 2015). Diversos estudos com a própolis apresentam propriedades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória, podendo proteger contra doenças como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (SAWICKA *et al.*, 2012; PASUPULETI *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS (2021), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, com estimativa de quase 10 milhões de mortes

no ano de 2020. E, por esse fato, muitas pessoas buscam por diversas possibilidades de tratamento/cura, incluindo plantas medicinais ou alimentos funcionais, por serem uma grande fonte de compostos com atividades citotóxica/antitumoral e farmacológica (CASSILETH *et al.*, 2004; DE ALMEIDA *et al.*, 2005; DE MELO *et al.*, 2012; ABUBAKAR *et al.*, 2020).

Estudos realizados por Park *et al.* (1998) apresentaram que os extratos com 60 a 80% do solvente orgânico etanol (com misturas de água destilada e etanol contendo 0 a 95% (v/v) de etanol) obtiveram atividade antioxidante e antimicrobiana para a extração de flavonoides da própolis.

Uma das formas mais utilizadas para avaliar a qualidade dos extratos obtidos e testar o efeito de citotoxicidade do composto na prática é ao teste do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio) (VAN MEERLOO *et al.*, 2011). Consiste em testes *in vivo* e *in vitro* realizados para testar o potencial de ação citotóxica de agentes quimioterápicos sobre tumores (SIMONETTI, 2004) e os efeitos sobre células normais. Nesses testes, destacam-se os ensaios com as células de carcinoma hepatocelular adulto (HuH7.5), estabelecida por Nakabayshi e colaboradores em 1982, a partir de hepatócitos bem diferenciados que foram originalmente retirados de um tumor de fígado em um homem japonês de 57 anos (MELLO, 2015). E, o uso de células normais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2), com o estudo do efeito citotóxico sobre essas células (DANTAS, 2016).

Com isso, o objetivo do presente estudo foi produzir e caracterizar o extrato hidroalcolólico de própolis marrom, produzido por meio de processo otimizado, e avaliar sua atividade citotóxica/antitumoral frente as linhagens de células tumorais HuH7.5 e normais LLC-MK2.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica/antitumoral de extrato hidroalcólico de própolis.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Testar variáveis do processo e solventes na extração sólido-líquido da própolis, para a obtenção de seu extrato hidroalcólico;
- b) Otimizar os parâmetros de extração para obtenção de maior rendimento de componentes antioxidantes;
- c) Caracterizar o extrato produzido em termos físico-químicos;
- d) Avaliar a atividade citotóxica/antitumoral do extrato de própolis em cultura de células normais e tumorais;
- e) Avaliar a eficiência de diferentes concentrações desse extrato, para determinar a melhor forma de uso para o tratamento de câncer.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Câncer

Segundo Ministério da Saúde - MS (2021), o câncer é um crescimento desordenado de células que ocupam órgãos e tecidos. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer – INCA (2021), essas células são naturalmente mais agressivas e incontroláveis, podendo se espalhar por todo o corpo.

As células cancerígenas podem ser classificadas como benignas ou malignas. No primeiro caso, o paciente sofre pouco risco de morte, pois o crescimento dessas células é mais lento e em uma parte específica do corpo. Já no segundo caso, o paciente fica mais debilitado e com maior risco de morte à curto, médio ou longo prazo, pois essas células são mais agressivas, têm um crescimento incontrolável e desordenado (GOMES; MILANEZ, 1997; INCA, 2020).

A carcinogênese é o processo de formação do câncer, em que as células normais se transformam em malignas, resultante de uma alteração no ácido desoxirribonucleico – DNA ou devido a uma lesão genética (FORD; MITCHELL, 2000). Podem ser denominados como sarcoma, quando se inicia em tecidos conjuntivos, como ossos, músculos ou cartilagem, ou denominado como carcinoma, quando ocorre em tecidos epiteliais, como peles e mucosas (INCA, 2019).

O processo de formação do câncer é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão tumoral. No estágio de iniciação, acontece a mutação no genótipo da célula ficando exposta à ação dos agentes cancerígenos. No estágio de promoção, a célula gera um clone com ação proliferativa que acarretará a progressão tumoral, levando ao aumento descontrolado das células (LIU *et al.*, 2015; INCA, 2019).

A prevenção dessa doença consiste em ações realizadas, como a prevenção primária, que incluiu evitar a exposição aos fatores de risco de câncer e criar hábitos de vida saudável; e a prevenção secundária, por meio da detecção e tratamento de doenças pré-malignas, como lesões causadas pelo vírus HPV ou pólipos nas paredes do intestino, ou cânceres assintomáticos iniciais (MISTURA *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2019; INCA, 2021).

Atualmente, os tratamentos de câncer em destaque são as quimioterapias, as radioterapias e as cirurgias. Porém, ainda ocorrem algumas insuficiências nesses

tratamentos e, com isso, as pessoas buscam por terapias alternativas como outra fonte de tratamento (CASSILETH *et al.*, 2004).

3.2 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais buscam maximizar as funções fisiológicas das pessoas para assegurar o bem-estar, a saúde e um melhor desempenho do potencial físico e cognitivo, ao mesmo tempo em que ajudam a minimizar riscos de doenças ao longo da vida (ROBERFROID, 2000). Os japoneses foram os primeiros a utilizar o termo “alimentos funcionais”, pois observaram que esses alimentos poderiam desempenhar um papel maior no organismo, além dos prazeres gastronômicos e fornecimento de nutrientes (PIMENTEL *et al.*, 2019).

No decorrer dos anos, esses alimentos com compostos bioativos foram cada vez mais estudados, apresentando grandes evidências sobre seus benefícios e mecanismos de ação (GALANAKIS, 2017). Estudos indicam que esses compostos bioativos encontrados nos alimentos têm a capacidade de agir no estresse oxidativo das células diretamente e nos fatores de transcrição operantes, apresentando resultados anti-inflamatórios (SOARES *et al.*, 2015).

Diante desses estudos, o interesse por alimentos com essas características tem aumentado. As pessoas estão buscando por uma melhor qualidade de vida e, com isso, o mercado mundial procura oferecer esses alimentos com substâncias que influenciam nos processos metabólicos ou fisiológicos (LUIZETTO *et al.*, 2015). Além de suas atividades biológicas, esses alimentos auxiliam na proteção contra câncer, trazendo a facilidade de combinar produtos comestíveis com moléculas biologicamente ativas (MORAES *et al.*, 2006; GUINDANI *et al.*, 2014).

Dessa forma, os alimentos funcionais merecem destaques na busca de novos estudos, por apresentarem características bioativas fornecendo nutrientes que possam contribuir no melhoramento das funções no corpo humano e auxiliar na prevenção de doenças, trazendo ênfase para novas terapias nutricionais (SOARES *et al.*, 2015).

3.3 Própolis

A palavra própolis tem origem grega, onde “pró” quer dizer à frente, antes ou defesa e “polis” significa cidade, em referência à defesa da colmeia (WAGH, 2013). A própolis é proveniente de um produto grudento coletado pelas abelhas, oriundo de brotos e botões florais de várias plantas, nas quais as abelhas adicionam secreções salivares, cera e pólen, completando sua composição (SOUZA *et al.*, 2016). Pode também ser conhecida como “cola de abelha” e/ou “cera negra”, sendo uma substância resinosa semelhante à cera natural (PEREIRA, 2002).

A própolis tem uma estrutura complexa e muitos de seus componentes ainda não foram identificados. Suas estruturas químicas e características estão relacionadas às regiões percorridas pelas abelhas, condições climáticas, variedade genética da colmeia, fonte botânica e época do ano de colheita (NOVAK *et al.*, 2014).

De forma geral, a composição bruta da própolis é dividida em 50% de resina de vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 05% de pólen e 05% de detritos (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2015). Também se encontram metabólitos secundários, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, além de vitaminas A, B1, B2, B6, C, H, P, e micronutrientes, como, ferro, cobre, manganês e zinco (AZEVEDO, 1986). A coloração da própolis varia do verde, ao vermelho e marrom. Tem odor característico e propriedades adesivas por causa de sua grande interatividade com óleos e proteínas da pele (AGUIAR *et al.*, 2018).

As características e propriedades de importância biológica e terapêutica dos compostos encontrados na própolis apresentam efeitos positivos reconhecidos e comprovados cientificamente para a saúde, dentre os quais se destacam a atividade antimicrobiana, antioxidante (PRADO *et al.*, 2013), anti-inflamatória (MOURA *et al.*, 2011), anti úlcera (HATA *et al.*, 2012), antissépticas e cicatrizantes (FREIRES, 2019), antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral, podendo auxiliar na prevenção de doenças crônicas como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (PASUPULETI *et al.*, 2017).

3.3.1 Própolis marrom

A própolis marrom (Figura 1) é oriunda do sul do Brasil, encontrada nos estados do Paraná e de Santa Catarina (MACHADO *et al.*, 2016a) e se origina da

espécie vegetal *Copaifera langsdorffii* (MACHADO *et al.*, 2015; PETER *et al.*, 2017). Sua composição química apresenta compostos fenólicos, vindos de ácidos benzoico e cinâmico, compostos fenólicos prenilados, flavonoides e Artepilin C (MACHADO *et al.*, 2016a).

Figura 1 - Própolis bruta marrom obtida em Francisco Beltrão – Paraná



Fonte: Autoria própria (2021)

Pimenta *et al.* (2015) evidenciaram a atividade biológica do extrato de própolis marrom, avaliando o potencial *in vitro* da própolis como medicação intracanal contra *Enterococcus faecalis*. Waller *et al.* (2017) encontraram ação antifúngica contra *Sporothrix brasiliensis* resistente a itraconazol.

