Universidade do Minho
Escola de Ciências

Rita Alexandra Cardoso Marques

Contributos para a elucidação do modo de ação de própolis português: o caso do própolis do Pereiro

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

Professor Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira

Outubro de 2015

DECLARAÇÃO

Nome: Rita Alexandra Cardoso Marques

Endereço eletrónico: pg23872@alunos.uminho.pt Telefone: 917362857

Cartão do Cidadão: 14099472

Título da dissertação: Contributos para a elucidação do modo de ação de própolis português: o caso do própolis do Pereiro

Orientadores:

Professora Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar

Professor Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira

Ano de conclusão: 2015

Mestrado em Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 30 de Outubro de 2015

Assinatura:

_____

AGRADECIMENTOS

O meu profundo agradecimento é direcionado à minha família porque sem dúvida a família é o nosso grande suporte. Obrigada pelo apoio incondicional e constante preocupação, sem vocês isto não seria possível.

Aos meus orientadores professora doutora Cistina Aguiar e professor doutor Rui Oliveira pelo apoio, amizade, conhecimento e ajuda disponibilizados ao longo deste percurso.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Biologia, em particular à Dona Isabel, à Manuela Rodrigues e ao Sr. Luís pela ajuda incansável disponibilizada. Pelo apoio necessário a contornar os obstáculos que por vezes surgiam.

Aos meus colegas do laboratório, nomeadamente à Adriana, Ana Paula, Ana Sofia, Margarida, Maria Luís e Renata, por toda a ajuda e companhia disponibilizada no dia-a-dia.

Aos meus amigos e namorado por me mostrarem que tudo se resolve, por estarem sempre aqui do meu lado desde o início.

RESUMO

Contributos para a elucidação do modo de ação de própolis português: o caso do própolis do Pereiro

O própolis é uma mistura complexa resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas em suas colmeias, particularmente por *Apis mellifera L.*. As abelhas usam própolis para construir locais asséticos para a postura dos ovos da abelha rainha, para revestir fendas e fissuras, como barreira contra invasores e para controlar a proliferação de microrganismos. Este produto natural exibe uma vasta gama de propriedades biológicas para aplicações terapêuticas, entre as quais se destacam as propriedades antibacteriana, antifúngica e antioxidante. O espetro das bioatividades varia com a localização geográfica da colmeia, com a flora local e o clima, estando associado à presença de compostos específicos como flavonóides, ácidos aromáticos e ácidos fenólicos.

Com a perspetiva de utilização de própolis em várias aplicações futuras, o objetivo deste estudo passou por avaliar e comparar as propriedades biológicas de extratos etanólicos (EE) de amostras de própolis português recolhidas num apiário da Beira Alta (Pereiro, P) nos anos de 2010, 2011, 2012, 2013 e 2014. Utilizando como modelo biológico a levedura *Sacharomyces cerevisiae* foi avaliada a influência de própolis na viabilidade destas células eucariotas, quer em meio fermentativo quer respiratório. De modo a compreender o modo de ação do própolis do Pereiro, procedeu-se ainda à avaliação da sensibilidade de mutantes aos extratos em ensaios de viabilidade e procurou-se esclarecer qual a influência dos extratos no potencial da membrana mitocondrial, recorrendo-se para o efeito à citometria de fluxo. As atividades antibacteriana e antifúngica contra um painel de bactérias e leveduras de interesse clínico e biotecnológico foram igualmente avaliadas neste trabalho, utilizando-se o método de diluição em agar. As propriedades antioxidantes dos EE foram também caracterizadas, sendo avaliadas em ensaios de viabilidade - quer em condições de co- quer de pré-incubação com o agente oxidante H_2O_2 - e por citometria de fluxo. Para completar o presente estudo, procedeu-se ainda à avaliação do efeito genotóxico do própolis em células de *S. cerevisiae* através do ensaio cometa.

Os resultados mostraram que os extratos de própolis do Pereiro são citotóxicos e genotóxicos em meio fermentativo, com a exceção do extrato preparado com a amostra colhida em 2012. Todos os extratos mostraram atividade antioxidante, quer em ensaios de viabilidade quer por citometria de fluxo. Em relação ao modo de ação dos extratos, os resultados sugerem uma influência do própolis na linha de defesa oxidativa, na via da biogénese e acidificação vacuolar, nos fenómenos autofágicos e na morte

celular por apoptose. As diferenças nos espetros de atividade antimicrobiana mostraram-se significativas entre os diferentes extratos. Paralelamente, os extratos de própolis do Pereiro têm um comportamento antagónico, sendo fortes antioxidantes a baixas concentrações mas tóxicos para as células a concentrações mais elevadas. Apesar das diferenças em algumas atividades biológicas, estudos preliminares de caracterização química sugerem que os cinco extratos são muito semelhantes em termos dos compostos fenólicos que os constituem, variando apenas na sua concentração, mas uma análise mais aprofundada será necessária para identificar os compostos bioativos nas diferentes amostras. Tendo em conta os resultados obtidos, uma futura aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar pode ser ponderada para o própolis do Pereiro.

Palavras-chave: própolis, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, citotoxicidade, genotoxicidade, modo de ação.

ABSTRACT

Contributions to the elucidation of the mode of action of Portuguese propolis: the case of propolis from Pereiro

Propolis is a resinous and balsamic complex mixture produced by bees in their hives, particularly by *Apis mellifera L*. Bees use propolis to build aseptic sites for queen bee´s egg laying, to fill cracks and fissures, as a barrier against invaders and to control the proliferation of microorganisms. This natural product has a wide range of biological properties for therapeutic applications, among which we highlight the antibacterial, antifungal and antioxidant activities. The spectrum of bioactivities is variable with the geographical location of the hive, with the local climate and flora. These activities are associated with the presence of high concentrations of specific compounds as flavonoids, phenolic acids and aromatic acids.

With the prospect of using propolis in several future applications, the aim of this study was the evaluation and comparison of the biological properties of ethanol extracts (EE) of Portuguese propolis samples collected in an apiary at Beira Alta (Pereiro, P) in the years 2010, 2011, 2012, 2013 and 2014. Using *Sacharomyces cerevisiae* as biological model, the influence of propolis was evaluated in cells under fermentative or respiratory conditions by viability assays. In order to understand the mode of action of Pereiro propolis, the susceptibility of mutants to theses extracts was assessed in viability assays and the influence of the extracts on the mitochondrial membrane potential was further searched by flow cytometry. The antibacterial and antifungal activities against a range of bacteria and yeasts of clinical and biotechnological interest have also been evaluated in this work, using the agar dilution method. The antioxidant properties of the EEs were characterized too, being evaluated in viability assays - either in co-incubation or pre-incubation conditions with the oxidizing agent H_2O_2 - and by flow cytometry. To complete the present study, the genotoxic effect of propolis extracts was also tested using the comet assay in *S. cerevisiae* cells.

The results showed that Pereiro propolis extracts are cytotoxic and genotoxic in fermentation medium, with the exception of the extract prepared from the sample collected in 2012. All the extracts showed antioxidant activity both in viability assays and flow cytometry. Regarding the mode of action of the ethanol extracts, the results suggest an influence of propolis in the oxidative defense line, in biogenesis and vacuolar acidification, at autophagic phenomena and cell death by apoptosis. The differences in the spectra of antimicrobial activity were significant for the five extracts. Simultaneously,

Pereiro propolis ethanol extracts display an antagonistic behavior, being strong antioxidants at low concentrations but toxic to cells at higher concentrations. Although the differences in biological activities, preliminary studies of chemical characterization suggest that the five propolis extracts are very similar in terms of phenolic compounds, varying only in concentration, but a deeper analysis will be necessary to identify the bioactive compounds of the different extracts. Taking into account the results obtained, a future application in the pharmaceutical, cosmetic and food industries can be envisaged for Pereiro propolis.

Key words: antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity, genotoxicity, mode of action, propolis.

ÍNDICE

Agradecimentos iii
Resumo v
Abstract vii
Lista de Figuras xiii
Lista de Tabelas xvii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos xix
1. Introdução 1
1.1 Própolis 1
1.2 Composição química 2
1.2.1 Variação da composição química 4
1.3 Atividades biológicas do própolis 6
1.3.1 Atividade anti-tumoral e citotóxica 7
1.3.2 Atividade anti-inflamatória 8
1.3.3 Atividade antimicrobiana 8
1.3.4 Atividade antifúngica 9
1.3.5 Atividade antibacteriana 9
1.3.6 Atividade antioxidante 10
1.4 Efeitos protetores do própolis 11
1.4.1 Efeitos protetores no fígado 11
1.4.2 Efeitos protetores no cérebro 12
1.4.3 Efeitos protetores no coração 12
1.5 Influência do própolis no metabolismo celular e o seu modo de ação 13
1.6 Efeitos do própolis ao nível do DNA 14
1.7 Espécies reativas de oxigénio (ROS) e defesas oxidativas 15
1.8 Modelo: Saccharomyces cerevisiae 16
1.9 Objetivos 17
2. Materiais e Métodos 19
2.1 Amostras de própolis 19

2.1.1 Preparação de extratos etanólicos 19
2.2 Microrganismos 19
2.3 Meios de cultura e condições de crescimento 21
2.3.1 Preparação de culturas 21
2.4 Efeito dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro ao longo do tempo na viabilidade das estirpes selvagens e em mutantes de *S. cerevisiae* BY4741 e W303 21
2.5 Efeito dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro ao longo do tempo em *S. cerevisiae* BY4741 sujeita a condições de co-incubação e pré-incubação com H_2O_2 22
2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de própolis 23
2.7 Citometria de Fluxo e Microscopia de Fluorescência 23
2.7.1 Análise do potencial da membrana mitocondrial com Rodamina 123 (Rh-123) 23
2.7.2 Avaliação da oxidação intracelular com diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA) 24
2.8 Determinação do efeito genotóxico dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro em *S. cerevisiae* 25
2.9 Análise estatística 25
3. Resultados e Discussão 27
3.1 Efeito citotóxico de extratos etanólicos de própolis do Pereiro 27
3.1.1 *S. cerevisiae* BY4741 apresenta sensibilidade a P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE 27
3.1.2 Efeito de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE ao longo do tempo em *S.cerevisiae* cultivada em YPEtOH 28
3.1.3 Mutantes de *S. cerevisiae* BY4741 e W303 apresentam suscetibilidade diferente a P10.EE e P12.EE 30
3.2 P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE protegem *S. cerevisiae* BY4741 sujeita a condições de stresse oxidativo com H_2O_2 35
3.3 Todos os extratos etanólicos de própolis de Pereiro possuem atividade antimicrobiana 38
3.3.1 Atividade antibacteriana de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE 38
3.3.2 Atividade antifúngica de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE 40

3.4 Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro afetam o potencial da membrana mitocondrial de *S. cerevisiae* BY4741 42
3.5 Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro diminuem a oxidação celular interna de *S. cerevisiae* BY4741 44
3.6 Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro provocam danos no DNA de *S. cerevisiae* BY4741 47
3.6.1 Mutante *yca1* é menos suscetível a danos no DNA provocados por P10.EE 49
4. Considerações Finais 51
Bibliografia 55
Anexo I – Efeito de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE ao longo do tempo em *S. cerevisiae* em YPEtOH 67
Anexo II - Mutantes de *S. cerevisiae* BY4741 e W303 apresentam suscetibilidade diferente a P10.EE e P12.EE 69
Anexo III – P.EEs protegem *S. cerevisiae* BY4741 sujeita a condições de stresse oxidativo com H_2O_2. 71
Anexo IV – Atividade antibacteriana de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra 19 bactérias 73
Anexo V – Atividade antifúngica de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o painel de 18 leveduras selecionado 77

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura básica dos principais compostos do própolis de zonas temperadas: ácidos fenólicos (A), flavonas e flavonóis (B) e flavononas e dihidroflavonóides (C). Adaptado de Falcão *et al.*, 2010.

Figura 2. Defesas antioxidantes no organismo: SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH: glutationa; GSH-Px: glutationa peroxidase; GSH-R: glutationa redutase; Vit. C: ácido ascórbico; Vit. E: α-tocoferol. Adaptado de Lazo-de-la-Vega-Monroy e Fernández-Mejía, 2013.

Figura 3. Extratos etanólicos de própolis de Pereiro afetam a viabilidade de células de *S. cerevisiae*. As células de levedura foram incubadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. Como controlo negativo utilizou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato utilizado. As células foram incubadas na presença de P.EEs ou de etanol, retirando-se alíquotas a intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 90 min) para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, das quais se retiraram alíquotas para inocular meio YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. A imagem ilustra resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 4. Células de *S. cerevisiae* em meio YPEtOH são mais resistentes a extratos etanólicos de própolis de Pereiro. As células foram tratadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 200 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1}. Como controlo negativo utilizou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato utilizado. As células foram incubadas retirando-se alíquotas em intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 90) para proceder às diluições 10^{-1} a 10^{-4}, usadas para inocular YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 5. Os mutantes *sod1*, *sod2* e *yap1* apresentam sensibilidade diferente da estirpe parental (BY4741) a P10.EE e P12.EE. Culturas de BY4741, *sod1*, *sod2* e *yap1* foram tratadas durante 90 minutos com 500 μgmL^{-1} de P10.EE (A) ou P12.EE (B), ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 6. Os mutantes *vph1* e *vps45* apresentam sensibilidade diferente da estirpe parental (BY4741) a P10.EE e P12.EE. Culturas de BY4741, *vph1* e *vps45* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE (A) ou P12.EE (B) na concentração de 500 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 7. Os mutantes *ndi1* e *atg1* apresentam sensibilidade diferente da estirpe parental (BY4741) a P10.EE e P12.EE. Culturas de BY4741, *ndi1* e *atg1* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE (A) ou P12.EE (B) na concentração de 500 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1} a 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 8. O mutante *yca1* apresenta sensibilidade diferente da estirpe parental (W303) a P10.EE e P12.EE. Culturas de W303 e *yca1* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE (A) ou P12.EE (B) na concentração de 500 μgmL^{-1}, ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 9. Co-incubação com extratos etanólicos de própolis Pereiro aumenta a viabilidade celular sob stresse oxidativo. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas com H_2O_2 a 5 mM em simultâneo com P10.EE (A), P11.EE

(B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E), nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 a 5 mM e ao negativo etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 10. Pré-incubação com extratos etanólicos de própolis de Pereiro aumenta a viabilidade celular sob stresse oxidativo. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} e 200 μgmL^{-1} . Aos controlos positivo e negativo adicionou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. As células foram incubadas durante 20 minutos, lavadas em dH_2O e ressuspendidas em meio de cultura. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 5mM assim como às amostras com extratos. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 de incubação retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura 11. Os extratos etanólicos de própolis afetam o potencial elétrico da membrana interna mitocondrial. A fluorescência emitida pela sonda Rh-123 nas células de *S. cerevisiae*, cultivadas em meio YPEtOH e tratadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) e P14.EE (E) apresenta-se em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e correspondem a uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

Figura 12. Células de *S. cerevisiae* marcadas com Rh-123 observadas ao microscópio de fluorescência. Células incubadas em meio YPEtOH com etanol absoluto no controlo negativo (A) e com 200 μgmL^{-1} de P10.EE (B) visualizadas ao microscópio de fluorescência com ampliação 100x.

Figura 13. Os extratos etanólicos de própolis diminuem a oxidação celular interna. A fluorescência emitida pela sonda H_2DCFDA nas células de *S. cerevisiae* tratadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) está representada em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e são uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

Figura 14. Co-incubação com extratos etanólicos de própolis diminui a oxidação celular interna provocada por H_2O_2. A fluorescência emitida pela sonda H_2DCFDA nas células de *S. cerevisiae* incubadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) e H_2O_2 a 5 mM está representada em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e são uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

Figura 15. Pré incubação com extratos etanólicos de própolis diminui a oxidação celular interna provocada por H_2O_2. Células de *S. cerevisiae* pré-incubadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) foram lavadas com dH_2O e ressuspendidas em meio de cultura ao qual se adicionou H_2O_2 a 5 mM. A fluorescência emitida pela sonda H_2DCFDA está representada em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e são uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

Figura 16. Fotomicrografias de cometas de *S. cerevisiae* depois da marcação do DNA com *GelRed*, ampliadas 400x. A: corresponde um controlo negativo, com EtOH 5%; B: controlo positivo com H_2O_2 10 mM; C: tratamento com 200 μgmL^{-1} de P13.EE.

Figura 17. Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro provocam, em geral, danos no DNA. Células de *S. cerevisiae* foram tratadas com 10 μgmL^{-1}, 25 μgmL^{-1}, 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E). Os controlos foram tratados com EtOH absoluto, no caso do negativo e com H_2O_2 5 mM, para o positivo. As imagens foram visualizadas ao microscópio de fluorescência. Os

valores de média ± SD são resultado de três experiências independentes (* significa $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e *** $p < 0.001$).

Figura 18. O mutante *yca1* não apresenta suscetibilidade a danos do DNA provocados pelo extrato etanólico de Pereiro. Células de *yca1* foram tratadas com 10 μgmL^{-1}, 25 μgmL^{-1}, 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE. Os controlos foram tratados com EtOH 5%, no caso do negativo, e com H_2O_2 5 mM, para o positivo. As imagens foram visualizadas ao microscópio de fluorescência. Os resultados são expressos em termos dos valores de média do comprimento das caudas ± SD relativos a três experiências independentes (* significa $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e *** $p < 0.001$).

Figura A1. Células de *S. cerevisiae* em meio YPEtOH tratadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1}. Como controlo negativo utilizou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato utilizado. As células foram incubadas retirando-se alíquotas em intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 90) para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, usadas para inocular YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura A2. Os mutantes *sod1*, *sod2*, *yap1*, *vph1*, *vps45*, *ndi1* e *atg1* foram tratados durante 90 minutos com P10.EE nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura A3. Culturas de W303 e *yca1* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura A4. Co-incubação com extratos etanólicos de própolis Pereiro. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas em simultâneo com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E), nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1} e H_2O_2 a 5 mM. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 a 5 mM e ao negativo etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura A5. Pré-incubação com extratos etanólicos do própolis de Pereiro. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. Aos controlos positivo e negativo adicionou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. As células foram incubadas durante 20 minutos, lavadas em dH_2O e ressuspendidas em meio de cultura. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 5mM assim como às amostras com extratos. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 de incubação retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Figura A6. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de bactérias testadas em meio LBA suplementado com 500 μgml^{-1} e 750 μgml^{-1} de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

Figura A7. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de bactérias testadas em meio LBA suplementado com 500 μgml^{-1} e 750 μgml^{-1} de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

Figura A8. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de bactérias testadas em meio LBA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

Figura A9. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de leveduras. Ensaio em meio YPDA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

Figura A10. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de leveduras testadas em meio YPDA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

Figura A11. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de leveduras testadas em meio YPDA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes mutantes utilizadas e respetivos genótipos.