Em relação às atividades antioxidantes, Machado *et al.* (2016a,b) concluíram que essas podem auxiliar na atividade antitumoral da própolis marrom, sendo que Popolo *et al.* (2009) demonstraram ação antiproliferativa do extrato de própolis marrom cubano contra as células de câncer de mama humano.

3.4 Atividades antioxidante da própolis

Muitos cânceres apresentam relação com os radicais livres, substâncias originadas durante o metabolismo no organismo (LIMA, 2006). Segundo o Instituto Nacional de Telecomunicações – INATEL (2021) esses radicais livres são moléculas inconstantes, com um elétron que tende a interagir de forma ágil com outras moléculas de carga positiva, com as quais pode reagir ou oxidar.

Os radicais livres são produzidos pelas células, durante a etapa de queima de respiração aeróbica utilizado no processo de converter os nutrientes dos alimentos consumidos em energia. Os radicais podem prejudicar as células benéficas do nosso corpo. Porém, o organismo consegue restabelecer 99% dos males provocados pela oxidação com enzimas protetoras, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (BARBOSA *et al.*, 2010; INATEL, 2021).

Mesmo o corpo humano tendo a capacidade de reparar as células saudáveis, alguns fatores, além do metabolismo, podem acarretar no excesso desses radicais livres, como, poluição ambiental, raios-X e radiação ultravioleta, cigarro, álcool, resíduos de pesticidas, substâncias presentes em alimentos e bebidas (aditivos químicos e hormônios), estresse e consumo excessivo de gorduras saturadas (frituras) (INATEL, 2021), que podem resultar em envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, reumáticas, osteoporose, neoplasias e outros (LIMA, 2006).

Dessa forma, para evitar que esses radicais livres se acumulem no organismo, estimula-se o consumo de alimentos com ação antioxidante que irão auxiliar no combate aos radicais livres, transformando-os em inofensivos. Uma alimentação rica em vitaminas C, E, A, com micronutrientes como zinco, selênio e licopeno são ótimas opções para se proteger contra os radicais livres, diminuindo assim o risco de várias doenças e evitando o envelhecimento precoce (INATEL, 2021).

Na própolis, a atividade antioxidante é especialmente oriunda da existência de compostos fenólicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e álcoois. Esses compostos são capazes de reduzir a peroxidação lipídica, impedir a ativação de enzimas incluídas na conversão de ácidos graxos poli-insaturados e na ativação de intermediários, como a fosfolipase A2, cicloxigenase e lipoxigenase, combatendo os radicais livres (MARCUCCI *et al.*, 1998; NAGAI *et al.*, 2003).

Na literatura, é possível encontrar um estudo que comprova os efeitos antioxidantes do extrato de própolis obtido por métodos variados, apresentando potencial antioxidantes para células tumorais humanas de glioblastoma, ovário e cólon (MENDONÇA *et al.*, 2015). Também se demonstram efeitos contra a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos (VALENTE *et al.*, 2011), e prevenção contra os radicais livres (ROCHA *et al.*, 2013; MOUHOUBI-TAFININE *et al.*, 2016; ZABAIYOU *et al.*, 2017).

3.5 Extração de compostos

As extrações podem ser realizadas por diferentes processos, métodos, solventes e tempos, com o objetivo de isolar compostos ativos encontrados em plantas medicinais e alimentos bioativos, a fim de se obter extratos com concentrações desses compostos na sua matriz sólida natural (FRANZEN *et al.*, 2018).

A extração da própolis pode ser realizada por diferentes técnicas convencionais, tais como infusão, maceração, Soxhlet, extração aquosa ou extração etanólica, e por métodos alternativos, como extração com fluido supercrítico (SFE) (BISCAIA; FERREIRA, 2009; BARROS *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2015). Podem ser utilizados vários tipos de solventes, como, água, metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano, éter e acetona (KUMAR *et al.*, 2008), sendo o etanol o solvente mais utilizado na obtenção do extrato da própolis (KUBILIENE *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2015)

A extração sólido-líquido, também denominada como lixiviação, ocorre quando um composto solúvel da matéria-prima sólida é extraído por um solvente líquido (TAKEUCHI *et al.*, 2008). Neste processo, a separação de um ou mais componentes (solutos) de uma solução é causada pela adição de um outro composto (solvente), sendo que o soluto é transferido de uma fase para outra com a qual tem mais afinidade (FERREIRA, 2013).

O processo geral da extração etanólica para obtenção do extrato da própolis é simples. Inicialmente, tritura-se a própolis bruta e adiciona-se uma porcentagem estabelecida de etanol. Em seguida, essa mistura é levada para um agitador ou *shaker*, onde acontece a extração dos compostos de interesse. Por fim, o sobrenadante é centrifugado e levado para uma estufa em uma temperatura de aproximadamente 50 °C para ocorrer a dessolventização (MACHADO *et al.*, 2016a).

Park *et al.* (1998) compararam a extração da própolis utilizando água e etanol e constataram que os extratos com 60 a 80% de etanol obtiveram melhores resultados para a obtenção dos compostos de interesse, como flavonoides.

3.6 Teste de atividade citotóxica/antitumoral

3.6.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

A citotoxicidade é caracterizada por um composto com potencial de induzir a morte celular, sendo uma das maneiras mais utilizadas para a avaliação biológica em estudos *in vitro*, que abrangem métodos para avaliar a toxicidade de biomateriais utilizando cultura de células. Testes de citotoxicidade têm sido reconhecidos internacionalmente devido aos grandes casos de mortalidade de câncer. A viabilidade celular pode ser demonstrada com auxílios de corantes vitais, diferenciando as células mortas das células vivas (ROGERO *et al.*, 2003).

O teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), por exemplo, é um ensaio colorimétrico que permite avaliar a qualidade dos extratos obtidos e testar o efeito de citotoxicidade de compostos. Esse determina a viabilidade das células por meio da succinato desidrogenase do ciclo de Krebs, que ativa as mitocôndrias das células vivas e promove a redução do sal tetrazolato, resultando numa coloração violácea avaliada por espectrofotometria (VAN MEERLOO *et al.*, 2011; PRABST *et al.*, 2017). Nessa técnica, são gerados os cristais de formazan, diretamente proporcionais ao número de células vivas (MOSMANN, 1983). Também se faz uso do metil metanossulfonato (MMS) que provoca a morte celular por apoptose, utilizado como controle positivo nos testes de citotoxicidade do MTT (JIANG *et al.*, 2012).

Dentre as linhagens celulares possíveis de serem utilizadas nesse teste podem-se citar as células de linhagem epitelial LLC-MK2, derivadas de um conjunto de células preparadas pela tripsinização dos rins de seis *Macaca mullata* (HULL *et al.*, 1962). É de grande importância avaliar o efeito de compostos e/ou extratos sobre células normais para se ter uma garantia de sua segurança alimentar, incluindo estudos de risco de consumo alimentar de substâncias que possam causar efeitos permanentes e hereditários ao ácido desoxirribonucleico (DNA), avaliação de mutagenicidade, ou efeitos nos ciclos de divisão celular (PANELLI-MARTINS, 2007). Já as células cancerosas HuH7.5, oriundas de um tumor de fígado de um homem japonês de 57 anos em 1982, podem ser utilizadas para avaliações de efeitos coadjuvantes benéficos à saúde humana, com atividade antitumoral (PANELLI-

MARTINS, 2007). Neste caso, os experimentos *in vitro* ainda podem ser realizados com o intuito de avaliar o efeito metabólico do fígado na toxicidade de diversos compostos (MELLO, 2015).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma neoplasia epitelial derivada dos hepatócitos, responsável por mais de 90% das neoplasias malignas primárias que prejudicam o fígado (KUMAR, *et al.*, 2014). Esse tipo de tumor tem uma formação característica de massa concentrada ou nódulos distribuídos no fígado, sendo a sexta doença maligna mais frequentemente diagnosticada no mundo e a terceira causa mais comum de mortalidade relativo ao câncer (GLOBOCAN, 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção da própolis bruta

A própolis bruta marrom foi adquirida comercialmente na cidade de Francisco Beltrão – Paraná. Cerca de 300 g foram utilizados para o processo total de extração.

4.2 Obtenção dos extratos da própolis

4.2.1 Teste inicial para definição da razão soluto solvente

Inicialmente, foi feito um experimento em condições fixas de tempo, temperatura e tipo de solvente para otimizar a quantidade de solvente em relação ao soluto, com extrato etanólico da própolis marrom, de acordo Machado *et al.* (2016b) com adaptações.

Foram misturados 10 mL de etanol P.A. aquecido cuidadosamente a 60 °C, com diferentes concentrações de própolis (0,05; 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 g). A extração ocorreu nessa mesma temperatura por um período de 30 minutos sob agitação constante em uma incubadora *shaker*, com rotação de 710 rpm. Depois, o extrato foi centrifugado a 3.700 rpm em um tempo 10 min a temperatura ambiente. Quando a centrifugação terminou, o sobrenadante foi transferido para um béquer de 50 mL e foi adicionado 10 mL de etanol P.A. ao resíduo, com agitação vigorosa em vórtex para homogeneização, sendo a centrifugação repetida. Foi observada a coloração dos extratos e a quantificação de fenólicos para definir a razão soluto solvente mais adequada.

4.2.2. Modelagem de misturas para definição do tempo de extração

Em função dos variados tempos de extração de própolis na literatura, foi avaliado esse fator por meio de um planejamento experimental não fatorial com diferentes tempos (5, 15, 30, 45, 60, 300 min), tendo como variável resposta o teor de fenólicos. O delineamento foi composto de 6 ensaios em triplicata.

A análise da diferença estatística entre os ensaios foi realizada no *software* livre SASM-Agri®, detectada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste t (5% de significância). O ponto com maior extração de fenólicos, considerando também o custo-benefício, foi utilizado para otimização das condições de extração apresentadas no item 4.2.3.

4.2.3 Otimização das condições de extração

Após definidas a razão soluto:solvente e o tempo de extração mais adequados, foi elaborado um delineamento central composto para otimização do tempo e mistura de solventes mais adequados para a extração de fenólicos da própolis. Visando encontrar a faixa de mais alto rendimento de extração de fenólicos, vários ensaios foram conduzidos, com o uso de um planejamento experimental de cinco níveis e três fatores, com três repetições do ponto central, denominado planejamento em estrela, segundo Barros Neto *et al.* (2001), ou ainda metodologia de superfície de resposta (do Inglês, RSM).

As variáveis independentes foram temperatura (em graus Celsius) e mistura de solventes (proporção (%) etanol:água). Os níveis reais e codificados das duas variáveis do experimento deslocado preliminar e final estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis codificados e reais do planejamento central composto (DCCR) com 2 fatores na extração de compostos fenólicos da própolis marrom

Variável		Níveis				
Codificados		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Reais	Mistura solvente (%) ^a	50	57,3	75	92,7	100
	Temperatura (°C) ^b	20	31,64	60	88,36	100

^a-percentagem aproximadas para quantidade de etanol; ^b- temperatura= ± 2 °C para considerar a diferença da temperatura de ebulição devido à pressão atmosférica

Fonte: Autoria própria (2021)

Os dados experimentais foram interpolados no programa *Statistica for Windows 5.0* para análise da variância fatorial e elaboração dos gráficos de superfície de resposta.

Após ter encontrado os parâmetros ótimos de extração, foi utilizado o ponto ótimo para obtenção de extrato em quantidade suficiente para as análises físico-químicas, de compostos bioativos e atividade biológica na cultura de células.

Na Tabela 2, encontra-se o planejamento experimental completo para extração de própolis marrom, com a indicação dos níveis reais e codificados.

Tabela 2 - Planejamento central composto (DCCR) detalhado com 2 fatores e cinco níveis na extração de compostos fenólicos da própolis marrom

Ensaio	Variável Codificada		Variável Aplicada	
	Mistura solvente (mL) (etanol)	Temperatura (°C)	Mistura solvente (mL) (etanol)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	57,3	31,64
2	-1	+1	57,3	88,36
3	+1	-1	92,7	31,64
4	+1	+1	92,7	88,36
5	-1,41	0	50	60
6	+1,41	0	100	60
7	0	-1,41	75	20
8	0	+1,41	75	100
9	0	0	75	60
10	0	0	75	60
11	0	0	75	60

Fonte: Autoria própria (2021)

4.3 Análises físico-químicas e de compostos bioativos

4.3.1 Análise de compostos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos de própolis foi feito o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Woisky e Salatino (1998) usando ácido gálico como padrão. A estimativa dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada em triplicata.

As amostras dos extratos da própolis marrom foram previamente diluídas em água Mili Q para ajustar a faixa de leitura no espectrofotômetro. Após foram adicionados 0,2 mL dessa diluição com 8,3 mL de água Mili Q e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu puro em tubos de ensaios, agitado no vórtex e aguardado 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de solução de carbonato de sódio saturado a 20% e agitado novamente. As amostras permaneceram em repouso por 1 hora em temperatura ambiente e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 720 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis.

Para expressar os resultados, foi usada a curva padrão de ácido gálico (AG), com os valores de concentração equivalente a 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gerando uma equação da reta. Os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra ($\text{mg AG } 100\text{g}^{-1}$).

A análise estatística da variável resposta foi realizada pelo teste de variância ANOVA para estimar os parâmetros estatísticos. Os coeficientes do modelo foram analisados pelo teste t de *Student* a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.3.2 Análise da capacidade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante do extrato da própolis foi utilizado o método do sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), descrito por Yen e Wu (1999), que consiste na alteração da coloração violeta-escura característica do composto.

A amostra foi diluída em quatro proporções diferentes, como apresentada na Tabela 3. Após, 0,1 mL dessas diluições foram homogeneizadas com 3,9 mL de solução de DPPH. A absorbância foi medida a 515 nm, em triplicata, após a mistura ter descansado 30 minutos sob abrigo de luz. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se o gráfico de absorbâncias por diluição (mg mL^{-1}) e foi determinado a equação da reta. Para determinar a atividade antioxidante total (AAT) foi substituído a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH pelo y e encontrado o resultado que corresponde a amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}).

Tabela 3 - Diluições do extrato de própolis marrom para a análise da capacidade de antioxidantes

Diluição	Proporção (Extrato:Solvente)	Concentração (mg mL^{-1})
1	1:2	12,60
2	1:2,5	10,08
3	1:5	5,04
4	1:10	2,52

Fonte: Autoria própria (2021)

4.3.3 Análises físico-químicas

Para a realização das análises físico-químicas do extrato etanólico de própolis marrom foram seguidas as técnicas recomendadas no manual de Métodos Físico-químicos para análises de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008), no qual foi determinado o pH, acidez total, umidade, lipídios, sólidos solúveis, minerais e açúcares totais. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.4 Teste de citotoxicidade/atividade antitumoral

4.4.1 Solução Tratamento

O extrato produzido foi rotaevaporado e, após, diluído com 100µL de etanol PA e 900µL de meio de cultura. Após foram realizadas as diluições com meio de cultura suplementado com soro bovino fetal nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100 µg mL⁻¹.

4.4.2 Teste do MTT

As linhagens celulares (HuH7.5 e LLC-MK2) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementando com 10% de soro bovino fetal e incubadas em incubadora com 5% de CO₂, 95% de umidade e controle de temperatura à 37°C.

A realização do ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil etrazolium bromide] foi realizado como descrito por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, onde foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células HuH7.5 ou $1,0 \times 10^5$ células LLC-MK2. Após 24 horas, para permitir a estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100 µL dos tratamentos: meio de cultura (controle negativo), agente citotóxico metilmetanossulfonato (MMS – 500 µM) (controle positivo), meio de cultura com etanol (controle solvente com concentração de 10 µL de etanol por mL de meio de cultura suplementado com soro bovino) e tratamentos com a diferentes concentrações do extrato da própolis.

Após passar os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação de cada placa, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura com MTT (0,167 mg mL⁻¹) e foram incubadas por mais 4 horas. Por fim, foi descartado o meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan, onde foi realizado a leitura das absorbâncias em leituras de microplacas (Thermo Plate) a 560 nm utilizando a espectrofotômetro UV-Vis.

Para apresentar os resultados que foram obtidos, foi realizado o cálculo da média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*) e ao teste de normalidade, seguido do teste de comparação de médias

de Dunnet (n=4), com o uso do *software Action Stat*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p for menor que 0,05.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento e a absorbância do controle negativo, como mostra na Equação 1.

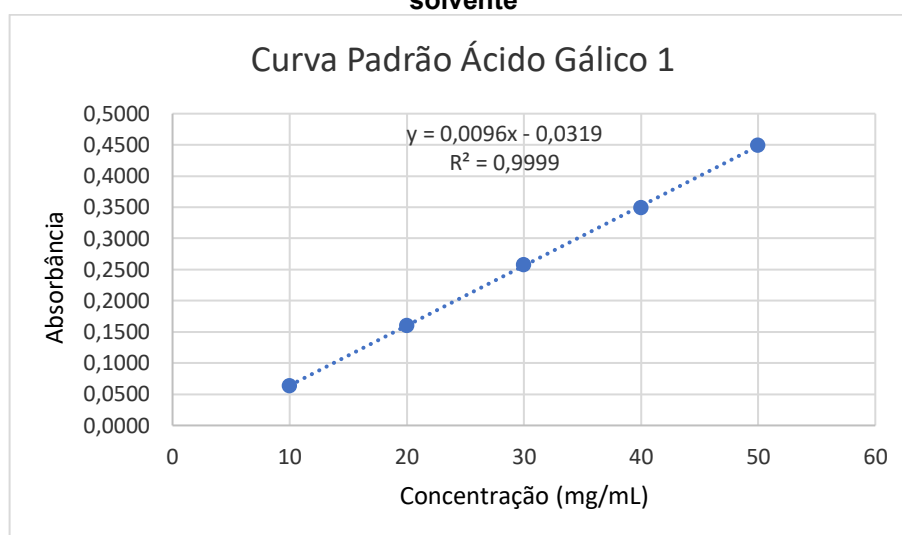
$$VC = \frac{ABS_{\text{tratamento}}}{ABS_{\text{controlenegativo}}} \cdot 100 \quad (1)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação da condição da razão soluto solvente

Primeiramente, para determinação da condição da razão soluto solvente a quantificação do teor de fenólicos totais foi realizada utilizando a equação da reta do ácido gálico como padrão (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Calibração para quantificação do teor de fenólicos totais para a razão soluto solvente



Fonte: Autoria Própria (2021)

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos, obtidos pela realização do teste inicial do item 4.2.1 para determinar a razão soluto solvente estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio de extração com as diferentes concentrações de própolis marrom

Ensaio	Massa de Própolis bruta (g)	Compostos Fenólicos ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
		Média \pm Desvio Padrão
1	1,0	22,07 \pm 0,02 ^e
2	0,5	24,66 \pm 0,59 ^d
3	0,25	40,65\pm0,44^a
4	0,10	32,30 \pm 1,67 ^c
5	0,05	37,33 \pm 1,50 ^b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste-t, com nível de significância de 5%.