Tabela 2. Valores de MIC obtidos para os extratos etanólicos de própolis de Pereiro para o conjunto de bactérias selecionado. As estirpes foram inoculadas em meio LB suplementado com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE nas concentrações 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. O controlo negativo possui etanol absoluto incorporado no meio num volume igual ao máximo de extrato adicionado. "-"ausência de crescimento.

Tabela 3. Valores de MIC obtidos para extratos etanólicos de própolis de Pereiro contra o leque de leveduras selecionado. As estirpes foram espalhadas em meio YPDA suplementado com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. O controlo negativo possui etanol absoluto incorporado no meio num volume igual ao máximo de extrato adicionado. "-"ausência de crescimento.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

8-oxoG - 8-oxo-7,8-dihidroguanine

AA - acetaminofeno

ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiozolina-6-ácido-sulfónico)

AP - apurina/ apirimidina

CAPE - ácido cafeico feniletil éster, do inglês *caffeic acid phenylethyl ester*

CAT - catalase

CCl_4 - tetracloreto de carbono

$D.O._{600}$ - densidade óptica a 600 nm

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EAE - encefalomielite autoimune experimental

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EMT - transição epitélio-mesênquima

GSH - glutationa

GSH-Px - glutationa peroxidase

GSH-R - glutationa redutase

GST - glutationa-s-transferase

H_2DCFDA - diacetato de diclorofluoresceína

H_2O_2 - peróxido de hidrogénio

LB - Luria-Bertani

LBA - Luria-Bertani Agar

LDH - enzima lactato desidrogenase citosólica

LMA - agarose de baixo ponto de fusão, do inglês *low melting agarose*

MBC ou MFC - concentração bactericida mínima ou fungicida, do inglês *minimum bactericidal* ou *fungicide concentration*

MIC - concentração miníma inibitória, do inglês *minimum inhibitory concentration*

N^7-meG - N^7-metilguanina

NADPH - nicotinamida fosfato de adenina dinucleotídeo

NMA - agarose de ponto de fusão normal, do inglês *normal melting agarose*

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintetase

P - Pereiro

P.EE - extratos etanólicos de própolis do Pereiro

P10.EE - extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido em 2010

P11.EE - extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido em 2011

P12.EE - extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido em 2012

P13.EE - extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido em 2013

P14.EE - extrato etanólico de própolis do Pereiro recolhido em 2014

PBS - tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PST - fenolsulfotransferase

Rcf - força centrífuga relativa

Rh-123 - rodamina 123

ROS - espécies reativas de oxigénio, do inglês reactive oxygen species

Rpm - rotações por minuto

SOD - superóxido dismutase

Tg - 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina

YPD - do inglês *Yeast Peptone Dextrose*

YPDA - do inglês *Yeast Peptone Dextrose Agar*

YPEtOH - do inglês *Yeast Peptone Ethanol*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Própolis

Ao longo da história os homens foram aprendendo a usar produtos naturais para seu próprio benefício, particularmente na medicina. A domesticação da abelha pelo homem levou a uma verdadeira exploração de produtos apícolas, e as diversas propriedades vantajosas, tanto do mel como do própolis ou do pólen, possibilitaram as suas aplicações em muitas atividades humanas. O própolis, considerado um subproduto da colmeia, tem sido usado na medicina popular há séculos. A sua composição química é bastante complexa possuindo mais de 300 compostos, tais como polifenóis, aldeídos fenólicos, cumarinas, quininas sesquiterpenos, aminoácidos, esteróides, e compostos inorgânicos, que têm sido identificados em diferentes amostras provenientes de todo o mundo (Castro *et al.*, 2011). O própolis tem um longo historial de utilização, que remonta ao ano 300 aC, sendo ainda usado em cosméticos e produtos farmacêuticos, bem como na saúde, alimentos e bebidas (Burdock, 1998). Tem sido extensivamente utilizado na medicina tradicional e também em medicina complementar, devido à sua atividade antibacteriana e bacteriostática, antimicótica, adstringente, espasmolítica, antioxidante, anti-séptica, anti-inflamatória e anestésica (Burdock, 1998; Król *et al.*, 2013). No antigo Egito, o própolis foi utilizado para embalsamar cadáveres dadas as suas propriedades anti-putrefativas muito bem conhecidas (Marcucci, 1996) e gregos e romanos usaram-no como desinfetante bucal e de feridas (Burdock, 1998; Castaldo e Capasso, 2002). Os Incas empregaram-no como um agente anti-pirético. As aplicações terapêuticas do própolis foram perpetuadas na Segunda Guerra Mundial, sendo utilizado em várias clínicas soviéticas nos estados dos Balcãs para o tratamento de tuberculose, bem como para o tratamento de feridas, queimaduras, dores de garganta e úlceras no estômago (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Kuropatnicki *et al.*, 2013). Reconhecido como uma droga oficial nas farmacopeias de Londres do século XVII, o própolis tornou-se muito popular na Europa entre os séculos XVII e XX, devido às suas propriedades antibacterianas. Outras aplicações incluem o seu uso como ingrediente do verniz para instrumentos de cordas, tal como usado pelo italiano Stradivari no século XVII. Hoje ainda é usado como resina para as cordas de instrumentos musicais e na reparação de acordeões. Tem sido proposta também a utilização de própolis como um conservante químico em produtos à base de carne. As aplicações atuais variam entre formulações dermatológicas, preparação de pastas de dentes, soluções para higiene bucal e produtos farmacêuticos (Burdock, 1998).

O próp olis é um adesivo forte, uma mistura complexa resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas nas suas colmeias, principalmente por *Apis mellifera* L. (Pinheiro *et al.*, 2007), a partir dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores de diversas fontes vegetais (Pereira *et al.*, 2002). Esta resina é mastigada e processada pelas abelhas com enzimas salivares (Burdock, 1998; Cigut *et al.*, 2011) e, provavelmente, com outros compostos de metabolismo da abelha (Fokt *et al.*, 2010). O próp olis é duro e quebradiço quando frio, mas macio e pegajoso quando quente, tem um odor característico e é variável na cor - de verde-amarelo, a vermelho e castanho escuro ou mesmo preto - dependendo de sua origem e idade (Adelmann, 2005; Fokt *et al.*, 2010). A proporção das diferentes substâncias (a partir de compostos derivados de plantas e dos compostos libertados pelas abelhas) é variável e depende do local e do momento da colheita e da espécie de abelha (Bulman *et al.*, 2011; Petelinc *et al.*, 2013).

A palavra próp olis é proveniente do grego, onde “pro” significa "em frente", "na entrada de" e “polis” significa "cidade", "comunidade", o que significa que este produto natural contribui para a defesa e proteção da colmeia (Burdock, 1998). Devido à sua natureza cerosa e propriedades mecânicas, as abelhas usam o próp olis na construção e reparação das suas colmeias - para vedar aberturas e rachaduras, para suavizar as paredes internas e como uma barreira protetora contra os invasores externos ou contra ameaças como vento e chuva (Fokt *et al.*, 2010). Além disso, as abelhas usam o próp olis para construir locais asséticos para a postura dos ovos da abelha rainha, para controlar a proliferação de microrganismos e para embalsamar os cadáveres dos intrusos mortos, evitando assim sua decomposição e eliminando uma fonte potencial de infeções microbianas (Silici *et al.*, 2005; Cigut *et al.*, 2011; Dziedzic *et al.*, 2013).

1.2 Composição química

Os constituintes de próp olis variam amplamente, a composição química é complexa e altamente dependente e variável com a flora, estação, clima, localização e outros fatores externos à colmeia (Ota *et al.*, 2001; Júnior *et al.*, 2006; Artika *et al.*, 2011; Dziedzic *et al.*, 2013; Nascimento *et al.*, 2013). Vários trabalhos têm demonstrado que os compostos do próp olis têm origem a partir de três fontes: exsudado de plantas recolhido por abelhas, substâncias do metabolismo segregadas pelas abelhas e materiais introduzidos durante a elaboração do próp olis. As propriedades biológicas estão intimamente ligadas à composição química, por isso é de grande interesse estudar a composição do próp olis e tentar correlacionar perfis químicos com as bioatividades (Marcucci, 1996; Pereira *et al.*, 2002).

O primeiro trabalho científico com própolis foi publicado em 1908 (Pereira *et al.*, 2002) e nele se descrevem as propriedades químicas e composição deste produto natural. O própolis é uma mistura complexa constituída por cera de abelha, resinas e bálsamos vegetais, óleos essenciais, pólen e alguns compostos orgânicos e minerais. É essencialmente composto de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, como por exemplo, material orgânico (Burdock, 1998; Bulman *et al.*, 2011; Petelinc *et al.*, 2013). Os principais grupos químicos encontrados são os flavonóides (flavanonas, flavonas, flavonóides e calconas); os ácidos benzóicos e derivados; derivados de benzaldeído; álcool de cinamilo, ácido cinâmico e seus derivados; outros ácidos e respetivos derivados; cetonas, fenóis e compostos heteroaromáticos; terpénicos e álcoois sesquiterpenos e seus derivados; hidrocarbonetos sesquiterpenos e triterpenos; hidrocarbonetos alifáticos; minerais; esteróis e hidrocarbonetos esteróides; açúcares e aminoácidos; ácidos fenólicos, álcoois, aldeídos, ácidos gordos (Castro, 2001; Dota *et al.*, 2011). Novos constituintes estão ainda a ser identificados durante a caracterização química de novos tipos de própolis. Em própolis português foram também encontrados novos compostos, nomeadamente 19 novos compostos fenólicos (derivados esterificados ou hidroxilados metilados de flavonóides já descritos) e 6 novos compostos (campferol-dimetil éter, derivado do ácido ferrúlico, pinobanksin-O-hexenoato e derivados do ácido cafeico) (Falcão *et al.*, 2010, 2012, 2013). Os flavonóides, ácidos aromáticos e ácidos fenólicos são vistos como os componentes com maior potencial biológico e terapêutico (Bulman *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2013). Tem sido sugerido que os flavonóides, particularmente o ácido cafeico (Cigut *et al.*, 2011), são responsáveis por várias bioatividades de própolis, tais como atividade antibacteriana (Bedendo e Bianchini, 1998; Junior *et al.*, 2012; Mavri *et al.*, 2012; Fabris *et al.*, 2013) atividade antioxidante, anti-inflamatória e antifúngica (Oliveira *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009). À atividade antimicrobiana estão associados, juntamente aos flavonóides, compostos biologicamente ativos como ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos (Choi *et al.*, 2006; Sinhorini *et al.*, 2014; Grengo *et al.*, 2015). Alguns estudos descrevem o CAPE (ácido cafeico feniletil éster, do inglês *caffeic acid phenylethyl ester*) como um composto do própolis com atividade antitumoral e citotóxica (Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012). Destacam-se também compostos como os diterpenóides com atividade citotóxica e derivados do ácido di-O-cafeoilquínico com uma forte atividade ainti-hepatotóxica (Pereira *et al.*, 2012).

1.2.1 Variação da composição química

O grande número de estudos com própolis permitiu aos investigadores perceber que a sua composição química não é só complexa mas também muito variável, dependendo da época e flora no local da colheita, bem como do tipo de abelhas (Nascimento *et al.*, 2013), como já foi referido acima. Na Europa, pequenas variações na composição química do própolis de zonas temperadas foram registadas (Adelmann, 2005). Embora as atividades biológicas do própolis estejam sempre presentes, amostras de áreas com clima e localização ligeiramente diferentes têm espetros distintos de atividade (Artika e*t al.*, 2011). No Brasil nota-se uma diferença mais acentuada nas propriedades biológicas e a na composição química para as diferentes amostras recolhidas nas diferentes partes do país, facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira em contraste com as zonas temperadas, onde a diversidade é menor (Pereira *et al.*, 2012).

As principais espécies de plantas visitadas pelas abelhas são choupos (*Populus spp.*), faia (*Fagus sylvatica*), castanha de cavalo (*Aesculus hippocastanum*), vidoeiro (*Betula alba*), amieiro (*Alnus glutinosa*) e várias árvores coníferas. As espécies de origem podem variar de acordo com as regiões geográficas, determinando a composição química de própolis. Na verdade, existem diferenças entre zonas temperadas e tropicais: enquanto os materiais utilizados em regiões temperadas são essencialmente exsudados de diferentes árvores de álamo, estes estão ausentes nas zonas tropicais e as abelhas usam o exsudato de outras plantas - principalmente da resina da folha de *Baccharis dracunculifolia* – que dá à resina uma composição diferente. O própolis europeu contém os típicos fenólicos: agliconas de flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas), ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico) e seus ésteres (Figura 1), enquanto que os principais constituintes do própolis brasileiro são terpenóides e derivados prenilados de ácidos *p*-cumárico. As principais fontes de própolis europeu são botões de álamos (*Populus* spp.) enquanto no Brasil existem pelo menos quatro fontes distintas de resina: *Baccharis dracunculifolia*, a planta alecrim-do-campo (própolis verde), *Dalbergia ecastophyllum* (própolis vermelho), *Hyptis divaricata* (própolis castanho brasileiro) e *Populus alba* (própolis popular). Em Cuba e Venezuela as abelhas colhem resinas de *Clusia* spp. (Falcão *et al.*, 2010, 2013; Fokt *et al.*, 2010; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

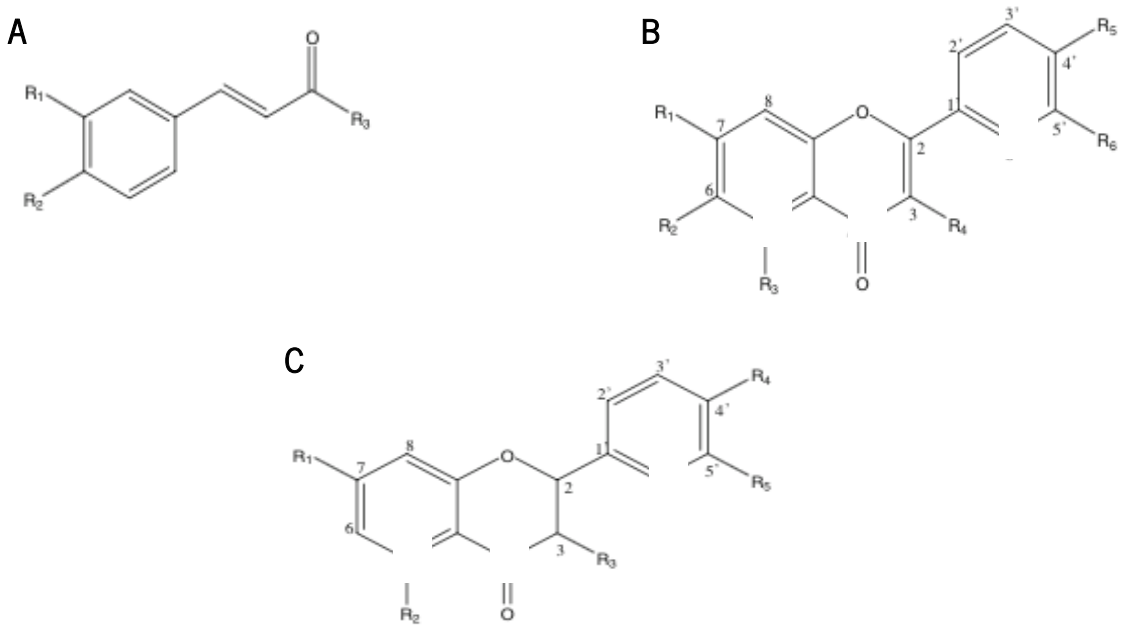


Figura 1. Estrutura básica dos principais compostos do própolis de zonas temperadas: ácidos fenólicos (A), flavonas e flavonóis (B) e flavononas e dihidroflavonóides (C). Adaptado de Falcão *et al.*, 2010.

Estudos mais recentes com própolis de diferentes regiões de Portugal revelaram diversidade das amostras no que respeita ao conteúdo total em fenóis e a parâmetros físico-químicos (Falcão *et al.*, 2013). Isto deve-se em particular à diversidade botânica e à necessidade das abelhas procurarem alternativas às fontes de resina habituais nos locais onde estas não estão presentes. Nas amostras de própolis português comum (semelhante ao das zonas temperadas) encontra-se elevado número de flavonóis metoxilados, nomeadamente derivados de quercetina e campferol como quercetina-3-metilo, éter dimetil-quercetina, éter tetrametil-quercetina, ramnetina e quercetina-éter dimetil, metil-campferol, campferido e éter dimetil-campferol, entre outros. Algumas amostras de própolis possuem compostos não detetados em amostras de própolis comum: ácido elágico, luteolina, um flavonol dimetoxilado e uma di-hidroxi-dimetoxiflavona (Falcão *et al.*, 2013).

Os compostos voláteis (produzidos pelas plantas de origem) estão presentes em pequenas quantidades no própolis e são diferentes em todo o mundo. Atualmente sabe-se que as abelhas recolhem materiais resinosos, produzidos por variados processos, em diferentes partes das plantas: materiais lipofílicos nas folhas e brotos de folhas, mucilagens, gomas, resinas, treliças, entre outros. Alguns compostos estão, provavelmente, presentes em todas as amostras de própolis e contribuem para as suas propriedades características. Outros estão representados em muitas amostras de diferentes origens, mas alguns outros só ocorrerão em própolis de determinadas espécies de plantas

(Bankova *et al.*, 2014). Recentemente, novos tipos de própolis e fontes botânicas têm sido descritos, tais como o própolis do Pacífico (fonte vegetal: *Macaranga* spp.), própolis Mediterrânico (fonte vegetal: coníferas) e própolis brasileiro da Amazónia (fonte vegetal: provavelmente *Clusia* sp.) (Fokt *et al.*, 2010; Fernandes-Silva *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

1.3 Atividades biológicas do própolis

Muitos países estão interessados em produtos naturais com propriedades clínicas relevantes e o própolis é um desses produtos, tendo vindo a ser consideravelmente estudado nos últimos anos (Mirzoeva *et al.*, 1997). Hoje em dia, é encontrado em muitas lojas de produtos naturais em várias formas, para ingestão ou uso tópico. É ainda usado em muitas regiões do mundo, incluindo o Japão e a União Europeia, seja em produtos cosméticos ou na medicina alternativa e popular para o tratamento de várias doenças (Fokt *et al.*, 2010). Embora variáveis, as atividades biológicas do própolis são relatadas independentemente de espécies de plantas e origem geográfica, essas atividades são certamente importantes para a colmeia. Vários estudos *in vitro* demonstram tais bioatividades, o seu potencial terapêutico e aplicações, particularmente a atividade antibacteriana (Marcucci, 1996; Mirzoeva *et al.*,1997; Pfaller *et al.*, 1990; Bedendo e Bianchini, 1998), a antifúngica (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996; Fokt *et al.*, 2010), antiviral (Pfaller *et al.*, 1990; Mirzoeva *et al.*, 1997; Castro, 2001), quimiopreventiva (Król *et al.*, 2013), antitumoral (Mirzoeva *et al.*, 1997; Castro, 2001; Valença, 2011; Silva-Carvalho et al., 2014), antioxidante (Marcucci, 1996; Mirzoeva *et al.*, 1997; Castro, 2001), anti-inflammatória (Marcucci, 1996; Mirzoeva *et al.*, 1997), anti-protozoária (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996) e citotóxica (Burdock, 1998; Fokt *et al.*, 2010; Fernandes-Silva *et al.*, 2013; Frozza *et al.*, 2013). Outras propriedades também foram atribuídas ao própolis, tais como o seu papel na regeneração de cartilagem e osso (Marcucci, 1996), as atividades anestésicas (Marcucci, 1996), antidepressivas (Król *et al.*, 2013), imunomoduladora (Gregoris *et al.*, 2011), hepatoprotetora (Castro, 2001) e proteção contra a radiação ultra-violeta (Gregoris *et al.*, 2011). Algumas destas atividades biológicas estão sempre presentes na maioria das amostras de própolis, embora associadas a diferentes perfis químicos nas amostras de diferentes origens. Todas essas atividades foram estudadas e analisadas principalmente *in vitro*, com potencial para serem aplicadas na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar. As aplicações atuais de própolis incluem soluções para a síndrome de frio (infeções do trato respiratório superior, infeções gripais, resfriado comum), bem como preparações dermatológicas úteis na cicatrização de feridas, tratamento de queimaduras, acne, herpes simples e

genital, e neurodermatite (Fokt *et al.*, 2010; Kuropatnicki *et al.*, 2013). De acordo com Endler *et al.* (2003), o própolis é de grande valor na medicina natural para a prevenção de doenças respiratórias, incluindo faringite, tonsilite, bronquite e asma. Além disso, o própolis é utilizado em pastas de dentes e colutórios para prevenir e tratar a cárie, gengivite e estomatite. É amplamente utilizado em produtos cosméticos e em alimentos e bebidas saudáveis, está disponível comercialmente sob a forma de cápsulas, soluções de lavagem bucal, extratos, pastilhas para a garganta, cremes, pós e também em produtos mais purificadas nos quais a cera foi removida (Fokt *et al.*, 2010).

1.3.1 Atividade anti-tumoral e citotóxica

O ácido cafeico feniletil éster (CAPE) e os flavonóides semelhantes possuem diversas propriedades biológicas e farmacológicas incluindo efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios (Alizadeh *et al.*, 2015) assim como actividade anti-tumoral (Chen *et al.*, 2013). Alguns estudos foram dedicados à investigação do efeito do CAPE na transição epitélio-mesênquima (EMT) de células de cancro pancreático humano, tendo-se concluído que CAPE poderia inibir o crescimento ortotópico e a EMT de células de cancro do pâncreas (Chen *et al.*, 2013). Estudos em própolis israelita mostraram uma citotoxicidade em várias linhas tumorais e a atividade anti-tumoral de CAPE (Banskota *et al.*, 2001). O própolis iraniano mostrou um efeito inibitório potente na proliferação celular, apresentando um efeito citotóxico em cancro gástrico, em parte devido à presença do CAPE (Alizadeh *et al.*, 2015). Outros autores mostraram que nimfaeol-A, o principal componente do própolis Okinawan, suprime a angiogénese e pode ser um agente útil para a prevenção de angiogénese induzida por tumores (Tsuchiya *et al.*, 2013). Noutro estudo, Choudhari *et al.* (2013) testaram os efeitos citotóxicos e apoptóticos de um extrato etanólico de de própolis indiano em diferentes linhas celulares de cancro e demonstraram a sua atividade anti-cancerígena por indução da apoptose nas linhas celulares testadas. Em Portugal o número de estudos para a atividade anti-tumoral tem aumentado nos últimos anos. Em extratos etanólicos de própolis português, nomeadamente do Pereiro, estes efeitos citotóxicos, assim como a diminuição da proliferação e migração celulares em linhas de células tumorais também se verificaram, nomeadamente em linhas celulares humanas de cancro da mama (MDA-MB-231, MDA-MB-468 e MCF7), cancro da prostata (DU145 e 22RV1) e glioblastoma (U251 e SW1088) (Valença, 2011 e Silva-Carvalho *et al.* 2014). Extratos fenólicos de outras amostras de própolis português também revelaram citotoxicidade contra linhas celulares do carcinoma do cólon humano (Calhelha *et al.*, 2014).

1.3.2 Atividade anti-inflamatória

Existe também literatura sobre própolis respeitante à atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (Ramos e Miranda, 2007; Machado *et al.*, 2012; Król *et al.*, 2013). Alguns investigadores demonstraram que o extrato de própolis verde brasileiro é eficaz na regulação de inflamossomas que são formados no citoplasma celular em resposta a sinais de stresse, toxinas, e infeções microbianas (Machado *et al.*, 2012). Também mostrou uma ação direta contra o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, exibindo efeitos imunomoduladores sobre macrófagos murinos (Machado *et al.*, 2012; Król *et al.*, 2013). Própolis do Nepal possui flavonóides que contribuem para a atividade anti-inflamatória por interferência nas vias de sinalização de IL-33 (Funakoshi-Tago *et al.*, 2015). Extratos etanólicos de própolis chinês mostraram efeitos na modulação de mediadores inflamatórios, inibindo a produção de citocinas inflamatórias (Wang *et al.*, 2014). Valenzuela-Barra *et al.* (2015) compararam dois extratos provenientes de localizações distintas do Chile e ambos mostraram atividade anti-inflamatória semelhante, apesar da diferença de concentração de alguns flavonóides e fenóis.

1.3.3 Atividade antimicrobiana

Os fármacos antimicrobianos têm sido muito utilizados para fins terapêuticos, conduzindo ao aparecimento de microrganismos resistentes, facto que se tornou uma preocupação mundial grave, aumentando a investigação em produtos naturais (Campos *et al.*, 2015). A atividade antimicrobiana é influenciada pela variação da composição química do própolis, de local para local (Hegazi *et al.*, 2000; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). As atividades antifúngicas e antibacterianas são efetivamente as propriedades mais estudadas de própolis e um vasto leque de informações sobre tais bioatividades está disponível (Marcucci, 1996; Boisard *et al.*, 2015; Lopez *et al.*, 2015; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Estas atividades antimicrobianas podem ser comparadas e avaliadas pelo cálculo da concentração mínima inibitória - MIC (do inglês *minimum inhibitory concentration*) - e/ ou da concentração bactericida, ou fungicida, mínima - MBC ou MFC (do inglês *minimum bactericidal* ou *fungicide concentration*) as quais consistem, respetivamente, na concentração mais baixa testada capaz de inibir completamente o crescimento ou matar o microrganismo (bactéria ou fungo) em teste (Kubo *et al.*, 1995).

1.3.4 Atividade antifúngica

O efeito fungicida de própolis tem sido amplamente estudado em diversas estirpes (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996; Fokt *et al.*, 2010; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Os compostos voláteis do própolis são ativos contra vários tipos de fungos quer patogénicos para humanos e/ ou plantas quer não patogénicos, nomeadamente contra *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (Kuropatnicki *et al.*, 2013; Bankova *et al.*, 2014). Estudos com própolis brasileiro mostraram que a presença de ácidos diterpenos, triterpenos, ácidos aromáticos e compostos fenólicos está associada à atividade contra *Candida glabrata* e *Candida albicans* (Campos *et al.*, 2015). O própolis é o produto da colmeia com a atividade antifúngica mais elevada contra estirpes como *Candida famata, Candida glabrata, Candida kefyr, Candida pelliculosa, Candida parapsilosis, Pichia ohmeri, Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei*, *Rhodotorula* sp. e *Trichosporon* spp. (Fernandes *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2006; Longhini *et al.*, 2007; Wagh, 2013). No entanto, as estirpes mais resistentes num estudo de Wagh (2013) foram *Candida albicans* e *Candida tropicalis* e a mais sensível foi *Rhodotorula* sp.. As leveduras *Candida albicans,* C*andida glabrata, Candida tropicalis, Candida guilliermondii e Candida parapsilosis* têm uma enorme importância na candidíase vulvovaginal. Os extratos de própolis brasileiro testados contra estas estirpes isoladas de candidíase vulvovaginal mostraram uma enorme eficácia, fornecendo informações importantes para uma possível aplicação no tratamento deste tipo de candidíase (Wagh, 2013).

O própolis pode ter alguns efeitos sinérgicos importantes quando utilizado em combinação com agentes antimicrobianos. O própolis vermelho do Brasil mostrou efeitos farmacológicos importantes ao nível da resistência de alguns fungos a drogas. Estudos de associação deste própolis com natamicina ou nistatina (antifúngicos) melhora a sua ação em *Candida albicans* (Pippi *et al.*, 2015). A combinação do própolis com outro agente antifúngico - fluconazol - também aumentou a eficácia fungicida contra *Candida tropicalis* (Pippi *et al.*, 2015).

1.3.5 Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana do própolis é complexa e tem sido associada a compostos fenólicos (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996; Mirzoeva *et al.*,1997; Bedendo e Bianchini, 1998). Tem-se registado uma forte atividade contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus glutamicus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea*,

Streptococcus pyogenes, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, entre outras (Fernandes *et al.*, 1995; Probst *et al.*, 2011; Bankova *et al.*, 2014). Quanto a bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonie* e *Pseudomonas aeruginosa* a atividade dos extratos de própolis é mais reduzida, ou mesmo nula (Grange e Davery, 1990; Sforcin et al., 2000; Kartel *et al.*, 2003; Bankova *et al.*, 2014). O estudo de Bankova *et al.* (2014) mostrou ainda uma ação sinérgica entre extratos etanólicos de própolis e óleos essenciais de plantas contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Outros estudos mostram atividade antibacteriana por exemplo contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella sp.* (Kurek-Górecka *et al.*, 2014). O própolis mostra efeito inibitório preferencialmente contra cocos e bactérias Gram-positivas: estudos com própolis de origem polaca mostraram elevada atividade contra bactérias Gram-positivas ao contrário das bactérias Gram-negativas. As estirpes mais sensíveis foram *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus piogenes* (Scheller *et al.*, 1999; Kurek-Górecka *et al.*, 2014). O própolis indiano pode ser usado como agente anticáries por inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* (Wagh, 2013) Outros estudos mostraram também eficácia do própolis polaco na manutenção da flora bacteriana na pele de pacientes acamados (Kurek-Górecka *et al.*, 2014). Estas atividades antibacterianas podem resultar da atividade sinérgica entre os diferentes compostos do própolis, especialmente compostos como pinocembrina, apigenina e ácido cumárico (Kurek-Górecka *et al.*, 2014).

Outros estudos têm revelado efeitos sinérgicos de própolis com diversos fármacos anti-tuberculose e antibióticos (gentamicina, tetraciclina, netilmicina entre outras) (Kurek-Górecka *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). O própolis indiano combinado com clorexidina (bactericida), por exemplo, mostrou uma enorme atividade contra *Streptococcus mutans*, patogénico da placa dentária, podendo ser usado no tratamento de cáries dentárias (Wagh, 2013).

1.3.6 Atividade antioxidante

Os compostos naturais são ricos em polifenóis cujos efeitos benéficos são atribuídos a mecanismos antioxidantes. Os antioxidantes controlam o nível de radicais livres de forma a evitar os danos oxidativos. Estes compostos podem atuar como antioxidantes ou pro-oxidantes. Em condições de pro-oxidação podem induzir stresse oxidativo, por produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) ou por inibição das defesas antioxidantes. As células expostas a baixas concentrações dos compostos naturais são normalmente protegidas do stresse oxidativo mantendo a viabilidade, já a elevadas concentrações os mesmos compostos naturais podem ser citotóxicos por

indução de stresse oxidativo (Nasri e Rafieian-Kopaei, 2014).

Vários estudos comprovam a atividade antioxidante de extratos de própolis de várias origens (Choi *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Mavri *et al.*, 2012; Fabris *et al.*, 2013; Wagh, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Os radicais livres ativos, juntamente com outros fatores, estão associados ao envelhecimento celular, artrite, cancro, diabetes, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e hepatoxicidade, entre outras patologias. Estudos *in vitro* mostram que extratos de própolis protegem linhas de células de ratos contra danos em células do fígado (Wagh, 2013). O própolis argelino revelou uma elevada atividade antioxidante, capaz de proteger mitocôndrias dos efeitos tóxicos provocados por desoxirrubicina (droga anticancerígena que provoca hepatoxicidade por geração de radicais livres) e de aumentar as defesas antioxidantes (Wided *et al.*, 2014). Estudos com extrato de própolis verde brasileiro revelaram o seu efeito na inibição de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), radicais hidroxilo e superóxido. O tratamento com este própolis reduziu a resposta inflamatória e a hepatoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4), mediada por radicais livres (Paulino *et al.*, 2014). Uma elevada concentração de polifenóis corresponde a um elevado poder antioxidante Extratos etanólicos preparados a partir de própolis colhidos em Itália, Brasil e Rússia foram estudados por Fabris *et al.* (2013) que verificaram que as amostras italianas e russas tinham um teor de polifenóis idêntico e atividade antioxidante semelhante. Por outro lado o própolis brasileiro possuía baixo teor de polifenóis e um fraco poder antioxidante.

1.4 Efeitos protetores do própolis

1.4.1 Efeitos protetores no fígado

Vários autores investigaram os efeitos protetores de extratos etanólicos de própolis no fígado (Seo *et al.*, 2003; Kismet *et al.*, 2008). O própolis coreano atua nas enzimas de fase I e II responsáveis pela hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (AA, paracetamol). Em ratos, o tratamento prévio com própolis reduziu a mortalidade, a incidência e a gravidade da necrose hepática induzida pelo AA. O tratamento com 50 e 100 mg/kg de própolis diminuiu a atividade de um citocromo específico, P4502E1 (N-nitrosodimetilamina N-desmetilase), mas aumentou significativamente as atividades de GST (glutationa-s-transferase) e PST (fenolsulfotransferase). Por outro lado, nos ratos tratados com 10 e 25 mg/kg, as atividades dos citocromos P450, em geral, foram inibidas drasticamente, e a atividade de PST foi significativamente reforçada. Os resultados sugerem um efeito protetor de própolis sobre a

lesão hepática, e que o seu efeito pode ser explicado pela inibição de enzimas de fase I e indução de enzimas de fase II (Seo *et al.*, 2003).

Outros investigadores descobriram que o extrato de própolis aquoso protege o fígado de ratos contra a lesão com CCl_4, que se manifesta por uma diminuição na libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) citosólica, diminuição da produção de peróxido lipídico e manutenção do conteúdo de glutationa (GSH) celular reduzida. A atividade antioxidante de tectocrisina, um flavonóide do própolis, foi investigada e este composto exibiu uma diminuição significativa na atividade das transaminases séricas, elevadas por lesão hepática induzida pela intoxicação dos ratos com CCl_4. Verificou-se também que a tectocrisina aumentou a atividade de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase citosólica hepática, catalase e glutationa peroxidase em ratos intoxicados com CCl_4 (Banskota *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003).

Própolis também mostrou ter um efeito protetor contra a lesão hepática provocada pelo álcool, impedindo o aumento total de enzimas de citocromo P450, NADPH dependente de citocromo C redutase e a peroxidação lipídica (Lin *et al.*, 1999).

1.4.2 Efeitos protetores no cérebro

Os efeitos do CAPE, um componente ativo de própolis que apresenta propriedades antioxidantes foram investigados como sequestrador de radicais livres. Os radicais livres derivados de oxigénio têm sido implicados na patogénese da lesão cerebral após a isquemia-reperfusão. CAPE suprime a isquemia-reperfusão induzida por peroxidação lipídica e lesão cerebral (Ilhan *et al.*, 1999).

O tecido do sistema nervoso central é particularmente vulnerável aos danos oxidativos, sugerindo que a oxidação desempenha um papel importante na patogénese de esclerose múltipla e no seu modelo animal, a encefalomielite autoimune experimental (EAE). CAPE foi examinado quanto aos seus efeitos sobre os danos oxidativos dos tecidos de EAE em ratos (Ilhan *et al.*, 2004). O tratamento com CAPE inibiu significativamente a produção de ROS induzida pela EAE. Estes resultados sugerem que CAPE pode exercer o seu efeito anti-inflamatório através da inibição da produção de ROS por inibição direta da atividade catalítica da enzima indutível óxido nítrico sintetase.

1.4.3 Efeitos protetores no coração

Alguns estudos demonstraram efeito anti-hipertensivo do própolis em ratos. A administração de extratos etanólicos e aquosos de própolis chineses em ratos diabéticos levou à diminuição dos níveis

de glucose no sangue, frutosamina, malonaldeído, óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintetase (NOS), colesterol total, triglicéridos, colesterol de lipoproteína de baixa densidade, colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade no soro de ratos em jejum, e ao aumento dos níveis séricos de colesterol de lipoproteína de alta densidade e superóxido dismutase (SOD). Estes resultados sugerem que o própolis pode controlar a glucose no sangue e modular o metabolismo da glucose e lípidos no sangue, levando a uma diminuição da peroxidação lipídica e à eliminação dos radicais livres em ratos com diabetes (Yoko *et al.*, 2004; Fuliang *et al.*, 2005; Sforcin e Bankova, 2011).

A miocardiopatia induzida pela doxorrubicina é a consequência do stresse oxidativo através da mediação de radicais livres. Uma elevação dos níveis do soro de creatina fosfoquinase, aspartato aminotransferase, sangue, glutationa (GSH), e ácido tiobarbitúrico foi observada após tratamento com doxorrubicina. Um pré-tratamento de extrato etanólico de própolis indiano reduziu significativamente os valores destes parâmetros, demonstrando o efeito cardioprotetor do própolis em cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (Chopra *et al.*, 1995).

1.5 Influência do própolis no metabolismo celular e o seu modo de ação

Há uma necessidade urgente de descobrir novos medicamentos antimicrobiamos, particularmente antifúngicos. Atualmente há cinco classes diferentes de antifúngicos, considerando os seus mecanismos de ação: anfotericina B, azóis, caspofungina (equinocandina), micafungina (equinocandinas) e anidulafungina (equinocandinas) (Ludovico *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2011). A maioria destas substâncias afeta a integridade da membrana celular ou da parede celular através da inibição de qualquer síntese de ergosterol ou de síntese de quitina/ α-glucano, respetivamente. Uma outra limitação para este conjunto restrito de fármacos é a aquisição de resistência por parte dos fungos patogénicos, particularmente observadas em situações clínicas (Adelmann 2005; Castro *et al.*, 2012). Enquanto a anfotericina B tem atividade fungicida, os azóis são geralmente agentes fungistáticos para *Candida spp.* e fungicidas para *Aspergillus* spp, todavia as equinocandinas são fungicidas contra *Candida spp.* e fungistáticas contra *Aspergillus* spp. (Fernandes *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2011).