Fonte: Autoria própria (2021)

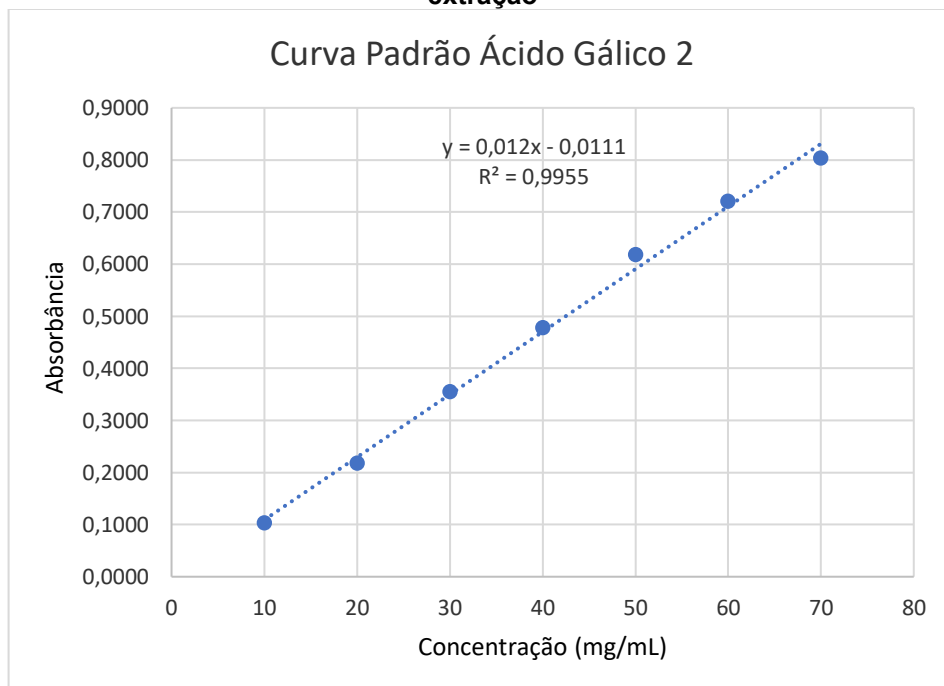
Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA, a fim de se obter os parâmetros significativos, principais efeitos e interações e modelos de correlação entre a variável experimental. Com base nos resultados de concentração de compostos fenólicos à influência da massa da própolis, é possível observar que os resultados foram estatisticamente significativos, sendo que o ensaio com 0,25 g de própolis bruta apresentou um melhor resultado, com $40,65 \mu\text{g mg}^{-1}$ de compostos fenólicos em seu ensaio.

Também vale ressaltar que nos extratos com concentrações de própolis acima de 1 g ocorreu precipitação e saturação do solvente, e dessa forma não foram realizadas as análises dos compostos fenólicos nesses ensaios. Silva *et al.* (2006) também observaram que a própolis apresentou maior precipitação do extrato dependendo da época do ano de colheita e origem das colmeias.

5.2 Determinação da condição de tempo de extração

Para a determinação da condição de tempo de extração, a quantificação do teor de fenólicos totais foi realizada utilizando a equação da reta do Gráfico 2, tendo o ácido gálico como padrão.

Gráfico 2 - Calibração para quantificação do teor de fenólicos totais para diferentes tempos de extração



Fonte: Autoria própria (2021)

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos, obtidos pela realização das extrações com diferentes tempos de extração do item 4.2.2, são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio de extração com diferentes tempos de extração

Ensaio	Tempo (min)	Compostos Fenólicos ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
		Média \pm Desvio Padrão
1	5	16,33 \pm 0,78 ^e
2	15	24,06 \pm 0,92 ^d
3	30	25,69 \pm 1,13 ^d
4	45	36,32 \pm 2,26 ^c
5	60	42,38\pm0,75^b
6	300	45,66 \pm 0,53 ^a

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste-t, com nível de significância de 5%.

Fonte: A autoria própria (2021)

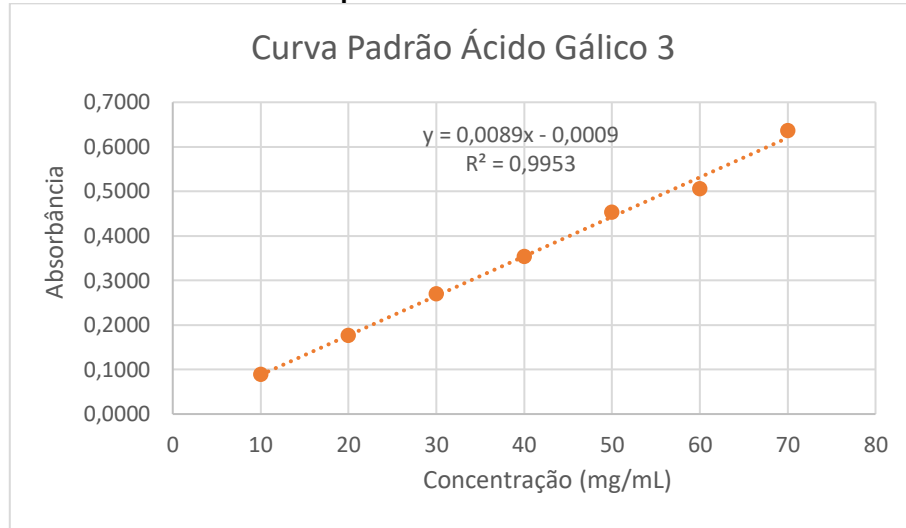
A análise dos dados foi realizada pelo teste de variância ANOVA. Com base nos resultados de concentração de compostos fenólicos sob influência do tempo de extração, é possível observar que os resultados foram estatisticamente significativos, sendo que o ensaio com extração de 5 horas (300 minutos) apresentou valor mais significativo de 45,66 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de composto fenólicos, porém analisando que a concentração na extração de 60 minutos, com 42,38 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de compostos fenólicos está próxima da extração de 5 horas e pensando em custo-benefício e tempo de trabalho, o tempo ideal de extração foi definido em 60 minutos.

Cabral *et al.* (2009) encontraram teor de 257,98 $\mu\text{g mg}^{-1}$ para o extrato de própolis vermelha submetida à extração de etanol 80% (v/v), a uma temperatura de 70 °C, em um banho de água termostaticado, durante 30 minutos, sendo o maior valor encontrado em amostras de própolis brasileiras, Já Gomes *et al.* (2016) obtiveram um valor de 26,1 mg mL^{-1} (33,04 $\mu\text{g mg}^{-1}$) de compostos fenólicos para o extrato de própolis marrom sujeita a uma extração alcoólica, em que foram utilizadas 35g da própolis bruta com agitação diária durante 45 dias em 65mL de álcool de cereais.

5.3 Determinação dos fatores do planejamento experimental

Para a determinação do teor de fenólicos totais do planejamento central composto rotacional foi utilizada a equação da reta do Gráfico 3, utilizando ácido gálico como padrão.

Gráfico 3. Calibração para quantificação do teor de fenólicos totais do planejamento central composto rotacional



Fonte: Autoria própria (2021)

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos, obtidos pela realização do planejamento experimental do item 4.2.3 para determinar a razão soluto solvente, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio das extrações do planejamento experimental

Ensaio	Variável Dependentes		
	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Compostos Fenólicos ($\mu\text{g mg}^{-1}$) Média \pm Desvio Padrão
1	57,3	31,64	6,31 \pm 0,11 ^h
2	57,3	88,36	39,72 \pm 0,39 ^b
3	92,7	31,64	17,84 \pm 0,06 ^f
4	92,7	88,36	44,36\pm0,08^a
5	50	60	19,02 \pm 0,44 ^e
6	100	60	24,17 \pm 0,22 ^d
7	75	20	10,55 \pm 0,03 ^g
8	75	100	23,79 \pm 0,22 ^d
9	75	60	28,35 \pm 0,00 ^c
10	75	60	28,52 \pm 0,16 ^c
11	75	60	28,43 \pm 0,09 ^c

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, com nível de significância de 5%.

Fonte: Autoria própria (2021)

Os resultados obtidos para o teor de fenólicos totais apresentaram valores bem distintos um do outro, sendo o mais alto o ensaio 4 com $44,36 \mu\text{g mg}^{-1}$ de compostos fenólicos na amostra.

Os resultados foram submetidos ao teste t de Student a 5% de significância ($p < 0,05$), a fim de investigar se os experimentos diferiam estatisticamente entre si ou não. A Tabela 7 apresenta os valores do efeito das variáveis independentes para a determinação do teor de compostos fenólicos.

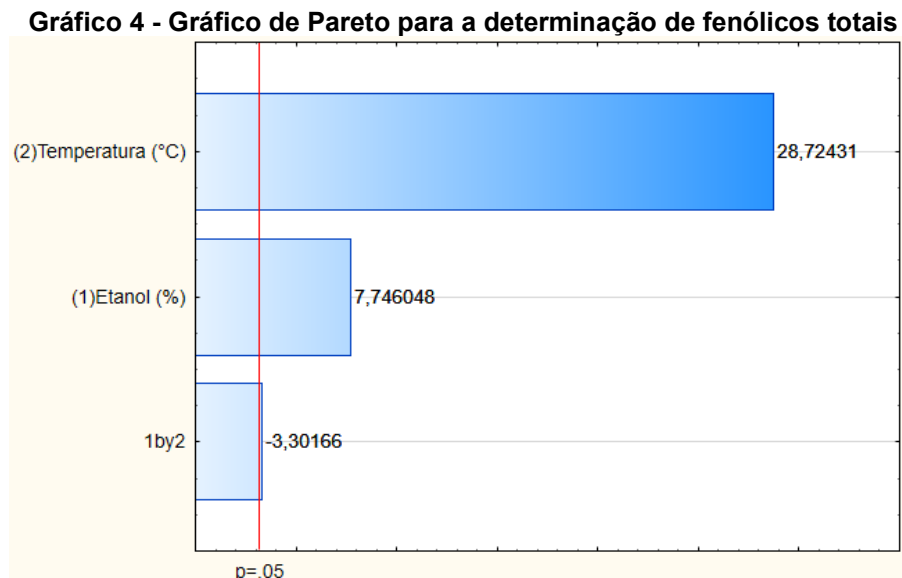
Tabela 7 - Tabela ANOVA para determinação do teor de compostos fenólicos totais

Fator	SS ^a	DF ^b	MQ ^c	F	p - valor
Etanol (%)	65,3146	1	65,3146	60,0013	0,0004475
Temperatura (°C)	898,1506	1	898,1506	825,0861	0,000093
Etanol (%) x Temperatura (°C)	11,8663	1	11,8663	10,9010	0,045676
Error	3,2657	3	1,0886		

^aSS – Grau de liberdade; ^bDF – Soma dos Quadrados; ^cMQ – Média Quadrática

Fonte: Autoria própria (2021)

Os fatores temperatura, etanol e a interação entre concentração do solvente (% etanol) e temperatura apresentaram p-valor menor ou igual a 0,05 e o coeficiente de correlação do modelo foi de $R^2 = 0,99666$ mostrando que o modelo foi adequado. O Gráfico de Pareto (Gráfico 4) demonstra visualmente essa afirmação.

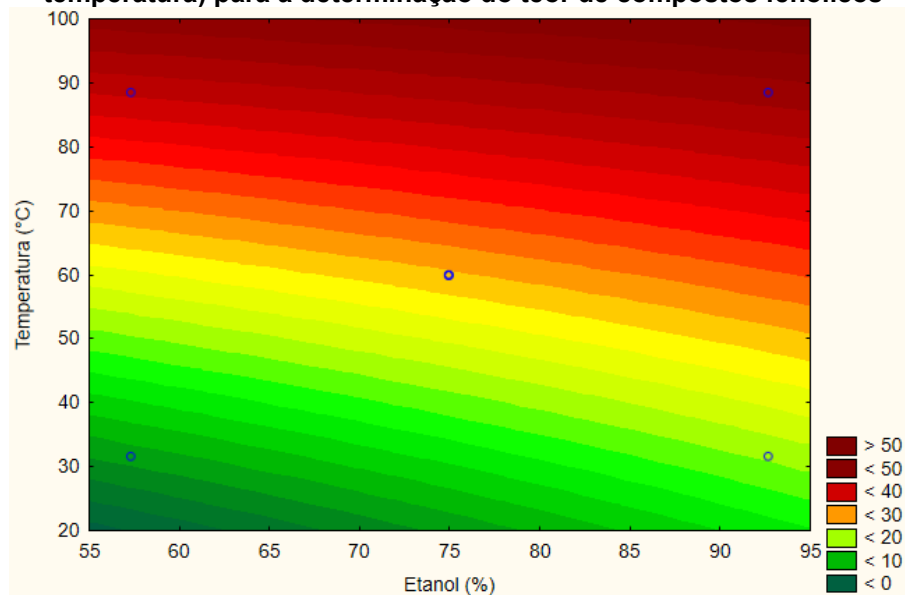


Fonte: Autoria própria (2021)

Com isso pode-se visualizar que as variáveis temperatura, concentração de etanol e interação entre concentração de etanol e temperatura foram significativas para o teor de compostos fenólicos.

O Gráfico de Superfície de Resposta (Gráfico 5) avalia a influência das variáveis independentes em relação à resposta desejada. Para a análise de determinação do teor de compostos fenólicos como resposta, foi utilizada a combinação das variáveis independentes concentração do solvente e temperatura.

Gráfico 5 - Gráfico de Superfície de Resposta com dois fatores (concentração de etanol e temperatura) para a determinação do teor de compostos fenólicos



Fonte: Autoria própria (2021)

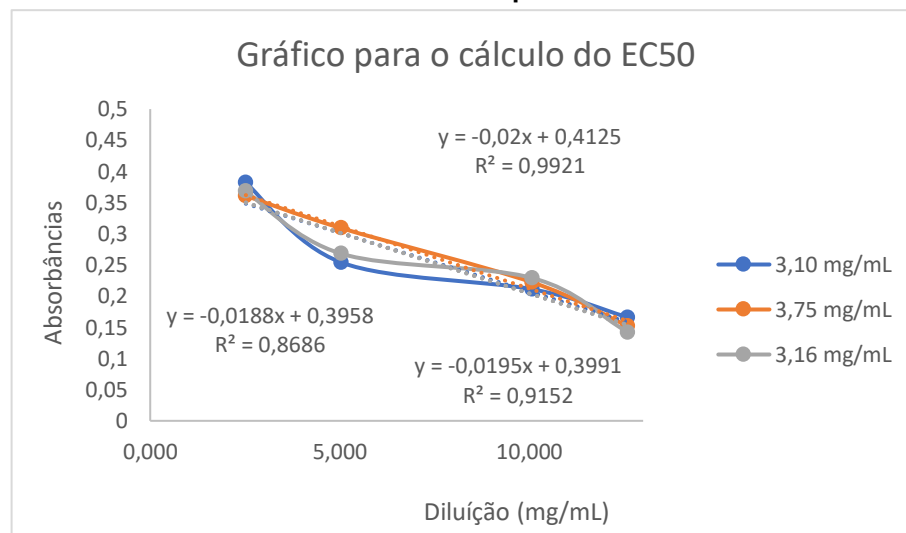
A região de vermelho mais forte representa a maior resposta obtida de compostos fenólicos na amostra. Pelas interações das variáveis citadas, a que apresenta maior resposta foi a partir da temperatura que representa 80 °C com concentração do solvente correspondente a 90% etanol e 10% água.

Dessa forma, os parâmetros escolhidos para a extração hidroalcolica da própolis marrom foram com 0,25 g de própolis marrom bruta para 10 mL de solvente (90% etanol e 10% água) em uma temperatura de 80 °C por 60 minutos. E, a partir deste extrato produzido foram realizadas a determinação da capacidade antioxidante (DPPH), as análises físico-químicas e a avaliação da atividade citotóxica/antitumoral.

5.4 Determinação da capacidade antioxidante do extrato etanólico de própolis marrom

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH, expresso em EC_{50} , foi necessário plotar o gráfico para o cálculo da EC_{50} (Gráfico 6), obtida por meio das absorvâncias de cada diluição em triplicata em função das concentrações que variaram entre 2,52 e 12,60 $mg mL^{-1}$. A atividade antioxidante total do extrato hidroalcolólico da própolis marrom apresentou EC_{50} igual a $3,34 \pm 0,29 mg mL^{-1}$. Azevedo (2015) resultou em um EC_{50} com valor igual a $0,1598 \pm 0,0096 mg mL^{-1}$ para concentrações que variaram entre 0,0556 e 0,1667 $mg mL^{-1}$. Já Araújo *et al.* (2020) obteve um valor alto de EC_{50} igual a $93,92 \pm 21,76 mg mL^{-1}$ para extrato de própolis de Salinópolis utilizando metanol como solvente.

Gráfico 6: Curva da atividades antioxidante total do extrato hidroalcolólico de própolis marrom em triplicata



Fonte: Autoria própria (2021)

5.5 Características físico-químicas do extrato etanólico de própolis marrom

A Tabela 8 apresenta a média dos valores das análises físico-químicas para o extrato etanólico de própolis marrom. Percebe-se pelo valor de pH que o extrato possui característica ácida ($4,77 \pm 0,11$). Souza *et al.* (2010) avaliaram o pH dos extratos alcoólicos de própolis produzidos por três diferentes técnicas de produção (coletor de própolis inteligente (CPI), tela plástica e raspagem), resultando também em características ácidas, com pH igual a $4,87 \pm 0,3$; $4,90 \pm 0,3$ e $4,93 \pm 0,3$, respectivamente.

Tabela 8 - Características físico-químicas do extrato etanólico de própolis marrom

Análises físico-químicas	Resultados
pH	4,77±0,11
Acidez total (mEq/L)	15,85±0,39
Umidade (%)	0,72±0,09
Lipídios (%)	4,44±0,19
Sólidos solúveis totais (°Brix)	21,75±0,20
Cinzas totais (%)	0,017±0,005
Açúcares totais	-----

Fonte: Autoria própria

Com relação a análise de acidez total, o extrato da própolis marrom resultou em $15,85 \pm 0,39$ mEq L⁻¹. Sá *et al.* (2020) encontraram $16,67$ mEq L⁻¹ de acidez total em licor de romã e canela, sendo uma bebida alcóolica com um °Brix de 30,40, considerável um valor parecido com o nosso extrato avaliado. Já analisando o resultado dos sólidos solúveis totais, pode-se observar um índice alto ($21,75 \pm 0,20$ °Brix). Neves *et al.* (2010) determinaram em um valor inferior de sólido solúveis totais, sendo de 12,4 a 12,8 °Brix em néctar de acerola adicionado de extrato comercial de própolis, sendo um valor muito próximo ao encontrado no extrato etanólicos da própolis, com vistas que é encontrando apenas uma quantidade de 1 a 10% (v/v) do extrato de própolis comercializado. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo caracterizando ou avaliando o extrato da própolis marrom.

A porcentagem de umidade encontrada no extrato etanólico da própolis marrom foi de $0,72 \pm 0,09$ %, podendo-se observar uma baixa porcentagem, mas comparando com a própolis bruta, o valor é considerável. Nunes (2019) obteve resultado de $8,03 \pm 0,12$ % de umidade nas amostras bruta de própolis marrom e Silva *et al.* (2006) encontraram resultados que variaram de 1,94 a 2,78 % dependendo da colheita da própolis oriunda da Paraíba, Brasil.

Para a análise de lipídios foi encontrada uma porcentagem de $4,44 \pm 0,19$ % no extrato etanólico de própolis. Nunes (2019) encontrou $11,04 \pm 0,12$ % na própolis bruta marrom, $8,19 \pm 0,64$ na própolis bruta verde e $15,61 \pm 1,01$ na própolis bruta vermelha.