Devido ao elevado uso do própolis na medicina popular e do crescente desejo de incluir este produto no mercado a explorar novas aplicações, é indispensável entender o seu modo de ação para comprovar a sua eficácia. A forma como este composto interfere com a fisiologia dos microrganismos

não tem sido investigada exaustivamente (Mirzoeva *et al.*, 1997). Poucos estudos têm sido realizados em células de levedura, especialmente em *S. cerevisiae*, um dos organismos modelo de eleição para estudos biológicos, a fim de compreender como o própolis afeta as células eucarióticas (Castro *et al.*, 2012). Recentemente, demonstrou-se que a maioria das proteínas cuja exclusão aumenta a sensibilidade das estirpes de levedura a própolis estão envolvidas em mecanismos de divisão celular, na cadeia transportadora de eletrões mitocondrial, na acidificação vacuolar, na regulação da proteína associada à macro-autofagia, no direcionamento para os vacúolos em resposta à ausência de nutrientes e na regulação negativa da transcrição do promotor da RNA polimerase II (Castro *et al.*, 2011). Mais tarde, Castro *et al.* (2012) relataram que o própolis é capaz de induzir a morte celular por apoptose, no entanto, um aumento da exposição aos compostos de própolis resulta num aumento da morte celular por necrose. Este estudo corrobora, também, a hipótese já levantada de que a sensibilidade a própolis dependeria essencialmente da função mitocondrial, da acidificação vacuolar e da autofagia. Está já também descrito que o própolis é capaz de inibir a transição morfológica levedura-hifa promovendo o controlo do crescimento celular (Campos *et al.*, 2015).

No que respeita às bactérias, o própolis inibe o crescimento e a multiplicação de bactérias. Como já foi referido as bactérias Gram-positivas são por norma mais sensíveis que as Gram-negativas, o que se pensa dever-se às diferenças estruturais na parede celular dos dois tipos de bactérias. Determinados compostos do própolis podem aumentar a permeabilidade da membrana e inibir a mobilidade bacteriana (Campos *et al.*, 2015). Estudos com *Streptococcus agalactiae* mostraram que o própolis inibiu o crescimento bacteriano, impedindo a divisão celular, o que resultou na desorganização do citoplasma, membranas citoplasmáticas e paredes celulares originando bacteriólise parcial e inibição da síntese de proteínas (Mavri *et al.*, 2012).

1.6 Efeitos do própolis ao nível do DNA

A manutenção estável do DNA genómico intacto é essencial para a sobrevivência da célula. Agentes endógenos e exógenos podem danificar o DNA celular continuamente. As células possuem um ambiente químico altamente reativo em que as espécies reativas, tais como radicais livres, são sub-produtos do metabolismo celular ou a consequência da existência nas células de um ambiente rico em oxigénio que provavelmente termina em danos (Zhou e Elledge, 2000). O resultado dos danos no DNA é geralmente adverso, contribuindo para processos degenerativos, tais como o envelhecimento, mutações, cancro e outras desordens neurológicas. O DNA pode sofrer vários tipos de danos desde

quebras em cadeia simples ou dupla, modificações nas bases ou açúcares e ligações cruzadas DNA-proteína (Huang e Kolodner, 2005). Os locais AP (locais sem uma base - purina ou pirimidina) são uma das lesões mais frequentes no DNA. Danos nas bases de DNA podem surgir de várias formas: por metilação, oxidação e desaminação de bases normais, obtendo-se uma variedade de lesões, tais como N^7-metilguanina (N^7-meG), 8-oxo-7,8-dihidroguanine (8-oxoG), 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (Tg) ou uracilo (Wang *et al.*, 1998; Boiteux e Guillet, 2004).

O própolis é um composto antioxidante; no entanto, em determinadas circunstâncias, pode também atuar como um pro-oxidante e induzir lesões oxidativas no DNA. Alguns estudos mostraram que os iões de metais de transição são necessários para tais lesões induzidas por própolis, e que os flavonóides do própolis, que têm sido associados com a sua capacidade antioxidante, podem causar danos ao DNA. Porém, em condições normais, os organismos podem reparar os danos no DNA genómico e restaurar o genoma normal, a integridade funcional e química (Tsai *et al.*, 2012).

1.7 Espécies reativas de oxigénio (ROS) e defesas oxidativas

As espécies reativas de oxigénio podem ser produzidas a partir de fontes tanto endógenas como exógenas e são formadas durante o metabolismo celular normal. Quando em alta concentração as ROS tornam-se tóxicas, sendo associados ao processo de envelhecimento e a patogenicidade de várias doenças, tais como doenças neurodegenerativas e cancro (Silva *et al.*, 2009).

As potenciais fontes endógenas de ROS incluem a mitocôndria (cadeia transportadora de eletrões mitocondrial), metabolismo do citocromo P450, metabolismo de compostos exógenos, radiação ionizante, peroxissomas e possivelmente a ativação de células inflamatórias. A produção de ROS é contrabalançada por um sistema de defesa antioxidante intrínseco que inclui sequestradores enzimáticos ou não, tais como superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSH-Px) e glutationa redutase (GSH-R) e alguns antioxidantes como flavonóides, vitamina C: ácido ascórbico, vitamina E: α-tocoferol, carotenóides, e outros, que mantêm o estado redox celular (Figura 2). Quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante celular, as consequências são a modificação de biomoléculas (proteínas celulares, lipídios e DNA), o que pode levar à morte celular ou à aceleração do envelhecimento e doenças relacionadas com a idade. Existem grandes fontes de antioxidantes naturais, como por exemplo flavonóides, carotenóides, ácidos fenólicos e vitaminas que podem neutralizar os radicais livres e podem servir como base para o desenvolvimento de novos medicamentos (Huang e Kolodner, 2005; Ferreira *et al.*, 2007 Silva *et al.*, 2009; Carocho e Ferreira,

2013).

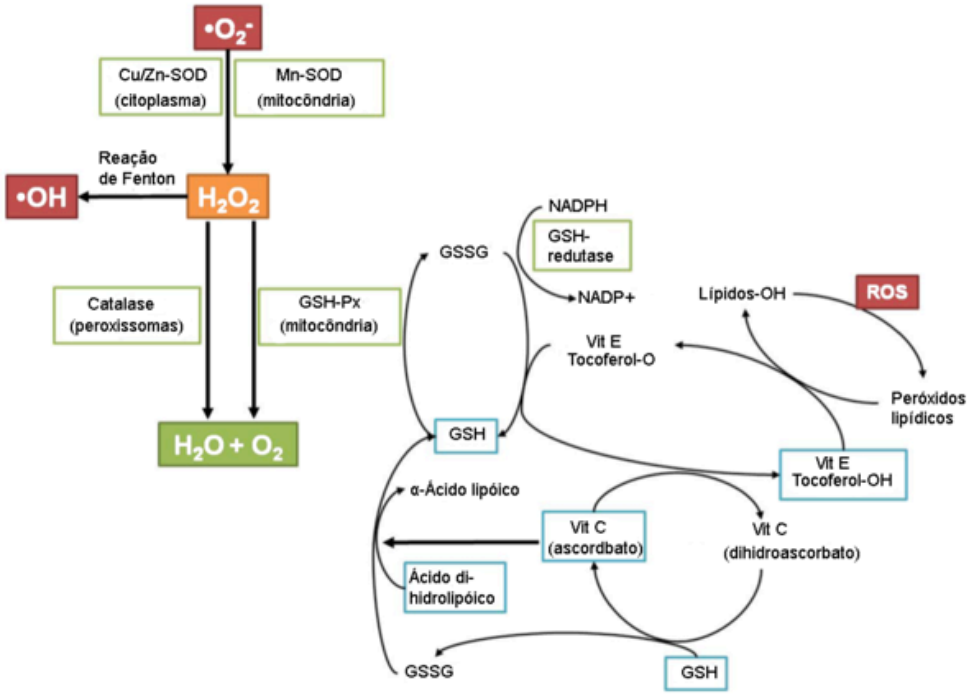


Figura 2. Defesas antioxidantes no organismo: SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH: glutationa; GSH-Px: glutationa peroxidase; GSH-R: glutationa redutase; Vit. C: ácido ascórbico; Vit. E: α-tocoferol. Adaptado de Lazo-de-la-Vega-Monroy e Fernández-Mejía, 2013.

O superóxido, peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilo, mutagéneos produzidos por radiação, também são sub-produtos do metabolismo normal. Os organismos desenvolveram mecanismos de defesa contra os radicais livres a partir de muitas fontes. As superóxido dismutase catalisam a conversão de O_2^- em H_2O_2 e O_2. O H_2O_2 produzido pode ser eliminado diretamente por oxidases específicas, isto é, por catalases e peroxidases. As catalases realizam uma reação de dismutação no qual um H_2O_2 oxida outro de tal modo que um é convertido em O_2 e o outro em duas moléculas de água (Fridovich, 1999).

1.8 Modelo: Saccharomyces cerevisiae

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro eucariota com a sequência completa do genoma e tem disponível uma coleção de mutantes que cobrem virtualmente todos os genes não essenciais. O uso de *S. cerevisiae* como modelo tem inúmeras vantagens tanto intrínsecas como em sistema experimental. Este organismo pode ser cultivado em meio definido, que fornece um controlo completo do ambiente químico e físico. A levedura tem um ciclo de vida que é idealmente apropriado para análise genética clássica, e isto permitiu a construção de um mapa genético detalhado (Goffeau *et al.*, 1996; Botstein *et*

al., 1998). Os microrganismos estão constantemente a enfrentar ambientes em mudança, por exemplo em termos de disponibilidade de nutrientes. A glucose é a fonte de carbono e energia preferida de *S. cerevisiae*, uma levedura respiro-fermentativa (pode mostrar diferentes fenótipos metabólicos: a fermentação e respiração) caracterizada pela ocorrência do efeito de Crabtree. Exibe altas taxas de captação de glucose, que é transformada em etanol sob condições aeróbias, e as taxas de captação de glucose diminuem gradualmente reduzindo a produção de etanol até à completa ausência de fermentação. Durante a fase logarítmica de crescimento inicial, esta levedura cresce por fermentação utilizando a glucose disponível. Quando a glucose se torna limitativa, o etanol acumulado durante a primeira fase de crescimento com o catabolismo da glucose é usado para o crescimento subsequente. Quando este etanol é finalmente esgotado, as células entram na verdadeira fase estacionária (Herman, 2002; Christen e Sauer, 2011; Huberts *et al.*, 2012).

1.9 Objetivos

O própolis é um composto com uma ampla aplicação na medicina popular. Tendo em vista a sua utilização para aplicações específicas, o objetivo deste trabalho foi estudar amostras de própolis de origem portuguesa, recolhidas ao longo de 5 anos (2010, 2011, 2012, 2013 e 2014) num apiário (Pereiro), localizado na região da Beira Alta. Para o efeito foram pesquisadas diversas atividades biológicas em extratos etanólicos (EE) do própolis do Pereiro (P), previamente preparados (P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE), a fim de se compararem os diferentes anos de colheita. As atividades antibacteriana e antifúngica contra um painel de bactérias e leveduras de interesse clinico e biotecnológico foram avaliadas.

A levedura *S. cerevisiae* foi selecionada como modelo biológico para os estudos subsequentes, uma vez que, sendo um organismo extensamente caracterizado, o seu genoma está completamente sequenciado e está disponível uma coleção de mutantes que cobre praticamente todos genes não essenciais (Goffeau *et al.*, 1996). Procedeu-se à avaliação da influência de própolis ao nível da viabilidade celular, quer em condições fermentativas quer respiratórias. De modo a compreender o modo de ação destes extratos, avaliou-se a sensibilidade de alguns mutantes aos vários P.EEs e a influência destes extratos no potencial da membrana mitocondrial recorrendo-se para o efeito à citometria de fluxo. As propriedades antioxidantes foram avaliadas em ensaios de viabilidade, por sua vez realizados em condições de co- e pré-incubação com o agente oxidante H_2O_2. A oxidação intracelular e atividade antioxidante contra H_2O_2, também em condições de co- e de pré-incubação,

foram igualmente analisadas por citometria de fluxo. Para completar o estudo, avaliou-se ainda o efeito genotóxico dos cinco extratos recorrendo ao ensaio cometa em células de *S. cerevisiae*.

Com este estudo pretendemos clarificar e caracterizar as bioatividades do própolis de origem portuguesa assim como contribuir para a elucidação do seu modo de ação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de própolis

As amostras de própolis utilizadas neste trabalho foram obtidas num apiário localizado na região da Beira Alta - freguesia do Pereiro (P), concelho de Pinhel e distrito da Guarda (N 40° 44′57.135″, O 7° 0′59.403″, altitude: 672,600 m) - recolhidas em diferentes anos (2010, 2011, 2012, 2013 e 2014) e foram usadas para preparar extratos etanólicos.

2.1.1 Preparação de extratos etanólicos

Os extratos etanólicos (EE) de própolis foram preparados de forma semelhante, no decurso de diferentes trabalhos, adicionando-se à amostra bruta etanol absoluto (EtOH), numa proporção de 100 mL de EtOH para 15 g de amostra, num *Erlenmeyer,* que se manteve no escuro, num agitador orbital, a 25 °C e 130 rpm (rotações por minuto). A solução obtida foi filtrada recorrendo-se a um funil de *Buchner* e um *Kitasato* associado a uma bomba de vácuo. Os resíduos resultantes foram novamente incubados com 35 mL de EtOH. Os filtrados resultantes foram misturados num frasco de fundo redondo de forma a proceder-se à evaporação do solvente num *Büchi Rotavapor RE 121* com o auxílio de um banho de água *Büchi 461* a uma temperatura de 40 °C e a 46 rpm. Os extratos assim obtidos foram armazenados no escuro a 4 °C até serem utilizados. No final do processo, cinco extratos etanólicos foram obtidos: P10.EE (Valença, 2011), P11.EE (Alves A, não publicado), P12.EE (Pereira, 2013), P13.EE (Alves A, não publicado) e P14.EE (preparado no presente trabalho).

2.2 Microrganismos

O painel de bactérias utilizadas como indicadores de suscetibilidade na avaliação do potencial antimicrobiano das amostras de própolis integrou 19 espécies com interesse clínico e biotecnológico, das quais 8 são bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (CECT 4183), *Bacillus subtilis* (48886), *Bacillus cereus* (ATCC 7064), *Mycobacterium sp.* (NRLL3683), *Cellulomonas fimi* (DSM 20113 T), *Streptomyces aurefaciens* (CECT 3206 T) e *Micrococcus luteus* (931) - e 11 Gram-negativas - *Escherichia coli* (CECT 423), *Proteus vulgaris* (ATCC 29905), *Klebsiella pneumoniae* (JSP 3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella*

typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas putida* (DSM 3931), *Serratia sp.* (JSP 4), *Yersinia enterocolitica* (JSP 6), *Enterobacter cloacae* (JSP 1), *Citrobacter freundii* (JSP) e *Salmonella choleraesuis* (CECT 554).

Em relação às leveduras foram selecionadas 18 estirpes, entre as quais *Candida krusei* (IGC 3341 T), *Candida albicans* (IGC 3436 T e 53 B), *Candida parapsilosis* (28 D), *Candida glabrata* (IGC 2418), *Candida guilliermondii* (26 D), *Candida tropicalis* (IGC 3097 T), *Candida dubliniensis* (CiPO 70) e *Candida lusitaniae* (CiPO 2), que têm um interesse clínico amplamente reconhecido. As restantes, *Dekkera bruxellensis* (IGC 4179LT), *Pichia anomala* (IGC 4121 T), *Zygosaccharomyces bailii (*IGC 5167 T), *Debaryomyces hansenii* (IGC 2968 T), *Pichia membranifaciens* (IGC 3796 T), *Rhodotorula glutinis* (IGC 4177 T), *Zygosaccharomyces rouxii* (NRRL-2547) e *Saccharomyces cerevisiae* (BY4742/ Y0000 e BY4741) possuem na sua maioria importância biotecnológica.

Para estudar o efeito de P10.EE e P12.EE, foram ainda usados no presente trabalho alguns mutantes de *S. cerevisiae*: *sod1*, *sod2*, *yap1*, *ndi1*, *atg1*, *vph1*, vps45 (Tabela1) provenientes da coleção de estirpes da Euroscarf (http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/) e *yca1* (Tabela 1) gentilmente cedido por Francesc Posas (Vendrell *et al.*, 2011). Os mutantes *sod1*, *sod2*, *yap1*, *ndi1*, *atg1*, *vps45* e *vph1* são derivados da estirpe parental BY4741 (*MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0*) enquantoque a estirpe *yca1* é derivada da estirpe parental W303 (*MATa ura3-1 trp1Δ 2 leu2-3,112 his3-11,15 ade2-1 can1-100*).

Tabela 1. Estirpes mutantes utilizadas e respetivos genótipos.

Estirpes mutantes	Genótipos
sod1	(*Mat a his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 YJR104c::kanMX4*)
sod2	(*Mat a his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 YHR008c::kanMX4*)
yap1	(*Mat a his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 YML007w::kanMX4*)
ndi1	(*Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YML120c::kanMX4*)
atg1	(*Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGL180w::kanMX4*)
vph1	(*Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YOR270c::kanMX4*)
vps45	(*Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGL095c::kanMX4*)
yca1	(*Mata ade2-1 ura3-1 leu2-3 112 trp1-1 his3-11 15 can1-100 yca1::KanMX4*)

2.3 Meios de cultura e condições de crescimento

Ao longo deste trabalho, as leveduras foram cultivadas em meio YPD [extrato de levedura 1% (p/v) BD BactoTM, peptona 1% (p/v) BD BactoTM, glucose 2% (p/v)] e as bactérias em meio LB [Luria-Bertani: extrato de levedura 0.5% (p/v), triptona 1% (p/v) BD BactoTM, NaCl 1% (p/v)]. As culturas foram realizadas em meio líquido YPD, no caso das leveduras, e em LB, no caso das bactérias, com uma relação ar/ líquido de 5/ 1 e incubadas a 30 ou 37 °C, respetivamente, num agitador orbital a 200 rpm. Foi utilizado adicionalmente meio de cultura YPEtOH (extrato de levedura 1% (p/v), peptona 1% (p/v) e EtOH 2% (p/v) para cultura de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Para manutenção, as estirpes foram cultivadas em placas de meio YPDA ou LBA (respetivamente YPD ou LB suplementados com 2% (p/v) agar) e incubadas durante 48 ou 24 h (horas) a 30 ou 37 °C caso sejam leveduras ou bactérias, respetivamente, e depois mantidas a 4 °C até se executar nova repicagem.

Na avaliação da atividade antimicrobiana usaram-se os meios LBA ou YPDA suplementados com os diferentes extratos etanólicos de própolis nas concentrações de 100 μgmL^{1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. As placas foram conservadas no escuro e a 4 °C até utilização.

2.3.1 Preparação de culturas

Para estudar o efeito dos P.EEs nas estirpes estudadas, primeiramente procedeu-se à preparação de pré-inóculos em meio YPD ou LB e posterior incubação a 30 ou 37 °C e a 200 rpm em agitador orbital, durante a noite. Os pré-inóculos foram diluídos para uma $D.O._{600}$ (densidade óptica a 600 nm) de 0,1 e incubados novamente nas mesmas condições durante 4 ou 2 h (leveduras ou bactérias), a fim de garantir 2 gerações de crescimento (DO_{600} entre 0,4 e 0,8).

2.4 Efeito dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro ao longo do tempo na viabilidade das estirpes selvagens e em mutantes de *S. cerevisiae* BY4741 e W303

Para o estudo do efeito dos P.EEs na estirpe selvagem de *S. cerevisiae* BY4741 ao longo do tempo, após a confirmação da $D.O._{600}$ retirou-se 1 mL da suspensão de células para microtubos aos quais se adicionou cada um dos extratos etanólicos de própolis estudados para as concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1}. O mesmo procedimento foi realizado na ausência

de P.EE, substituído por EtOH num volume igual ao de extrato usado. Os microtubos foram incubados a 30 °C, 200 rpm num agitador orbital, durante 90 min. Logo após adição do extrato e a intervalos de tempo de 30 min, retiraram-se de cada microtubo 100 µL para proceder a uma sequência de diluições seriadas decimais (10^{-1} a 10^{-4}) em água desionizada (dH_2O) esterilizada. Seguidamente foram retiradas gotas de 5 µL de cada tubo e inoculadas em meio YPDA. As placas foram incubadas invertidas a 30 °C durante 48 h no escuro e o registo fotográfico do resultado foi efetuado recorrendo ao ChemiDoc™XRS. Este ensaio foi também realizado com os mutantes *sod1*, *sod2*, *yap1*, *ndi1*, *atg1*, *vph1*, *vps45* e *yca1* de *S. cerevisiae* para avaliar o efeito de P10.EE e P12.EE em ensaios independentes.

Para estudar o efeito de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE ao longo do tempo na estirpe selvagem de *S. cerevisiae* BY4741 testou-se outro meio de cultura com uma fonte de carbono diferente - YPEtOH. O ensaio seguiu o mesmo procedimento sendo que toda a experiência foi realizada em meio YPEtOH, com as concentrações de 100, 200, 500 ou 750 μgmL^{-1} de cada P.EE.

2.5 Efeito dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro ao longo do tempo em *S. cerevisiae* BY4741 sujeita a condições de co-incubação e pré-incubação com H_2O_2

Uma vez obtida a cultura celular, conforme atrás descrito, distribuiu-se 1 mL por diferentes microtubos que foram submetidos a diferentes tratamentos. Em condições de co-incubação procedeu-se à adição de EtOH (controlo negativo), H_2O_2 5 mM (controlo positivo) ou cada um dos cinco extratos etanólicos em estudo nas concentrações de 50, 100, 200, 500 ou 750 μgmL^{-1} em simultâneo com H_2O_2 5mM. Os microtubos foram incubados a 30 °C, 200 rpm durante 60 min. Após 20, 40 e 60 min retiraram-se alíquotas de 100 µl de cada microtubo, procedeu-se a diluições decimais sequenciais das quais se retiraram gotas de 5 µL para inocular meio YPD. As placas foram incubadas invertidas a 30 °C por 48 h no escuro e foram fotografadas usando o *ChemiDoc XRS ™*.

Em relação aos ensaios de pré-incubação realizou-se primeiramente a adição dos tratamentos (controlo negativo e positivo com EtOH, extratos etanólicos nas concentrações de 50, 100, 200, 500 ou 750 μgmL^{-1}). Os microtubos foram incubados a 30 °C, 200 rpm durante 20 min. Posteriormente realizaram-se duas lavagens com dH_2O esterilizada, e procedeu-se à adição de H_2O_2 5mM aos microtubos a que previamente foram adicionados os extratos de própolis. Ao controlo negativo adicionou-se somente dH_2O. Seguidamente repetiu-se o procedimento atrás descrito para o ensaio em condições de co-incubação.

2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de própolis

Esta bioatividade foi avaliada através do método de diluição em placa, mediante incorporação de cada um dos extratos etanólicos das amostras de própolis que se pretendiam estudar (P10, P11, P12, P13 e P14) num meio sólido apropriado. O procedimento permitiu determinar os valores de MIC (concentração mínima capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, do inglês, *minimum inhibitory concentration*), ou seja, a concentração mais baixa de extrato capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados (Junior *et al.*, 2012), com base na presença/ ausência de crescimento na presença do extrato.

A preparação dos pré-inóculos e inóculos realizou-se como atrás descrito. Após a confirmação de $D.O._{600}$ de 0.4 nas culturas, retiraram-se 100 µL de inóculo para efetuar as diluições decimais 10^{-1} a 10^{-4} e de seguida foram colocadas gotas de 5 µL, de cada diluição, em placas de meio sólido contendo cada um dos extratos etanólicos de própolis estudados nas diferentes concentrações testadas (100, 200, 500 e 750 μgmL^{-1}). A metodologia foi repetida em meios idênticos na ausência de própolis. A incubação decorreu a 30 °C durante 48 h ou a 37 °C durante 24 h no caso das leveduras ou bactérias, respetivamente. A determinação do valor de MIC, para cada par extrato de própolis-microrganismo, foi efetuada por observação da presença/ ausência de colónias em cada placa correspondente a uma concentração de extrato.

2.7 Citometria de Fluxo e Microscopia de Fluorescência

2.7.1 Análise do potencial da membrana mitocondrial com Rodamina 123 (Rh-123)

Uma vez atingida a $D.O._{600}$ entre 0,4 e 0,8, a cultura preparada em YPEtOH foi diluída para uma $D.O._{600}$ de 0,02 em dH_2O esterilizada e 0,5 mL da suspensão celular foram distribuídos em microtubos. Realizaram-se duas lavagens com dH_2O esterilizada recorrendo a centrifugações (centrífuga *Eppendorf mini spain plus 41573*) de 14.100 rcf, durante 2 min. Os sedimentos foram ressuspendidos em 0,5 mL de dH_2O, por amostra. A adição dos tratamentos com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE executou-se para as concentrações finais de 50, 100 ou 200 μgmL^{-1}. No controlo negativo adicionou-se EtOH num volume equivalente ao de extrato adicionado. O controlo de autofluorescência foi realizado apenas com a amostra de células, sem fluorocromo. As alíquotas foram depois incubadas a 30 °C e a 200 rpm, durante 60 min, à exceção do controlo de autofluorescência que foi mantido a 4 °C. Após incubação adicionou-se a cada amostra Rh-123 (para uma concentração final de 50 nM) e incubou-se

10 min no escuro à temperatura ambiente. A leitura da fluorescência foi realizada de imediato no citómetro *Epics XL™ (Beckman Coulter)* equipado com um laser emitindo um feixe de *argonion* 488 nm, a 15 mW . A fluorescência verde foi obtida através de um filtro de bloqueio de 488 nm, de um *long-pass* dicróico de 550 nm e de um *band-pass* de 525 nm. As amostras foram observadas por microscopia de fluorescência (*Leica, DM5000B+CTR5000+ebq100*) para observação da marcação com Rodamina 123.

2.7.2 Avaliação da oxidação intracelular com diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA)

A partir de uma cultura de *S. cerevisiae* em YPD obtida como descrito anteriormente recolheu-se 1 mL e lavou-se duas vezes em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, pH 7.4). A suspensão de células foi diluída para uma $D.O._{600}$ de 0,02 e retiraram-se 0,5 mL para o controlo de autofluorescência. Adicionou-se diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA; 50 µM) e incubou-se durante 60 min a 30 °C, 200 rpm, no escuro. Distribuiu-se a suspensão em alíquotas de 0,5 mL por tubo, adicionaram-se os tratamentos com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE para as concentrações de 50, 100 ou 200 μgmL^{-1} e incubou-se novamente a 30 °C, 200 rpm, durante 60 min no escuro.

Em condições de co-incubação o procedimento é semelhante, com a exceção da adição simultânea dos tratamentos com P.EE e H_2O_2 (concentração final de 5mM). Aos controlosnegativo e positivo foram adicionados, respetivamente, EtOH e H_2O_2, num volume idêntico ao de extrato ou de H_2O_2 adicionado aos tratamentos. A incubação foi realizada no escuro, durante 20 min a 30 °C e 200 rpm.

Na pré-incubação foi realizado um primeiro tratamento com cada um dos cinco extratos etanólicos para as concentrações atrás referidas. Após incubação a 30 °C e 200 rpm durante 20 min, no escuro, realizou-se uma lavagem em PBS e adicionou-se o tratamento com H_2O_2 (concentração final de 5 mM) com a exceção do controlo negativo, ao qual se adiciona EtOH. Procedeu-se a uma incubação de 20 min nas condições já descritas.

A análise das amostras foi realizada por citometria de fluxo [citómetro *Epics XL™ (Beckman Coulter)* equipado com um laser emitindo um feixe de *argonion* 488 nm] a 15 mW para proceder à leitura da fluorescência. A fluorescência verde foi obtida através de um filtro de bloqueio de 488 nm, de um *long-pass* dicróico de 550 nm e de um *band-pass* de 225 nm. A análise dos resultados foi realizada com recurso ao programa Flowing Software 2.5.1.

2.8 Determinação do efeito genotóxico dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro em *S. cerevisiae*

O pré-inóculo e inóculo de *S. cerevisiae* BY4741 foram preparados da forma descrita. De seguida retirou-se 1 mL da suspensão de células para um microtubo e procedeu-se a uma centrifugação por 2 min a 14.100 rcf. Realizaram-se duas lavagens com dH_2O, adicionou-se o tampão de liticase (100 µL liticase (6600 U) + 400 µL dH_2O esterilizada + 500 µL tampão S 2x (2 M sorbitol, 50 mM KH_2PO_4, pH 6.5) + 3.5 µL β- mercaptoetanol (50mM)) e incubou-se a 30 °C, 200 rpm por 40 min a fim de se obterem os esferoplastos. Procedeu-se a duas lavagens com tampão S (1 M sorbitol, 25 mM KH_2PO_4, pH 6.5) seguidas de centrifugação com as mesmas condições (2 min a 14.100 rcf). No final ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão S e dividiu-se a suspensão de esferoplastos em alíquotas de 100 µL, por microtubos, de forma a proceder aos tratamentos: controlo negativo com EtOH, controlo positivo com H_2O_2 10 mM e extratos etanólicos de própolis (10, 25, 50, 100 ou 200 μgmL^{-1}). Após incubação a 30 °C e a 200 rpm por 20 min, procedeu-se a uma centrifugação a 14.100 rcf por 2 min, seguida de lavagem com tampão S. Ao sedimento foram adicionados 25 µL de LMA (*low-melting agarose*) 1,5% p/v em tampão S; a 35 °C, e cada mistura foi de seguida transferida para lâminas revestidas com NMA (*normal-melting agarose;* 0,5% p/v). As lâminas foram submersas em tampão de lise (30 mM NaOH, 1 M NaCl, 50 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 10 mM TrisHCl e 0,052% (p/v) laurilsarcosina, pH 10) por 20 min. De seguida foram submersas em tampão de eletroforese (30 mM NaOH, 50 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, pH 10) por 20 min. A eletroforese realizou-se a 0,7 V/ cm durante 10 min. Seguiu-se a imersão em tampão de neutralização (10 mM Tris HCl, pH 7.4) por 10 min seguida de 10 min em EtOH 96% (v/v). As lâminas foram posteriormente marcadas com *GelRed™* (diluído 3300x, *Biotium)* e analisadas com o microscópio de fluorescência Leica CTR5000. O tratamento das imagens foi realizado no programa *GIMP 2* e os resultados analisados em GraphPad Prism 5. O procedimento anterior foi repetido com a estirpe mutante *yca1* (*Mata ade2-1 ura3-1 leu2-3 112 trp1-1 his3-11 15 can1-100 yca1::KanMX4*) utilizando-se neste caso apenas P10.EE, nas mesmas condições experimentais.

2.9 Análise estatística

Salvo indicação em contrário, os resultados apresentados correspondem a uma experiência representativa de pelo menos três experiências independentes. No caso do ensaio cometa, os resultados apresentados foram expressos como a média ± desvio padrão (SD) de três ensaios

independentes. Para comparar mais de duas médias utilizou-se a análise da variância *one-way* ANOVA, para múltiplas comparações utilizou-se o teste de *Turkey's*. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas quando comparados com o respetivo controlo negativo: * significa $p < 0.05$, ** significa $p < 0.01$, e *** significa $p < 0.001$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito citotóxico de extratos etanólicos de própolis do Pereiro

3.1.1 *S. cerevisiae* BY4741 apresenta sensibilidade a P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE

Com o intuito de estudar a atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis português, testaram-se todos os extratos disponíveis de própolis do Pereiro - P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE - em ensaios de viabilidade com células de *S. cerevisiae*. Esta atividade citotóxica está bem caracterizada em própolis, tendo sido já referida em trabalhos anteriores como por exemplo por Burdock (1998), Fernandes-Silva *et al.* (2013) ou Frozza *et al.* (2013). Os extratos foram testados nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1}, sendo as células incubadas na sua presença durante 0, 30, 60 e 90 minutos, após os quais se retirou uma alíquota de 100 μL para adicionar a 900 μL de dH_2O e proceder-se a uma sequência de diluições decimais (até 10^{-4}). Alíquotas destas diluições foram inoculadas em placas de meio YPDA, incubadas de seguida a 30 °C durante 48 h.

A citotoxicidade do própolis observa-se pela diferença de colónias formadas aquando da comparação dos tratamentos com o controlo (células incubadas com EtOH apenas, durante idêntico período de tempo). Como seria de esperar constata-se um aumento de citotoxicidade à medida que se aumenta a concentração de própolis e o tempo de incubação (Figura 3). As células de *S. cerevisiae* mostram uma elevada sensibilidade aos extratos dos anos 2010, 2011 e 2013 (Figura 3A, 3B e 3D). O P14.EE mostra alguma influência nas células de levedura provocando uma ligeira diminuição da viabilidade celular, como se observa na Figura 3E. Por outro lado, no extrato do ano 2012 esta atividade não se verifica: mesmo para a concentração mais elevada testada a viabilidade é comparável à do controlo, não havendo uma diferença significativa ao longo do tempo nem com o aumento da concentração (Figura 3C). Quando comparados os extratos obtidos com amostras proveniente de diferentes anos de colheita, observa-se uma nítida diferença na atividade citotóxica. Esta diferença pode estar associada a diferenças na flora local e no clima, que podem variar anualmente (Bankova *et al.*, 2014).

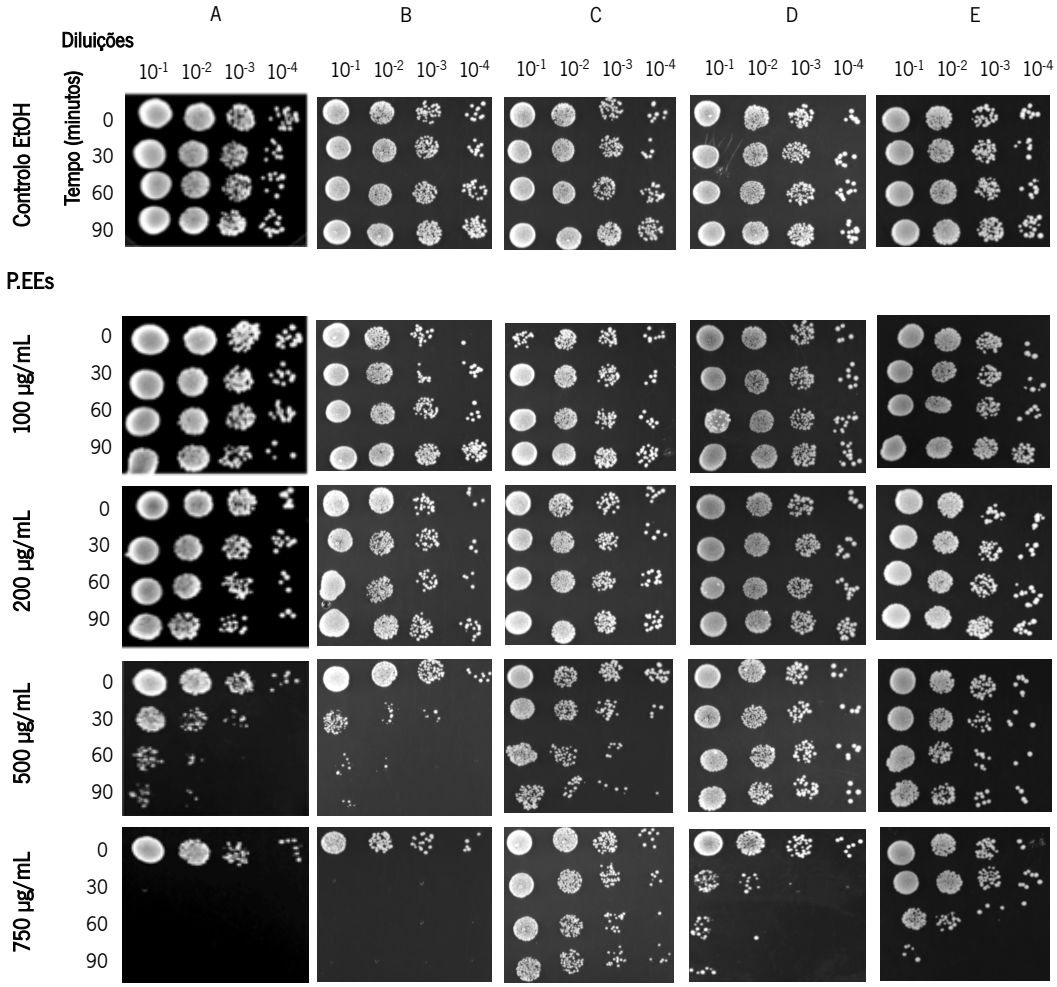


Figura 3. Extratos etanólicos de própolis de Pereiro afetam a viabilidade de células de *S. cerevisiae*. As células de levedura foram incubadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. Como controlo negativo, utilizou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato utilizado. As células foram incubadas na presença de P.EEs, ou de etanol, retirando-se alíquotas a intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 90 min) para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, das quais se retiraram alíquotas para inocular meio YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. A imagem ilustra resultados representativos de 3 réplicas independentes.