Com relação à análise de cinzas totais, foi encontrada porcentagem pequena no extrato etanólico de própolis marrom, sendo $0,017 \pm 0,005$ %. Comparando com resultado obtido por Nunes (2019) na própolis bruta marrom, o resultado realmente é baixo, dado que o autor supracitado encontrou valor de $1,35 \pm 0,19$ % de cinzas totais.

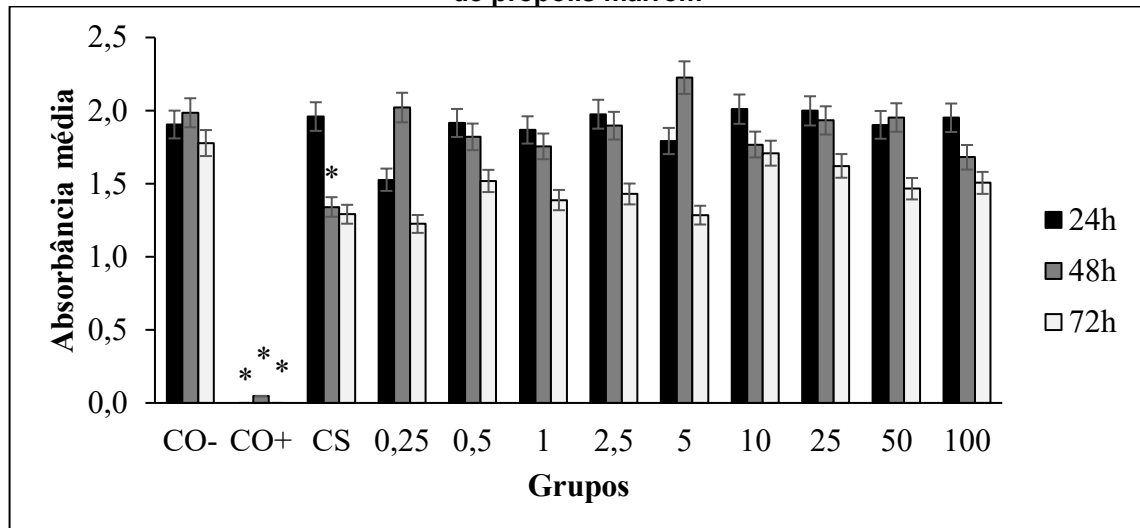
Na análise de açúcares totais, não foram encontradas quantidades notáveis de açúcares no extrato etanólico de própolis marrom. Barbosa *et al.* (2016) também não encontrou teores de açúcares (glicose, fructose e sacarose) em própolis de

Scaptotrigona bipunctata (abelha Tubuna) e nem mesmo há registro desses dados na literatura.

5.6 Avaliação da atividade antitumoral do extrato de própolis marrom

Os dados do Gráfico 7 apresentam os valores médios de absorvâncias e seus respectivos desvios padrão obtidos com células normais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2) tratadas com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis marrom, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os dados indicam que nenhuma concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$), em nenhum dos tempos avaliados (24, 48, 72 horas), apresentou resultado estatisticamente diferente do controle negativo e, por isso, não houve efeito citotóxico para as células normais renais do presente estudo. Inclusive, vale destacar que as viabilidades celulares (Tabela 10) dos grupos tratados com o extrato foram maiores que 80% (24 horas), 84% (48 horas) e 68% (72 horas).

Gráfico 7: Absorbância média e desvio-padrão de células normais de rim de *Macaca mullata* LLC-MK2 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico de própolis marrom



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $1,0 \times 10^5$ células por poço; CS: Controle Solvente.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Autoria Própria (2021)

Tabela 9: Percentual de viabilidade de células (VC) normais de rim de *Macaca Mullata* LLC-MK2, tratadas com o extrato etanólico de própolis marrom

Grupos	Célula Renal de <i>Macaca mullata</i>		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	0,00	2,32	0,00
CS	102,86	67,53	72,61
0,25 µg mL ⁻¹	80,17	101,80	68,88
0,5 µg mL ⁻¹	100,56	91,70	85,42
1 µg mL ⁻¹	98,06	88,43	78,06
2,5 µg mL ⁻¹	103,70	95,54	80,41
5 µg mL ⁻¹	94,08	112,12	72,27
10 µg mL ⁻¹	105,51	89,06	96,10
25 µg mL ⁻¹	104,91	97,36	91,21
50 µg mL ⁻¹	99,88	98,36	82,44
100 µg mL ⁻¹	102,43	84,66	84,67

CO⁻: Controle Negativo; CO⁺: Controle Positivo; CS: Controle Solvente.

Fonte: Autoria Própria (2021)

Campos (2019), testando concentrações maiores que as do presente estudo (250; 500; 750; 1000; 2000 µg mL⁻¹) e com extrato metanólico (70%), e não etanólico, da própolis de *Scaptotrigona affinis postica* mostraram a toxicidade delas para a linhagem de célula LLC-MK2. Já Araújo *et al.* (2011) realizando teste de toxicidade aguda com extrato hidroalcoólico de própolis de *Scaptotrigona affinis postica* verificaram que este não induziu a morte dos camundongos, mesmo quando recebem altas doses (1000, 2000 e 4000 mg kg⁻¹), indicando, assim como no presente estudo, a ausência de toxicidade de extratos hidroalcoólico de própolis. Essa ação pode ser explicada pela redução da concentração de alanina aminotransferase (ALT) detectados nos grupos tratados com extrato hidroalcoólico de própolis, possivelmente relacionadas a um possível efeito hepatoprotetor em animais submetidos a testes de toxicidade aguda. Assim, os resultados mostraram que a própolis pode reduzir os níveis séricos de aminotransferases, promovendo um efeito hepatoprotetor (BHADAURIA *et al.*, 2008; NIRALA; BHADAURIA, 2008).

Os dados do Gráfico 8 apresentam os valores médios de absorvâncias e seus respectivos desvio-padrão obtidos com as células de carcinoma hepatocelular (HuH7.5) tratadas com as diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis marrom nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As concentrações acima de 10 µg mL⁻¹ nos

tempos de 24 e 48 horas e todas as concentrações do extrato (0,25 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), no tempo de 72 horas apresentaram absorvâncias médias menores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica efeito citotóxico/antiproliferativo do extrato para as células tumorais de fígado humano.

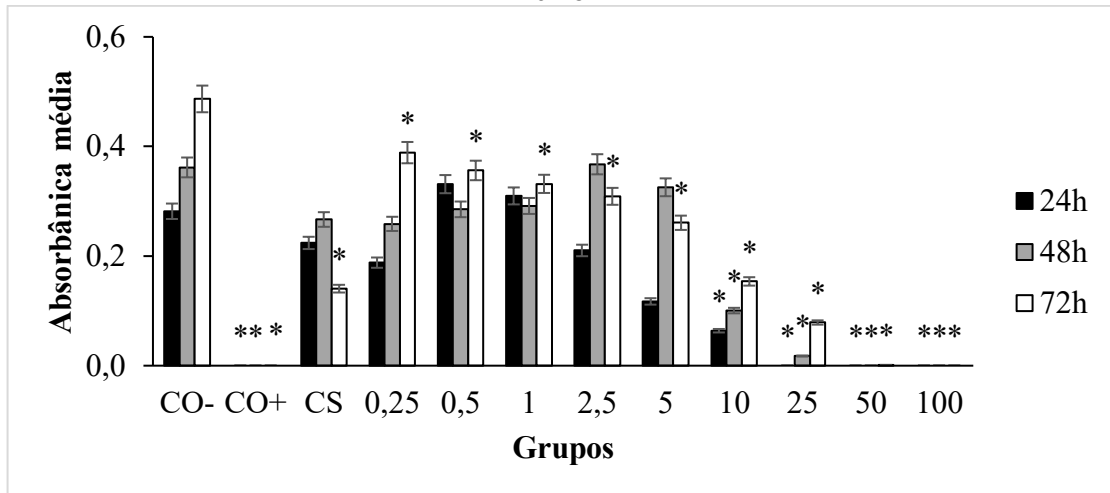
Inclusive, pode-se observar que as viabilidades celulares (Tabela 11) decresceram com o aumento da concentração, nos tempos de 24 e 48 horas a partir da concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e no tempo de 72 horas. Desde a menor concentração (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pode-se observar esse efeito, atingindo 0% de viabilidade na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em todos os tempos de avaliação.

Kim *et al.* (2013) comenta sobre um fenólico composto derivado da própolis chamado éster fenético do ácido cafeico (CAPE), em que há relatos de atividades anticâncer em vários tipos de doenças malignas. Os autores mostraram que o tratamento apresentou apoptose com células de carcinoma hepatocelular (SK-Hep1), mesmo tipo de tecido do presente estudo, significativamente sensibilizadas com CAPE.

Setzer *et al.* (2003) relata que os compostos químicos encontrados nos extratos de própolis vermelha apresentam atividades biológicas bem estabelecidas, indicando presença de terpenos lupeol ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$), acetato de lupeol ($\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$) e lupenona ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$) e os autores demonstram que triterpenoides exercem efeitos citotóxicos no carcinoma hepatocelular humano (Hep-G2), mesmo tipo de câncer do presente estudo.

Também, como já citado anteriormente, os extratos de própolis obtidos por métodos variados apresentam potencial antioxidantes em outras linhagens de células tumorais, como de glioblastoma, ovário, cólon (MENDONÇA *et al.*, 2015) e mama humano (POPOLO *et al.* 2009).

Gráfico 8: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado humano HuH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico de própolis marrom



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $3,0 \times 10^4$ células por poço; CS: Controle Solvente.

*Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Autoria Própria (2021)

Tabela 10: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado humano HuH7.5, tratadas com o extrato etanólico de própolis marrom.

Grupos	Célula Tumoral Hepática de Ratos		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	0,00	0,00	0,00
CS	79,50	73,74	28,86
0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	66,73	71,53	79,87
0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	117,57	78,85	73,19
1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	109,94	80,58	68,16
2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	74,62	101,59	63,48
5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	41,61	89,98	53,57
10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	22,63	27,78	31,59
25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00	4,84	16,18
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00	0,00	0,26
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,00	0,00	0,00

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente.

Fonte: Autoria Própria (2021).

Com isso, os resultados mostram, que a própolis é um produto com elevadas concentrações de compostos bioativos que podem ajudar na saúde humana, indicando que esse produto merece destaque na busca de novas moléculas contra o câncer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou bons resultados para a extração de compostos bioativos encontrados no extrato hidroalcolico da própolis marrom na proporção soluto:solvente de 0,25 g de própolis bruta para 10 mL do solvente, em uma temperatura de 80 °C na concentração do solvente em 90% etanol e 10% água. Foram relatadas novas descobertas, visto que não foi encontrada a caracterização desse extrato de própolis na literatura, sendo também confirmada sua atividade antioxidante por meio do método DPPH.

Nos ensaios com as linhagens de células HuH7.5 e LLC-MK2, demonstrou-se que o extrato hidroalcolico de própolis marrom apresentou atividade citotóxica para as células de carcinoma hepatocelular humano (HuH7.5), principalmente nas concentrações acima de 10 µg mL⁻¹, e ausência de efeito citotóxico para as células normais renais.

Assim, os dados do presente trabalho indicam que esse composto tem grande potencial na cura contra o câncer sem afetar as células saudáveis e, dessa forma, merece destaque na busca de novos compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, B.; UKWUANI-KNAJA, A.N.; GARBA, A.D.; SINGH, D.; MALAMI, I.; SALIHU, T.S.; MUHAMMAD, A.; YAHAYA, Y.; SULE, A.M.; AHMED, S.J. Ethnobotanical study of medicinal plants used for cancer treatment in Kebbi state, North-west Nigeria. **Acta Ecologica Sinica**, 2020. doi.org/10.1016/j.chnaes.2020.02.007.
- ADADI, P.; BARAKOVA, N.V.; MURAVYOV, K.Y.; KRIVOSHAPKINA, E.F. Designing selenium functional foods and beverages: A review. **Food Research International**, v. 120, p. 708-725, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.029>.
- AGUIAR, G.R.; LEMOS, T.L.G.; DORNELAS, C.A.; SILVA, A.M.; ALMEIDA, M.C.S.; FERREIRA, D.A.; MONTE, F.J.Q.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, I.R.; DO NASCIMENTO, P.G.G. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v. 2018, n. 10, p. 1, 2018.
- ARAÚJO, M.J.A.M.; DUTRA, R.P.; COSTA, G.C.; REIS, A.S.; ASSUNÇÃO, A.K. M.; LIBÉRIO, S.A.; SILVA, L.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona* aff. *postica* propolis extract in pre-clinical assays. **Natural Product Research**, v. 25, n. 11, p. 1037-1046, 2011.
- AZEVEDO, S.B.I.; SAMPAIO, R.F.; MONTES, J.C.; CONTRERAS, R.L.L. Tratamento das escaras de decúbito com Própolis. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.39, p. 33-37, 1986.
- BAPTISTA, I.D.C.; GENTA, T.M.S.; CALDERELLI, V.A.S.; MAURÍCIO, A.A.; PORTILHO, M.; MATIOLI, G. Conhecimento da comunidade universitária em relação aos alimentos funcionais. *Acta Scientiarum*. **Health Science**, v. 35, n. 1, 2013. doi:10.4025/actascihealthsci.v35i1.10134.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.
- BARBOSA, V.M.; BAMPI, M.; MERINO, F.J.Z.; FERREIRA, S.M.R.; MIGUEL, O.G. Determinação de Fenóis totais e análise de ácidos e açúcares orgânicos em própolis de *Scaptotrigona Bipunctata*. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia e Alimentos, X CIGR Sextion IV International Technical Symposium**, 2016.
- BARROS, J. M; BEZERRA, M.A.; VALASQUES, G.S.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B.B.; SOUZA, A.S.; DE ARAGÃO, N.M. Multivariate Optimization of an Ultrasound-assisted Extraction Procedure for Cu, Mn, Ni and Zn Determination in Ration to Chickens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n.3, p. 891-902, 2013.
- BARROS NETO B.; SCARMINIO I. S.; BRUNS R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 401 p.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S.K.; SHUKLA, S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2703–2712, 2008.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S.R.S. Extratos de própolis obtidos por métodos de baixa pressão e extração com fluido supercrítico. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 17-23, 2009. doi: 10.1016 / j.supflu.2009.07.011

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química nova**, v. 32, n. 6, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600031>.

CAMPOS, Tatiane Matarazzo Cantero. **Avaliação de atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos extratos alcóolico e aquoso da própolis *Scaptotrigona affinis postica***. Dissertação (Mestrado em Ciências). São Paulo, 2019.

CASSILETH, B.R.; DENG, G. Complementary and alternative therapies for cancer. **The Oncologist**, v. 9, n. 1, p. 80-89, 2004.

DANTAS, R.T. **Injúria renal induzida pelo veneno de *Bothrops insularis* e o papel da molécula KIM-1 como biomarcador precoce**. Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Fortaleza. 2016.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

DE MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; DE AMORIM, E.L.C.; DO NASCIMENTO, S.C.; DE ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: na ethnobotanical approach. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 11, p. 1-14, 2011.

DE MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; DO NASCIMENTO, T.G.; DE SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 15, n.357, p. 1-12, 2015.

FERREIRA, Carla Patrícia da Silva. **Extração em meio aquoso e concentração por processos de membranas de fibras solúveis a partir do bagaço de uva branca**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Técnico Lisboa. 2013.

FORD, M. B.; MICTHELL, M. F. Epidemiologia do câncer. In: BOYER, K. L. et al. *Oncologia na clínica geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p. 2-22.

FRANZEN, F.L.; FRIES, L.L.M.; DE 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**. v. 7, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v7i1.16765>.

FREIRES, M.A.L.; MELO, W.F.; LACERDA, L.E.; ROLIM, F.D.; MARACAJÁ, P.B.; NÓBREGA, K.G.; FERREIRA, A.E.E.; MELO, R. Os tipos de própolis e sua utilização

em lesões cutâneas. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental** (Pombal, PB), v. 13, n. 04, p. 25-29, 2019.

GALANAKIS, C.M. Nutraceutical and functional food components. Cambridge: Academic Press, 1º edição, 382f., 2017.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Cancer Today**. 2021. Disponível em < https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1> Acessado em 02 de agosto de 2021.

GOMES, M.F.F.; ÍTAVO, C.C.B.F.; LEAL, C.R.B.; ÍTAVO, L.C.V.; LUNAS, R.C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279-282, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000400005

GOMES, N. G. L; MILANEZ, M. da C. Biologia dos tumores. In: GOMES, R. Oncologia Básica. Rio de Janeiro: Revinter, 1997. p. 18-35.

GUINDANI, M.; TONET, F.; KUHN, F.; MAGRO, J.D.; DALCANTON, F.; FIORI, M.A.; MELLO, J.M.M. Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos e antocianinas totais do Hibiscus sabdariffa. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2014.

GUL, K.; SINGH, A.K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2617–2627, 2016. doi:10.1080/10408398.2014.903384.

HATA, T.; TAZAWA, S.; OHTA, S.; RHYU, M.R.; MISAKA, T.; ICHIHARA, K. Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. **PLoS ONE**, v. 7 n. 11, p. e48072, 2012.

HULL, R.N.; CHERRY, W.R.; TRITCH, O.J. Growth characteristics of Monkey Kidney Cell Strains LLC-MKT, LLC-MK2, AND LLC-MK~(NCTC-3196) and their utility in virus research. **Journal of Experimental Medicine**, v. 115, n. 5, p. 903–918, 1962. doi: 10.1084 / jem.115.5.903

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008. Disponível em < <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf> > Acessado em 03 de agosto de 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE TELECOMUNICAÇÕES. **O que são radicais livres?** 2021. Disponível em: <<https://www.inatel.br/cipa/index.php/informativos/34-o-que-sao-radicaais-livres>> Acessado em 16 de julho de 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Como prevenir o câncer. 2021. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/como-prevenir-o-cancer> > Acessado em 14 de julho de 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. O que é o câncer? 2020. Disponível em: <
<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer> >

INTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Como Surge o câncer? 2019. Disponível em: <
<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>> Acessado em 14 de julho de 2021.

JIANG, Y.; ZHANG, X.Y.; SUN, L.; ZHANG, G.L.; DUERKSEN-HUGHES, P.; ZHU, X.Q.; YANG, J. Methyl methanesulfonate induces apoptosis in p53-deficient H1299 and Hep3B cells through a caspase 2- and mitochondria-associated pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 694-704, 2012.

KIM, E. Y.; RYU, J.H.; KIM, A. K. CAPE promotes TRAIL-induced apoptosis through the upregulation of TRAIL receptors via activation of p38 and suppression of JNK in SK-Hep1 hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 4, p. 1291–1300. 2013. doi:10.3892/ijo.2013.2018

KUBILIENE, L.; LAUGALIENE, V.; PAVILONIS, A.; MARUSKA, A.; MAJIENE, D.; BARCAUSKAITE, K.; KUBILIUS, R.; KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 156, 2015.

KUMAR, N.; AHMED, K.M.; RAMAN, D.; AHMED, H. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. **Journal of Medical Plants Research**, v. 2, n. 12, p. 361–364, 2008.