3.1.2 Efeito de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE ao longo do tempo em *S.cerevisiae* cultivada em YPEtOH

As culturas em diferentes fontes de carbono podem apresentar respostas diferentes aos compostos. O estudo do efeito do própolis foi também efetuado em células cultivadas em meio com etanol em vez de glucose como única fonte de carbono e energia. O meio YPEtOH é um meio onde as células de levedura respiram em vez de fermentarem (Glab *et al.*, 1990, 1993). Ao própolis são atribuídas diversas atividades biológicas (Fokt *et al.*, 2010; Silva Carvalho *et al.*, 2015) entre as quais propriedades antibacterianas (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996; Mirzoeva *et al.*, 1997; Bedendo e Bianchini, 1998), antifúngicas (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996; Bankova *et al.*, 2014; Campos *et*

al., 2015), antioxidantes (Marcucci, 1996; Mirzoeva *et al.*, 1997; Castro, 2001) e citotóxicas (Burdock, 1998). O própolis pode atuar de diferentes formas na célula, nomeadamente na cadeia transportadora de eletrões mitocondrial (Castro *et al.*, 2011). P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE foram adicionados nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1} a células de *S. cerevisiae* cultivadas em meio YPEtOH (Anexo I; Figura A1). As células de *S. cerevisiae* em meio com substrato respirável apresentam diferenças significativas na viabilidade em relação à viabilidade em meio com substrato fermentativo. Como se pode verificar na Figura 4, a viabilidade das células de levedura não foi afetada na presença de qualquer dos extratos etanólicos de própolis, mesmo nas concentrações mais elevadas e nos períodos de incubação mais prolongados. Este não seria o resultado esperado uma vez que o própolis pode exercer a sua função ao nível da mitocôndria e as células, ao utilizarem este organelo para respirar, estariam mais suscetíveis aos extratos (Castro *et al.*, 2011, 2012). No entanto, já está descrito que as células ao respirarem são mais resistentes a vários tipos de stresse, podendo deste modo ser mais resistentes ao stresse provocado pelo própolis (Maris *et al.*, 2001).

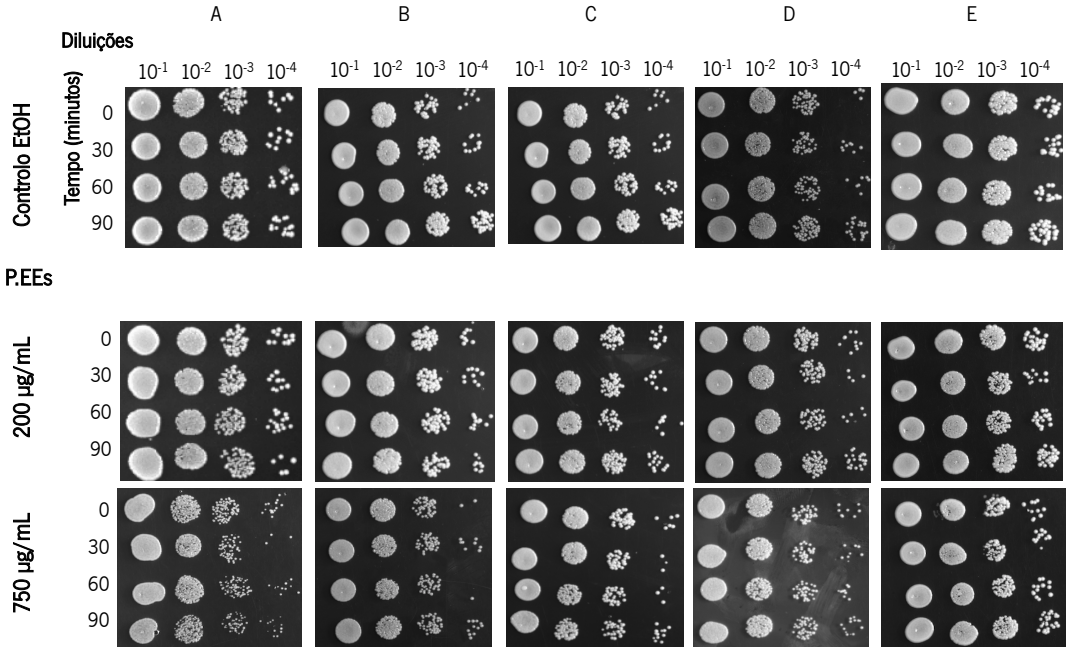


Figura 4. Células de *S. cerevisiae* em meio YPEtOH são mais resistentes a extratos etanólicos de própolis de Pereiro. As células foram tratadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 200 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1}. Como controlo negativo utilizou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato utilizado. As células foram incubadas retirando-se alíquotas em intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 90) para proceder às diluições 10^{-1} a 10^{-4}, usadas para inocular YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

3.1.3 Mutantes de *S. cerevisiae* BY4741 e W303 apresentam suscetibilidade diferente a P10.EE e P12.EE

Para investigar o modo do ação de própolis de Pereiro em células de *S. cerevisiae*, utilizaram-se dois dos extratos etanólicos que apresentaram resultados de citotoxicidade díspares (Figura 3). Seguindo o mesmo protocolo, utilizaram-se P10.EE e P12.EE nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1} (Anexo II; Figura A2 e A3). P10.EE e P12.EE representam o extrato mais forte (provoca uma diminuição significativa da viabilidade celular com o aumento da concentração) e o mais fraco em termos de citotoxicidade, respetivamente (Figuras 3A e 3C). A concentração de 500 μgmL^{-1} é a concentração mais baixa onde se observa uma diminuição acentuada da viabilidade na estirpe parental, tendo sido selecionada para estabelecer comparações. Com base no repositório da Euroscarf, selecionaram-se vários mutantes afetados em diversas vias, com o intuito de comparar a sua sensibilidade à ação tóxica do própolis com a respetiva estirpe parental. Como já foi referido anteriormente, é importante descobrir novos agentes antifúngicos e conhecer os seus alvos celulares. No entanto, os mecanismos de ação seguidos pelo própolis ainda não são claros, embora a sensibilidade aos extratos já tenha sido associada à função mitocondrial e à acidificação vacuolar e autofagia como meios essenciais para a morte celular causada por própolis (Castro *et al.*, 2011, 2012). Tendo em conta os estudos anteriores, selecionou-se uma gama de mutantes derivados da estirpe *S. cerevisiae* BY4741: *sod1*, *sod2*, *yap1*, *vph1*, *vps45*, *ndi1* e *atg1*; e um de *S. cerevisiae* W303: *yca1*.

S. cerevisiae possui respostas adaptativas diferentes a ROS que possibilitam a sobrevivência a diversos stresses ambientais. As superóxido dismutases (SODs), que catalisam a quebra do radical superóxido, O^{2-}, numa molécula de oxigénio (dioxigénio) e peróxido de hidrogénio, são essenciais na defesa contra o stresse oxidativo (Mcdonogh *et al.*, 1988). *SOD1* codifica a superóxido dismutase Cu-Zn, presente maioritariamente no citoplasma, mas também no espaço intermembranar mitocondrial, desempenhando um papel importante no tratamento dos radicais de oxigénio. Por outro lado, *SOD2* codifica a superóxido dismutase de manganês (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial e envolvida na desintoxicação dos radicais de oxigénio (Chang e Kosman, 1990; Reddi e Culotta, 2013; Ferreira *et al.*, 2014). Os mutantes *sod1* e *sod2* (com ausência destes genes) revelaram-se mais resistentes ao P10.EE que a estirpe parental, mesmo em concentrações tóxicas, podendo indicar que a ação tóxica do própolis pode não ser por via oxidativa, não atuando como agente oxidante (Figura 5A). Para o P12.EE as diferenças entre a estire parental e os mutantes não são significativas; como seria de esperar este extrato não é tóxico para nenhuma das estirpes (Figura 5B).

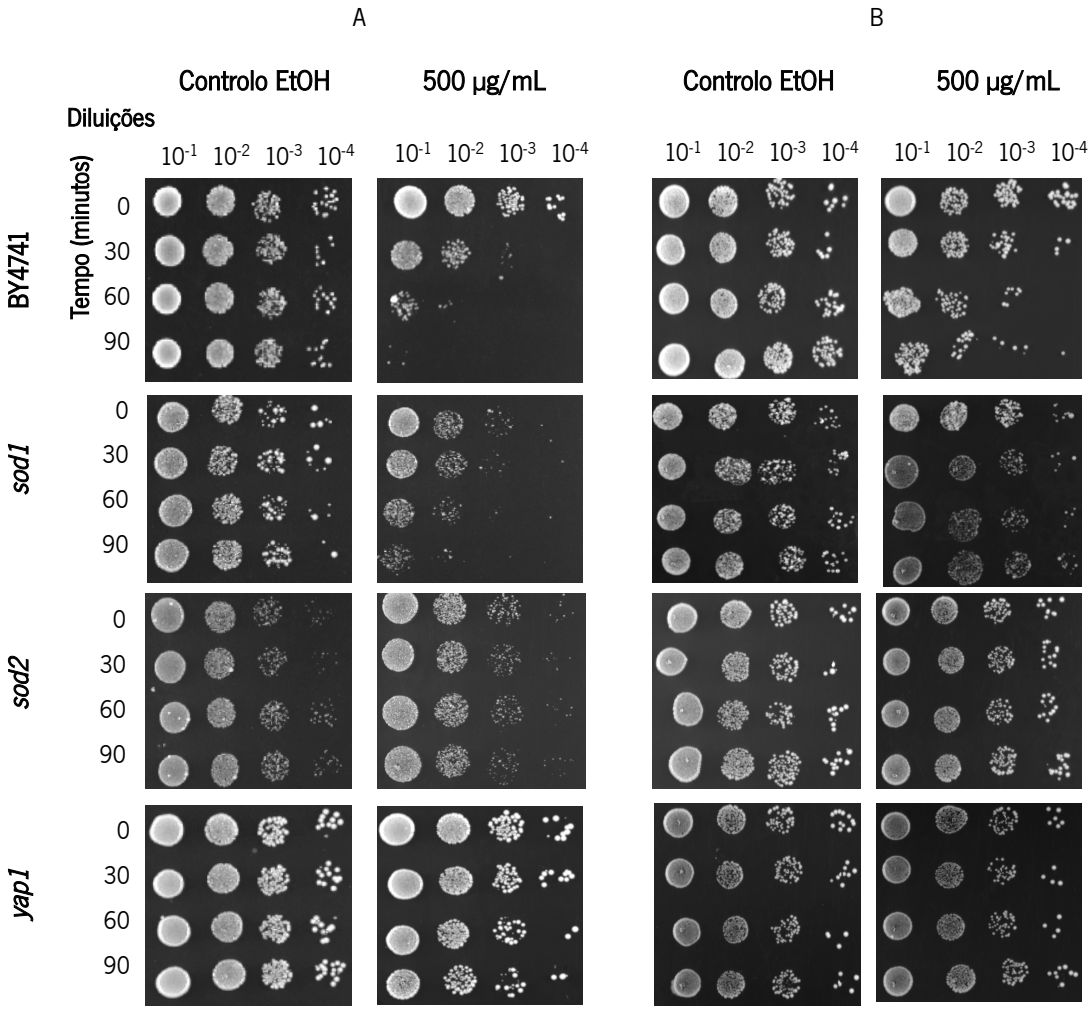


Figura 5. Os mutantes *sod1*, *sod2* e *yap1* apresentam sensibilidade diferente da estirpe parental (BY4741) a P10.EE e P12.EE. Culturas de BY4741, *sod1*, *sod2* e *yap1* foram tratadas durante 90 minutos com 500 µgmL^{-1} de P10.EE (A) ou P12.EE (B), ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

O gene *YAP1* é um factor de transcrição de levedura, essencial para a resposta celular ao stresse oxidativo (Temple *et al.*, 2005; Pimentel *et al.*, 2014). Este fator de transcrição ativa a transcrição de genes que codificam proteínas da resposta ao stresse oxidativo. A atividade transcricional da proteína Yap1 é regulada pela sua localização celular, movimentando-se do citoplasma para o núcleo onde se encontra ativa (Kuge *et al.*, 1997; Toone e Jones, 1999; Kim e Hahn, 2013). No caso do mutante *yap1* o resultado é semelhante ao obtido para os outros mutantes na linha da defesa oxidativa. O *yap1* não apresenta sensibilidade ao P10.EE mesmo na concentração de 500 µgmL^{-1} (Figura 5), e o mesmo se verifica para o P12.EE (Figura 5B).

Com o intuito de avaliar a possível influência do própolis no vacúolo de células selecionaram-se os mutantes *vph1* e *vps45* (com ausência dos respetivos genes). Em levedura, o vacúolo é fundamental para a manutenção da homeostasia celular com a regulação do pH intracelular e a

degradação de proteínas e organelos por autofagia (Castro *et al.*, 2011). O gene *VPH1* é responsável pela subunidade V0 da ATPase vacuolar. As ATPases vacuolares (V-ATPase) são bombas de protões dependentes de ATP e garantem a acidificação dos compartimentos vacuolares intracelulares. A acidificação vacuolar é fundamental para processos celulares como a endocitose e direcionamento de moléculas. A subunidade V0 das V-ATPases possui duas isoformas: a proteína Vph1, no vacúolo, e a proteína Stv1, no complexo de *Golgi* e endossomas (Graham e Stevens, 1999; Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001). Os mutantes *vph1* são viáveis mas a acidificação vacuolar é deficiente (Manolson *et al.*, 1992). No caso do mutante *vph1* não se observaram diferenças significativas na sua viabilidade quando na presença de 500 μgmL^{-1} de P10.EE, quando comparado com a estirpe parental, embora o mutante pareça ser um pouco mais resistente (Figura 6A). O extrato parece não atuar nesta via para afetar a viabilidade das células de levedura. Este facto pode também ser explicado pela existência da proteína Stv1 na célula que se pode deslocar para o vacúolo e compensar a ausência de acidificação vacuolar não provocando grandes alterações nas células (Manolson *et al.*, 1992).

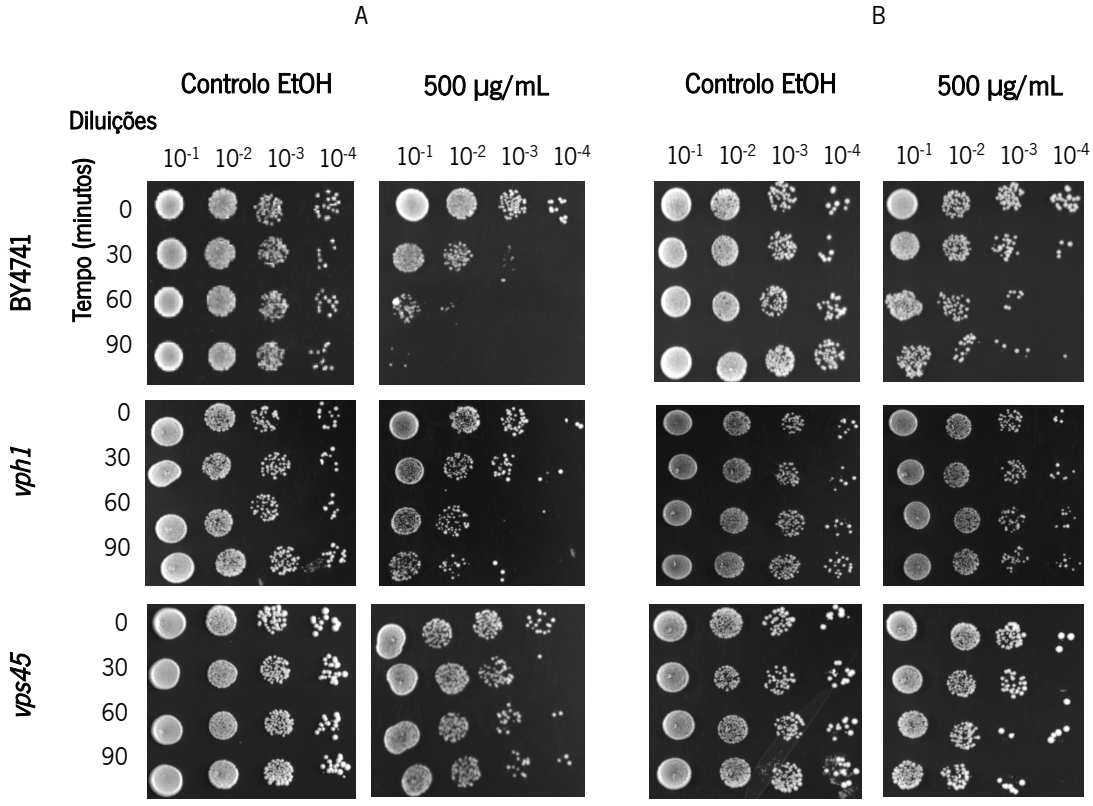


Figura 6. Os mutantes *vph1* e *vps45* apresentam sensibilidade diferente da estirpe parental (BY4741) a P10.EE e P12.EE. Culturas de BY4741, *vph1* e *vps45* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE (A) ou P12.EE (B) na concentração de 500 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

VPS45 codifica uma proteína da família SM (Sec1p/ Munc-18). Esta proteína é essencial para a

triagem de proteínas vacuolares, assim como para o funcionamento dos endossomas (Bryan *et al.*, 1998). É necessária para a fusão de vesículas de transporte com a membrana recetora apropriada, e de vesículas derivadas do complexo de Golgi com o compartimento pré vacuolar (Bryan *et al.*, 1998). A família de proteínas SM participa também ativamente na regulação de complexos SNARE (*soluble NSF attachment receptor*) em determinados passos de transporte, nomeadamente na fusão de membranas (Bryan *et al.*, 1998; Bryant e James, 2001). A perda de função nos genes VPS pode resultar numa deficiência na biogénese vacuolar assim como na sua acidificação, as vias de transporte para o vacúolo podem estar afetadas o que não significa diretamente uma perda de viabilidade (Raymond *et al.*, 1992; Bryan *et al.*, 1998). No caso do mutante *vps45*, a presença de P10.EE afeta a viabilidade celular positivamente: não há decréscimo da viabilidade celular, ao longo do tempo, por parte do mutante em comparação com a estirpe parental (Figura 6A). Este resultado pode indicar influência do própolis na via da biogénese e acidificação vacuolar assim como na formação dos endossomas para provocar citotoxicidade. Em ambos os mutantes, o resultado para o tratamento com P12.EE é semelhante observado na estirpe parental, não havendo influência na viabilidade por parte deste extrato (Figura 6B).

O gene *NDI1* corresponde a uma NADH: ubiquinona oxiredutase, que transfere eletrões do NADH para ubiquinona na cadeia transportadora de eletrões. Sob stresse apoptótico é ativada na mitocôndria e direcionada para o citoplasma induzindo apoptose (Park *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2012). Os ensaios de viabilidade para este mutante (onde o gene está ausente) mostraram uma ligeira diferença na concentração de 500 μgmL^{-1} de P10.EE, comparativamente à estirpe parental (Figura 7A). Este mutante não desencadeia apoptose por esta via, o que pode significar uma ausência de decréscimo da viabilidade celular mesmo na presença de própolis. Para o extrato P12.EE o resultado é semelhante à estirpe parental, não havendo influência na viabilidade por parte deste extrato uma vez que também não é citotóxico (Figura 7B).

A macroautofagia é a maior via de degradação que permite à célula responder a vários tipos de stresse ambiental, sendo fundamental para a sua sobrevivência (Cheong *et al.*, 2008). Em particular, a autofagia é a via de degradação responsável por libertar proteínas e outros constituintes do citoplasma para degradação no vacúolo. A autofagia inicia-se com encapsulamento do material citoplasmático através da formação de uma estrutura com dupla membrana, o autofagossoma (Budovskaya *et al.*, 2004; Suzuki e Ohsumi, 2007). As proteínas Atg, designadamente Atg1 (proteína citosólica serina/ tirosina cinase) é importante para a formação das vesículas autofágicas e para a via de direcionamento citoplasma-vacúolo (Cvt). O mutante *atg1* revelou-se mais resistente ao P10.EE, para a concentração

de 500 μgmL^{-1}, que a estirpe parental (Figura 7A). A proteína Atg1 parece ser importante, quando presente, para a ação tóxica do própolis, sugerindo que o extrato poderá estar a desencadear fenómenos autofágicos no interior das células. O P12.EE, parece novamente não influenciar estas estirpes mutantes, com viabilidade semelhante à da estirpe parental (Figura 7B).

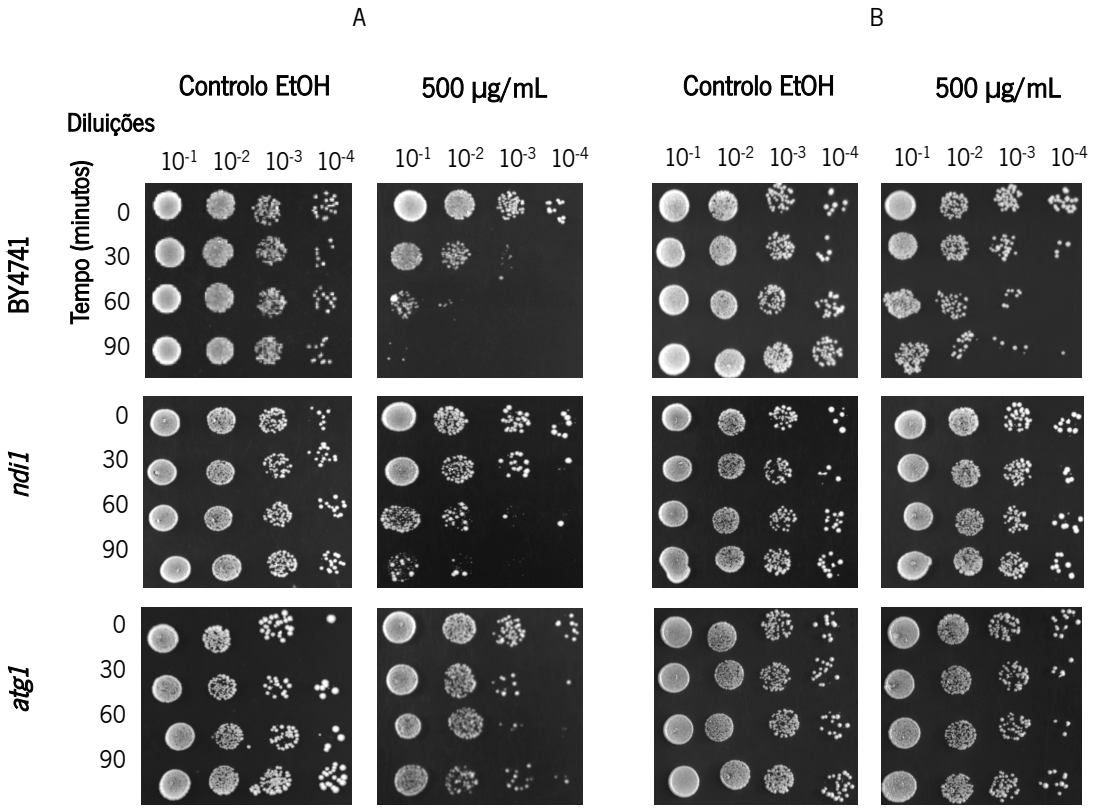


Figura 7. Os mutantes *ndi1* e *atg1* apresentam sensibilidade diferente da estirpe parental (BY4741) a P10.EE e P12.EE. Culturas de BY4741, *ndi1* e *atg1* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE (A) ou P12.EE (B) na concentração de 500 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1} a 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Outro dos genes envolvidos no desencadeamento da apoptose é o *YCA1*. A apoptose é regulada por diversas vias de sinalização conservadas que ativam caspases-proteases que conduzem à morte celular (Castro *et al.*, 2011). A única metacaspase identificada no genoma de *S. cerevisiae* é a Yca1, também conhecida como Mca1, mediando a apoptose em diversas situações apoptogénicas (Madeo *et al.*, 2002, 2004; Lee *et al.*, 2008). Para o mutante *yca1* observou-se um aumento da resistência quando tratado com 500 μgmL^{-1} de P10.EE, em comparação com a estirpe parental (Figura 8A). Este resultado sugere que o própolis pode induzir apoptose através da via das metacaspases e dessa forma desencadear toxicidade nas células de levedura (Castro *et al.*, 2011). O P12.EE, parece novamente não influenciar esta estirpe mutante, não afetando também a estirpe parental (Figura 8B).

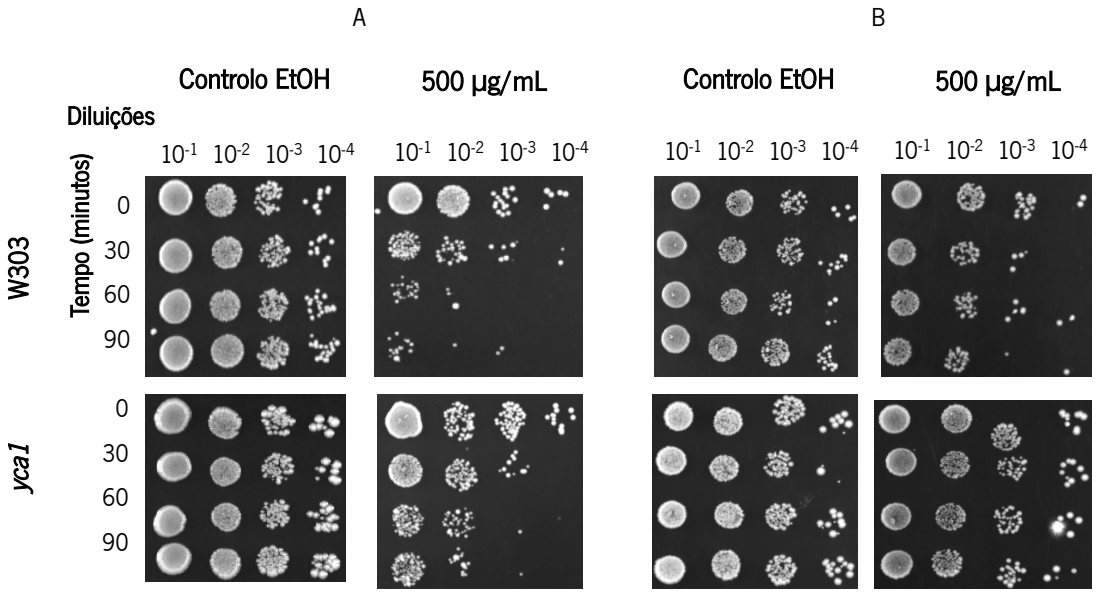


Figura 8. O mutante *yca1* apresenta sensibilidade diferente da estirpe parental (W303) a P10.EE e P12.EE. Culturas de W303 e *yca1* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE (A) ou P12.EE (B) na concentração de 500 μgmL^{-1}, ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

3.2 P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE protegem *S. cerevisiae* BY4741 sujeita a condições de stresse oxidativo com H_2O_2

Uma das propriedades atribuídas ao própolis prende-se com a atividade antioxidante, resultante da presença de antioxidantes naturais, como os ácidos fenólicos e os flavonóides, na sua composição (Fabris *et al.*, 2013; Kurek-Górecka *et al.*, 2014). A fim de verificar esta propriedade e comparar amostras de própolis recolhidas em diferentes anos, testaram-se todos os extratos: P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE, em ensaios de viabilidade na presença de H_2O_2. O peróxido de hidrogénio provoca stresse oxidativo nas células de levedura, por produção de ROS (Gardner *et al.*, 1997). Neste trabalho realizaram-se ensaios de co-incubação - onde o extrato contacta diretamente com o agente oxidante -, e ensaios de pré-incubação - onde o extrato e o agente oxidante não entram em contacto direto. Nos ensaios de co-incubação, os extratos foram adicionados - nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} ou 750μgmL^{-1} - em simultâneo com H_2O_2 a 5mM (o controlo positivo possui apenas H_2O_2 a 5mM) (Anexo III; Figura A4). Os resultados mostraram que os extratos de própolis de Pereiro possuem, em geral, atividade antioxidante (Figura 9).

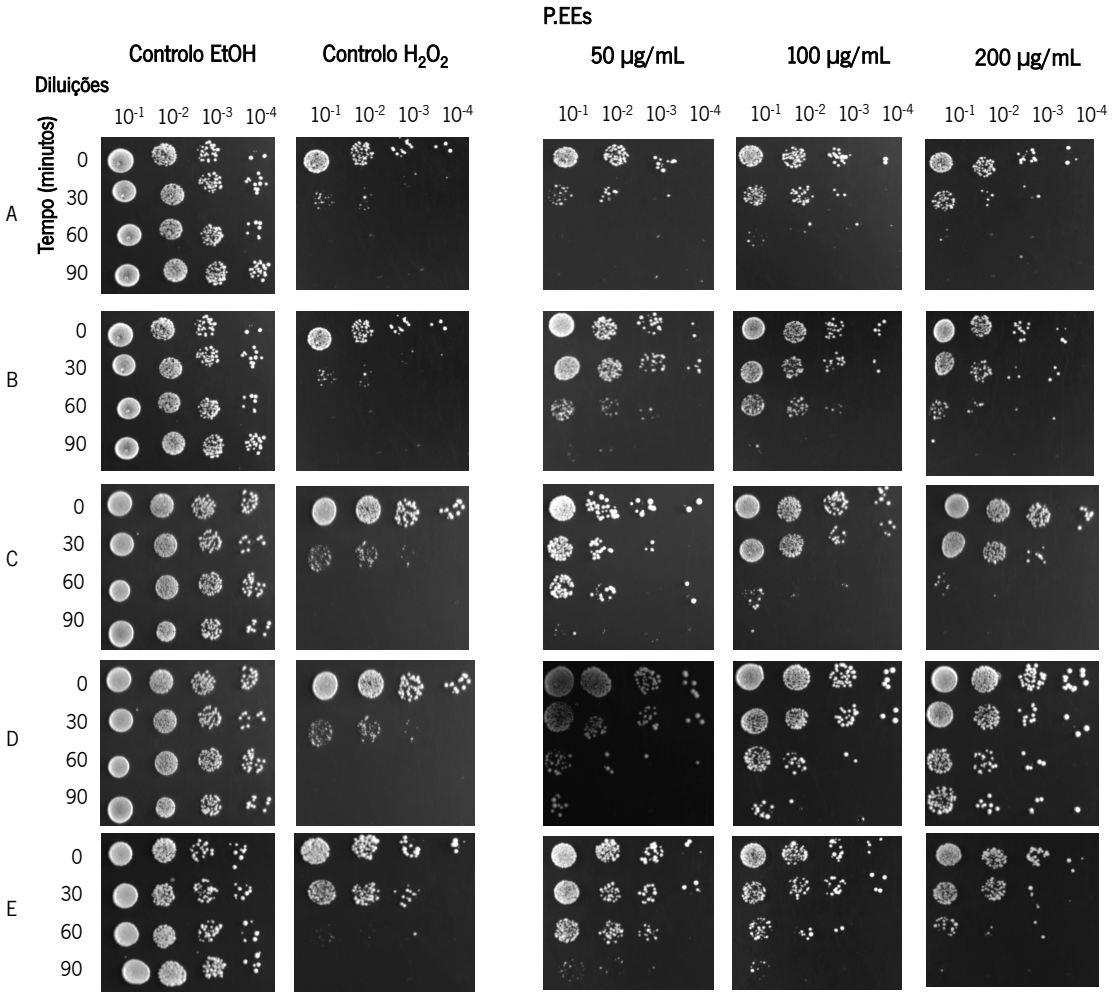


Figura 9. Co-incubação com extratos etanólicos de própolis Pereiro aumenta a viabilidade celular sob stresse oxidativo. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas com H_2O_2 a 5 mM em simultâneo com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E), nas concentrações de 50 µgmL^{-1}, 100 µgmL^{-1}, 200 µgmL^{-1}. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 a 5 mM e ao negativo etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Nas concentrações mais baixas de 100 e 200 µgmL^{-1} de P.EEs verifica-se uma diminuição da citotoxicidade provocada pelo H_2O_2. A concentrações superiores não se observa qualquer tipo de proteção. Quando se comparam os extratos dos diferentes anos, constata-se que os extratos mais antioxidantes são P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE (Figura 9B, 9C, 9D e 9E). Pelo contrário o P10.EE é menos ativo em comparação com os restantes, embora mantenha atividade antioxidante (Figura 9A).

Nos ensaios de pré-incubação os extratos foram adicionados previamente nas concentrações de 50 µgmL^{-1}, 100 µgmL^{-1}, 200 µgmL^{-1}, 500 µgmL^{-1} ou 750 µgmL^{-1}, seguindo-se uma incubação de 20 min. O meio foi renovado e adicionou-se então H_2O_2 a 5mM, com exceção do controlo negativo (Anexo III; Figura A5). Os extratos mostraram-se novamente antioxidantes (Figura 10). Como se pode observar, os extratos com maior capacidade de aumentar a resistência ao agente oxidante H_2O_2, foram

novamente P12.EE, P13.EE e P14.EE (Figura 10C, 10D e 10E). O P10.EE e P11.EE têm também um comportamento semelhante embora seja menos visível (Figura 10A e 10B).

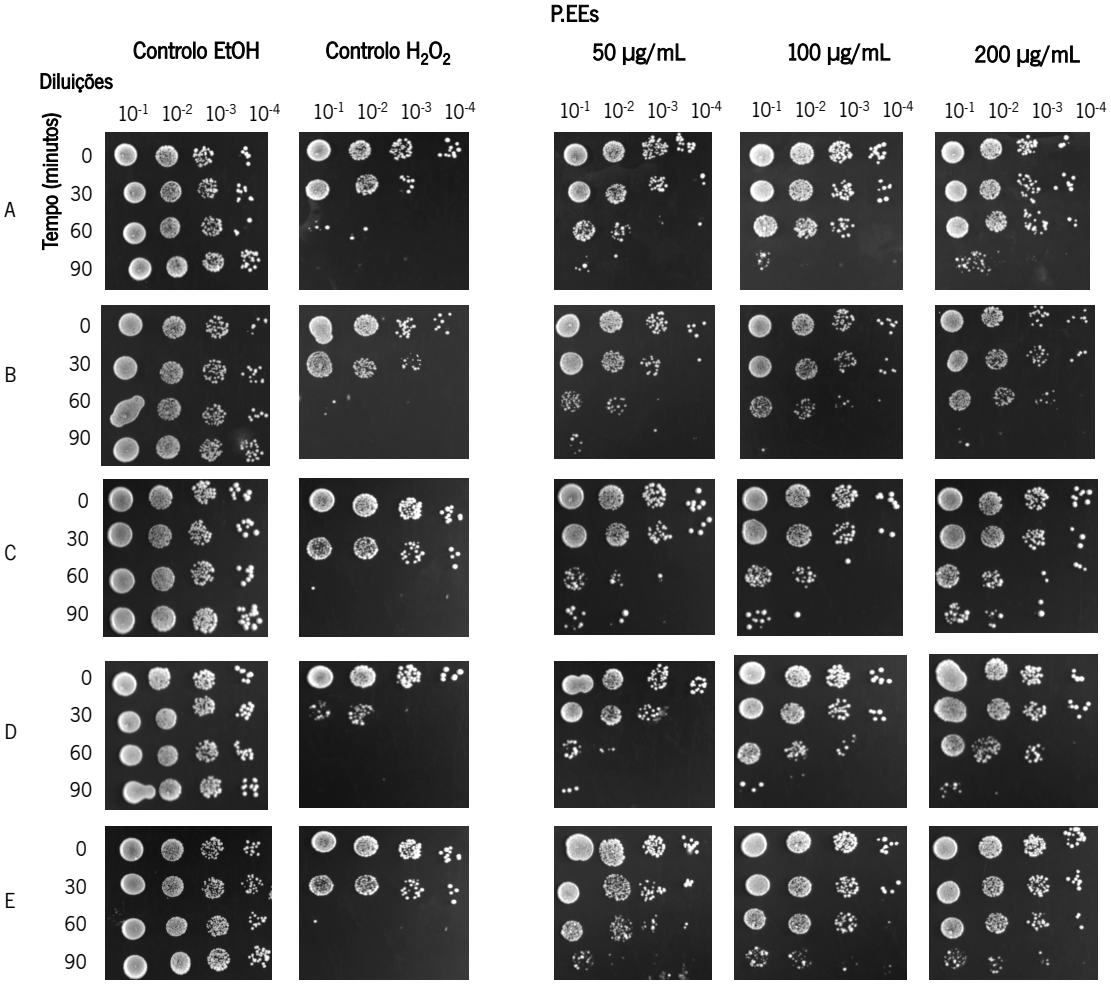


Figura 10. Pré-incubação com extratos etanólicos de própolis de Pereiro aumenta a viabilidade celular sob stresse oxidativo. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 50 µgmL^{-1}, 100 µgmL^{-1} e 200 µgmL^{-1}. Aos controlos positivo e negativo adicionou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. As células foram incubadas durante 20 minutos, lavadas em dH_2O e ressuspendidas em meio de cultura. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 5 mM assim como às amostras com extratos. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 de incubação retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Os resultados de co- e pré-incubação mostraram-se relativamente semelhantes sendo P13.EE e P14.EE os mais antioxidantes nas duas experiências para as concentrações testadas. Existem vários estudos que mostram um comportamento duplo por parte dos extratos de própolis, com uma atividade antioxidante e antimicrobiana ou citotóxica (Choi *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2015). Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro possuem este comportamento antagónico, em concentrações mais elevadas provocam citotoxicidade e em concentrações mais baixas podem proteger contra agentes oxidantes como o H_2O_2.

3.3 Todos os extratos etanólicos de própolis de Pereiro possuem atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de extratos de própolis tem sido amplamente estudada nos últimos anos, tanto em relação a fungos (Pfaller *et al.*, 1990; Marcucci, 1996; Wagh, 2013; Bankova *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015; Pippi *et al.*, 2015) como a bactérias (Scheller *et al.*, 1999; Mavri *et al.*, 2012; Bankova *et al.*, 2014; Kurek-Górecka *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015). No presente trabalho as atividades antifúngica e antibacteriana foram testadas recorrendo ao método de diluição do extrato em agar, de forma a determinar os valores de MIC. Ao meio de cultura sólido, LBA (Anexo IV; Figuras A6, A7 e A8) ou YPDA (Anexo V; Figuras A9, A10 e A11) consoante se testaram bactérias ou leveduras respetivamente, foi adicionado cada um dos extratos - P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE - nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. Após incubação nas condições apropriadas, as placas foram observadas para a presença/ ausência de crescimento e determinaram-se os valores de MIC.