KUMAR; ABBAS; ASTER. **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. Brasil: Elsevier, 2014. Disponível em <
https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=2O_jYLsNxrYC&oi=fnd&pg=PT34&dq=KUMAR%3B+ABBAS%3B+ASTER.+Robbins+%26+Cotran+Patologia:+bases+patol%C3%B3gicas+das+doen%C3%A7as.+Brasil:+Elsevier,+2014.&ots=QH4VsA9ZeX&sig=zgCtsUr_nn8GJ0k_Fg0RX4tHKmY#v=onepage&q&f=false> Acessado em 02 de agosto de 2021.

LIMA M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista, SP: Editora e Gráfica, 2006.

LIU, Yewei; YIN, Ting; FENG, Yuanbo; et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729, 2015.

LUIZETTO, E.M.; TURECK, C.; LOCATELLI, G.; CORREA, V.G.; KOEHNLEIN, E. A. Alimentos funcionais em alimentação coletiva: reflexões acerca da promoção da saúde fora do domicílio. **Nutrire**, p. 188- 199, 2015.

MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, A.S.; COSTA, S.S.; SILVA, R.P.D.; DA SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; DA ROCHA, J.L.C.; NUNES, S.B.; UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as cosolvent. **Plos One**, v. 10, p. e0134489, 2015.

MACHADO, C.S.; MOKOCHINSKI, J.B.; LIRA, T.O.; DE OLIVEIRA, F.D.C.E.; CARDOSO, M.V.; FERREIRA, R.G.; SAWAYA, A.C.H.F.; FERREIRA, A.G.; PESSOA, C.; CUESTA-RUBIO, O.; MONTEIRO, M.C.; DE CAMPOS, M.S.; TORRES, Y.R. Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. 12, 2016a.

MACHADO, B.A.S.; SILVA, R.P.D.; BARRETO, G.D.A.; COSTA, S.S.; DA SILVA, D.F.; BRANDO, H.N.; DA ROCHA, J.L.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.; UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016b.

MACIEL, F.F.C.; SILVA, E.B., LIMA, R.; OLIVEIRA, N.D.; DANTAS, E.N.A.; CORDEIRO, S.A.; SOUZA, G.S.F.; MACEDO, N.L.S.; OLIVEIRA, D.A.; DONATO, N.R. Alimentos Funcionais E Câncer de Mama: Breve Revisão. **International Journal of Nutrology**. v. 11, n. 1, p. S24-S327, 2018. DOI: 10.1055/s-0038-1674376.

MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Composição Química da Própolis Brasileira do Estado de São Paulo. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 53, n. 1-2, p. 117-119, 1998. doi: 10.1515 / znc-1998-1-220

MELLO, Cíntia da Silva. **Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de uncaria sp. Em infecção in vitro de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus dengue**. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária). Rio de Janeiro. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer: sintomas, causas, tipos e tratamentos. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer>> Acessado em 14 de julho de 2021.

MISTURA, C.; MISTURA, C.; SILVA, R.; SALES, J.; MELO, M.; SARMENTO, S. Papel do enfermeiro na prevenção do câncer de colo uterino na estratégia saúde da família. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10 n. 20, p.1161-1164, 2011.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MOUHOUBI-TAFININE, Z.; OUCHEMOUKH, S.; TAMENDJARI, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 85–90, 2016.

MOURA; S.A.L.; FERREIRA; M.A.N.D., ANDRADE; S.P., REIS; M.L.C., NOVIELLO; M.L.; CARA, D.C. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a

Murine Sponge Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p. 29-33, 2003.

NEVES, M.V.M.; LIMA, V.L.A.G. Avaliação sensorial e caracterização físico-química de nectar de acerola adicionado de extrato comercial de propolis. **Alimento e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 399-405, 2010.

NIRALA, S.K.; BHADAURIA, M. Synergistic effects of ferritin and propolis in modulation of beryllium induced toxicogenic alterations. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3069–3079, 2008.

NOVAK, E.M.; SILVA, M.S.E.C.; MARCUCCI, M.C.; SAWAYA, A.C.H.F.; LÓPEZ, B.G.; FORTES, M. A. H. Z., GIORGI, R.R.; MARUMO, K.T.; RODRIGUES, R.F.; MARIA, D. A. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 2014, n. 11, p. 91–102, 2014.

NUNES, Danielle Devequi Gomes. **Composição química e atividade biológica antimicrobiana e leishmanicida de extratos de propolis obtido pelo método convencional ou por extração supercrítica**. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana). Salvador, Bahia. 2019.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, 1051-6, 2011.

PANELLI-MARTINS, B. E. **Análise de método de avaliação da segurança alimentar e nutricional: uma contribuição á política municipal de SAN**. Tese (Mestrado – Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde). Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2007.

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

PASUPULETI V.R.; SAMMUGAM, L.; RAMESH, N.; GAN, S.H. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.

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

PEREIRA, D.S.; FREITAS, C.I.A.; FREITAS, M.O.; MARACAJÁ, P.B.; SILVA, J.B.A.; SILVA, R.A.; SILVEIRA, D.C. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.

PETER, C.M.; PICOLI, T.; ZANI, J.L.; LATOSINSKI, G.S.; DE LIMA, M.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; FISCHER, G. Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 37, n. 7, p. 667-675, 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017000700003

PIMENTA, H.C.; VIOLANTE, I.M.P.; DE MUSIS, C.R.; BORGES, Á.H.; ARANHA, A.M.F. In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2015.

PIMENTEL, C.V.M.B.; ELIAS, M.F.; PHILIPPI, S.T. **Alimentos funcionais e compostos bioativos**. - 1. ed. - Barueri [SP]: Manole, 2019.

POPOLO, A.; PICCINELLI, L.A.; MORELLO, S.; CUESTA-RUBIO, O.; SORRENTINO, R.; RASTRELLI, L.; PINTO, A. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1711–1716, 2009.

PRABST, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST and Resazurin. **Cell Viability Assays**, p. 1–17, 2017. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1

PRADO, C.C.N.D.; STEFANUTTO, J.C.; STEVANATO, J.O.; GONÇALVES, J.E.; YAMAGUCHI, M.U.; FRANCO, S.L. **Análise Química da Própolis de Diferentes Regiões do Paraná e Formulações de Própolis para ser Usados com Enxaguantes Bucais**. VIII Encontro Internacional de Produção Científica, 2013.

ROBERFROID, M.B. A European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, 2000.

ROCHA, B.A.; BUENO, P.C.P.; VAZ, M.M.O.L.L.; NASCIMENTO, A.P.; FERREIRA, N.U.; MORENO, G.P.; RODRIGUES, M.R.; COSTA-MACHADO, A.R.M.; BARIZON, E.A.; CAMPOS, J.C.L. OLIVEIRA, P.F.; ACÉSIO, N.O. MARTINS, S.P.L.; TAVARES, D.C.; BERRETTA, A.A. Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterization. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 11, 2013.

ROCHA C, CRUZ J, OLIVEIRA J. Insegurança nas ações de controle do câncer de colo uterino: Atuação do enfermeiro na estratégia de saúde da família. **Fundamental Online / Journal of Research: Fundamental Care Online**, v. 11, n. 4, p. 1072-1080, 2019.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 3, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H.; NIKLIŃSKI, J. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 50, n. 1, p. 25–37, 2012. doi:10.5603/fhc.2012.0004.

SÁ, C.C.; POMBO, J.C.P.; BOTELHO, V.A. Elaboração do licor de romã e canela: qualidade físico-química e microbiológica. **Congresso Internacional da Agroindústria (CIAGRO)**, 2020.

SETZER, W.N.; SETZER, M.C. Triterpenóides derivados de plantas como agentes antineoplásicos potenciais. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 3, p. 540–556, 2003.

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

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–29, 2015. doi:10.1155/2015/206439

SIMONETTI, Ana Catarina. **Atividade Antitumoral e Toxicidade de Nanopartículas contendo o Ácido Fumarprotocetrárico isolado de Cladonia verticillaris (Líquen)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife. 2004.

SOARES, E.R.; MONTEIRO, E.B.; SILVA, R.C.; BATISTA, A.; SOBREIRA, F.; MATTOS, T.; COSTA, C.A.; DALEPRANE, J.B. **Compostos Bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: Uma visão molecular da Nutrição**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ. Rio de Janeiro. 2015.

SOUZA, E.A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de Zootecnia**, São Paulo, v. 59, n. 228, p. 571-576. 2010.

SOUZA, J.A.; SOUZA, E.F.M.; MODRO, A.F.H.; PORTO, W.S.; OLIVEIRA, D.L. A apicultura em Rondônia (Amazônia legal): estudo de caso sobre o arranjo produtivo local da apicultura no cone sul. **Revista Estudo & Debate**, Lajeado, v. 23, n. 2, 2016.

TAKEUCHI, T.M.; PEREIRA, C.G.; BRAGA, M.E.M.; MARÓSTICA, JR.M.R.; LEAL, P.F.; MEIRELE, A.A.M. Low-Pressure Solvent Extraction (Solid–Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. **Contemporary Food Engineering**, p. 137-218, 2008. doi: 10.1201 / 9781420062397.ch4

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

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. **Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 237-245, 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.

WAGH, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

WALLER, S.B.; PETER, C.M.; HOFFMANN, J.F.; PICOLI, T.; OSÓRIO, L.G.; CHAVES, F.; ZANI, J.L.; DE FARIA, R.O.; DE MELLO, J.R.B.; MEIRELES, M.C.A. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117–121, 2017.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apic Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acessado em 10 de julho de 2021.

YEN G.C.; Wu, J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chem**, v. 65, n. 3, p. 375–379, 1999.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J.-M. A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 2017.