3.3.1 Atividade antibacteriana de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE

Os resultados dos valores de MIC para todos os extratos, quando testados contra o painel de bactérias selecionado, no qual se encontram 8 bactérias Gram-positivas e 11 Gram-negativas, encontram-se na Tabela 2. Os extratos não mostraram qualquer atividade contra bactérias Gram-negativas na gama de concentrações estudadas. Estes resultados corroboram diversos estudos que reportam a baixa atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas (Berretta *et al.*, 2012; Mavri *et al.*, 2012; Dziedzic *et al.*, 2013; Wagh, 2013; Bankova *et al.*, 2014; Sinhorini *et al.*, 2014). Esta diferença de sensibilidade à ação do própolis pode ser explicada pelas diferenças estruturais na parede celular (Campos *et al.*, 2015). Em relação às bactérias Gram-positivas, os extratos mais eficazes são P12.EE, P13.EE e P14.EE para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*. As estirpes que se mostraram mais sensíveis foram *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* com um MIC de 100 μgmL^{-1} de P14.EE, mostrando-se assim o extrato com maior atividade antibacteriana. O MIC de 200 μgmL^{-1} obtido para P13.EE contra *Bacillus subtilis* também se revelou mais baixo em relação aos dos restantes extratos.

Tabela 2. Valores de MIC obtidos para os extratos etanólicos de própolis de Pereiro para o conjunto de bactérias selecionado. As estirpes foram inoculadas em meio LB suplementado com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE nas concentrações 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. O controlo negativo possui etanol absoluto incorporado no meio num volume igual ao máximo de extrato adicionado. "-"ausência de crescimento.

Microrganismos	MIC (µg/mL)				
	P10.EE	P11.EE	P12.EE	P13.EE	P14.EE
Gram-positivas					
Staphylococcus aureus	>750	>750	500	750	500
Staphylococcus epidermidis	500	>750	750	750	500
Bacillus subtilis	750	500	500	200	100
Bacillus cereus	750	500	500	500	100
Mycobacterium sp.	>750	-	-	-	-
Cellulomonas fimi	>750	>750	>750	>750	-
Streptomyces aurefaciens	>750	-	-	-	-
Micrococcus luteus	-	750	750	750	500
Gram-negativas					
Escherichia coli	>750	>750	>750	>750	>750
Proteus vulgaris	>750	>750	>750	>750	>750
Klebsiella pneumoniae	>750	>750	>750	>750	>750
Pseudomonas aeruginosa	>750	>750	>750	>750	>750
Salmonella typhimurium	>750	>750	>750	>750	>750
Pseudomonas putida	>750	>750	>750	>750	>750
Serratia	>750	>750	>750	>750	>750
Yersinia enterolitica	>750	>750	>750	>750	>750
Enterobacter cloacae	>750	>750	>750	>750	>750
Citrobacter freundii	>750	>750	>750	>750	>750
Salmonella choleraesuis	>750	>750	>750	>750	>750

Estes resultados podem ser importantes para futuras utilizações em tratamento de infeções causadas por estes microrganismos em humanos como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Kotiranta *et al.*, 2000; Chiller *et al.*, 2001). *Bacillus cereus* é responsável por infeções do trato gastrointestinal e intoxicações alimentares em humanos enquanto *Staphylococcus aureus* pode causar infeções cutâneas (Kotiranta *et al.*, 2000; Chiller *et al.*, 2001). Alguns dos resultados de MIC obtidos neste estudo permitem estabelecer algum padrão de semelhança com valores de MICs de outros trabalhos para estirpes do género *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* em que os valores variam entre 15 e 200 μgmL^{-1} (Aga *et al.*, 1994; Mavri *et al.*, 2012).

3.3.2 Atividade antifúngica de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE

A maioria dos extratos etanólicos de própolis de Pereiro demonstra atividade antifúngica nas concentrações testadas (Tabela 3). Apenas para P12.EE não foi possível determinar um valor de MIC para qualquer das estirpes, dentro da gama de concentrações testadas, não exibindo portanto este extrato atividade antifúngica. O extrato que se mostrou mais forte foi o P11.EE, para o qual se obteve um número de valores de MIC para um maior número de leveduras. O P11.EE demostrou atividade antifúngica contra uma série de leveduras patogénicas e/ ou oportunistas de humanos, nomeadamente *Candida krusei, Candida albicans, Candida glabrata, Candida dubliniensis* e *Candida lusitaniae* (MIC's de 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}). Os extratos dos anos 2010, 2013 e 2014 também mostraram atividade contra alguns destes fungos, como já tem sido descrito para outros extratos (Fernandes *et al.*, 1995; Júnior *et al.*, 2006; Koç *et al.*, 2011). Estes fungos patogénicos humanos são responsáveis por uma inúmera variedade de infeções da pele e tecidos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Castro *et al.*, 2013). *Rhodotorula* glutinis, para a qual P11.EE registou um MIC de 200 μgmL^{-1}, é a estirpe mais sensível ao extrato. Estirpes do género *Rhodotorula* são responsáveis por infeções sistémicas, infeções oportunistas em humanos, por infeções da pele e dos pulmões em animais e também por contaminações alimentares (Wirth e Goldani, 2012; Wagh, 2013). Outros microrganismos responsáveis por contaminação na indústria alimentar, resistentes aos tratamentos comuns (Thomas e Davenport, 1985), mostraram resultados interessantes: *Zygosaccharomyces bailii* que é sensível a P10.EE e P11.EE (MIC de 500 μgmL^{-1}) e a P14.EE (MIC = 200 μgmL^{-1}); *Zygosaccharomyces rouxii* foi inibida por P10.EE, P11.EE e P13.EE (MIC = 750 μgmL^{-1}). Microrganismos não patogénicos como *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 mostraram sensibilidade a P10.EE, P11.EE, P13.EE e P14.EE, todos exibindo valores de MIC

de 750 μgmL^{-1}. O microrganismo que se mostrou mais resistente foi *Candida parapsilosis* não tendo sido inibido por qualquer dos extratos.

Tabela 3. Valores de MIC obtidos para extratos etanólicos de própolis de Pereiro contra o leque de leveduras selecionado. As estirpes foram espalhadas em meio YPDA suplementado com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. O controlo negativo possui etanol absoluto incorporado no meio num volume igual ao máximo de extrato adicionado. "-"ausência de crescimento.

Microrganismos	MIC (μg/mL)				
	P10.EE	P11.EE	P12.EE	P13.EE	P14.EE
Candida krusei	>750	750	>750	>750	>750
Candida albicans	750	500	>750	750	>750
Candida albicans 53B	750	>750	>750	>750	750
Candida parapsilosis	>750	>750	>750	>750	>750
Candida glabrata	>750	750	>750	750	>750
Candida guillermondii	>750	>750	>750	750	>750
Candida tropicalis	>750	>750	>750	750	>750
Candida dubliniensis	750	500	>750	750	750
Candida lusitaniae	750	750	>750	>750	>750
Dekkera bruxellensis	>750	500	>750	>750	750
Pichia anomala	750	750	>750	750	>750
Zygosaccharomyces bailii	500	500	-	-	200
Debaryomyces hansenii	750	750	>750	750	>750
Pichia membranifaciens	>750	750	>750	750	>750
Rhodotorula glutinis	-	200	-	-	500
Zygosaccharomyces rouxii	750	750	>750	750	>750
Saccharomyces cerevisiae BY4741	750	750	>750	750	750
Saccharomyces cerevisiae BY4742	750	750	>750	750	750

Os resultados obtidos de MIC são em parte semelhantes aos descritos na literatura para algumas estirpes , no entanto as variações podem dever-se à diferença de métodos utilizados e à composição química dos extratos. No que respeita à levedura *S. cerevisiae* os MIC´s reportados podem variar entre 500 e 750 μgmL^{-1} (Aga *et al.*, 1994). Em relação a leveduras do género *Candida* os valores de MIC podem variar de 200 μgmL^{-1} a 1600 μgmL^{-1} sendo também semelhantes aos

resultados deste estudo (Fernandes *et al.*, 2007; Mavri *et al.*, 2012). É particularmente importante encontrar compostos antimicrobianos, como o própolis, que sejam eficazes de modo a evitar a resistência dos microrganismos às estratégias terapêuticas, atualmente um problema à escala mundial (Aliyazicioglu *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2015 e Pippi *et al.*, 2015).

3.4 Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro afetam o potencial da membrana mitocondrial de *S. cerevisiae* BY4741

Como já foi referido anteriormente, os extratos de própolis podem afetar a cadeia transportadora de eletrões mitocondrial (Castro *et al.*, 2011, 2012). Neste trabalho decidiu-se então estudar a influência do própolis na mitocôndria, especialmente na variação do potencial da membrana mitocondrial. Células de *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio YPEtOH de modo a assegurar um metabolismo respiratório e de seguida tratadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} e 200 μgmL^{-1} de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE. A análise do potencial da membrana mitocondrial foi realizada recorrendo à leitura da fluorescência por citometria de fluxo com o fluorocromo rodamina 123, em que a fluorescência de uma população de células é medida célula-a-célula (Houston *et al.*, 2010). Este fluorocromo acumula-se preferencialmente na matriz da mitocôndria, de acordo com o potencial elétrico da membrana interna mitocondrial, permitindo analisar a função mitocondrial (Breeuwer e Abee, 2000; Ludovico *et al.*, 2001). Os resultados de fluorescência para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE encontram-se representados na Figura 11.

Os valores mais elevados de potencial da membrana interna mitocondrial promovem maior acumulação de rodamina 123, traduzindo-se num aumento da fluorescência. Todos os extratos afetam a mitocôndria, verificando-se que com o aumento da concentração de própolis a fluorescência diminui em relação ao controlo. Os P10.EE, P11.EE e P13.EE mostram uma resposta concentração-efeito mais acentuada, afetando com mais intensidade o potencial mitocondrial (Figura 11A, 11B e 11E). O P12.EE é o extrato mais fraco não afetando de igual forma a mitocôndria, e em que a diferença de fluorescência entre as concentrações não é tão marcada (Figura 11C). Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro afetam a mitocôndria com intensidades diferentes, mas em nenhum suficientemente para afetar a viabilidade.

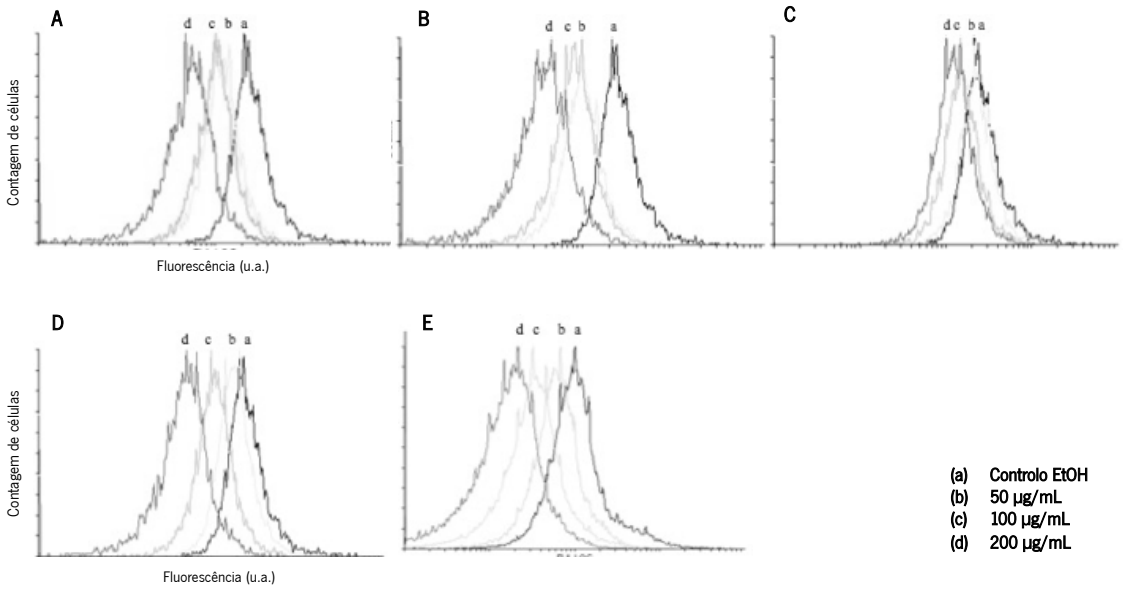


Figura 11. Os extratos etanólicos de própolis afetam o potencial elétrico da membrana interna mitocondrial. A fluorescência emitida pela sonda Rh-123 nas células de *S. cerevisiae*, cultivadas em meio YPEtOH e tratadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) e P14.EE (E) apresenta-se em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e correspondem a uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

As células tratadas com rodamina 123 foram observadas ao microscópio de fluorescência com o intuito de ver a marcação com o fluorocromo (Figura 12). Com o P10.EE a 200 μgmL^{-1} observa-se uma fluorescência menor e mais difusa em comparação com o controlo negativo, que exibe uma marcação mitocondrial intensa.

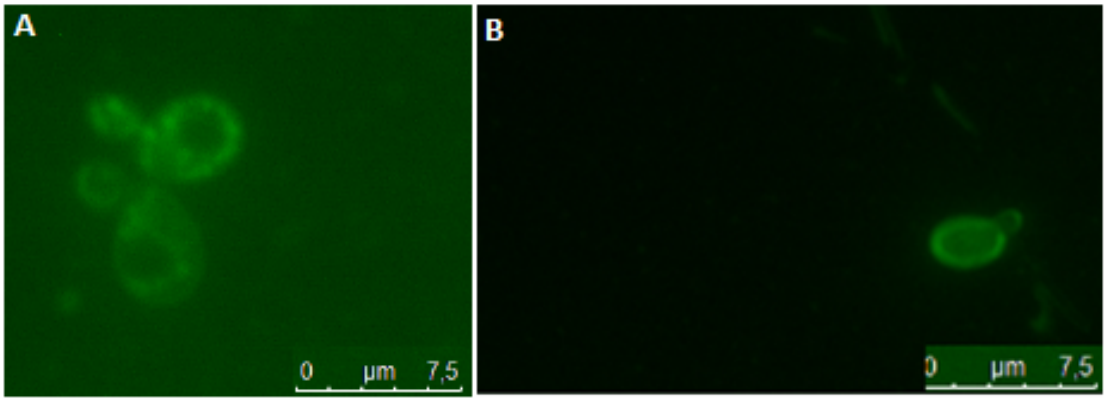


Figura 12. Células de *S. cerevisiae* marcadas com Rh-123 observadas ao microscópio de fluorescência. Células incubadas em meio YPEtOH com etanol absoluto no controlo negativo (A) e com 200 μgmL^{-1} de P10.EE (B) visualizadas ao microscópio de fluorescência com ampliação 100x.

3.5 Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro diminuem a oxidação celular interna de *S. cerevisiae* BY4741

Como já atrás referido, e em concordância com resultados anteriores obtidos nos ensaios de viabilidade de co- e pré-incubação com H_2O_2, os extratos de própolis do Pereiro mostram atividade antioxidante ao nível da viabilidade. Para tentar comprovar esta atividade submeteram-se células de *S. cerevisiae* tratadas com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE a ensaios com o fluorocromo diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA). A sonda H_2DCFDA difunde-se passivamente nas células e é retida ao nível intracelular depois de desacetiladas por esterases intracelulares. Após a oxidação por ROS, H_2DCFDA (não fluorescente) é convertida na forma altamente fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF). Esta sonda reage com diversos tipos de ROS, nomeadamente radicais hidroxil e peróxido de hidrogénio (Ameziane-El-Hassani e Dupuy, 2013). Em células tratadas somente com P.EEs nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1}, avaliaou-se a capacidade de os extratos reduzirem a oxidação intracelular em comparação com o controlo. Os resultados mostram, para todos os extratos, uma diminuição da oxidação celular com o aumento de concentração de própolis, visível na diminuição da fluorescência (Figura 13). Os P11.EE, P12.EE e P13.EE mostram uma diminuição mais acentuada da oxidação celular para a concentração de 100 μgmL^{-1}, em comparação com os restantes extratos (Figura 13B, 13C e 13D).

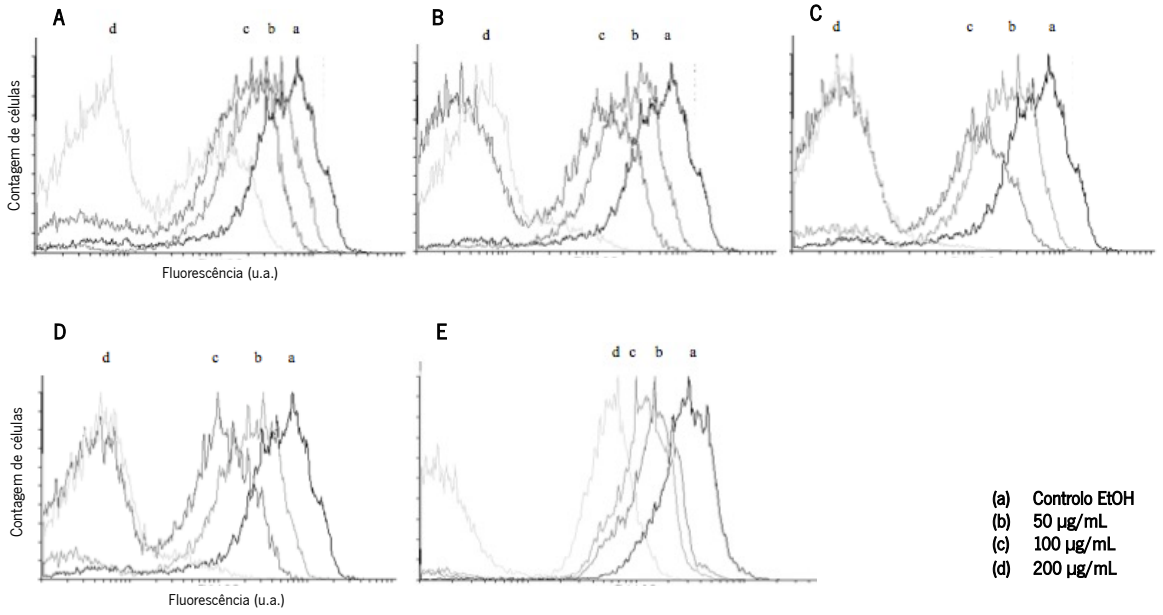


Figura 13. Os extratos etanólicos de própolis diminuem a oxidação celular interna. A fluorescência emitida pela sonda H_2DCFDA, nas células de *S. cerevisiae* tratadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E), está representada em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e são uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

Tendo em consideração os ensaios anteriores, realizaram-se os ensaios de co-incubação com H_2O_2 5mM. Os P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE, nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1}, foram adicionados simultaneamente com o agente oxidante H_2O_2. Observou-se uma nítida diminuição da oxidação celular provocada por peróxido de hidrogénio em todos os extratos etanólicos de própolis de Pereiro (Figura 14) num modo dependente da concentração. Na gama de concentrações testadas, a atividade antioxidante aumenta com o aumento da concentração para todos os extratos. No P10.EE esta atividade é mais suave, pelo que não se observa um espaçamento tão grande entre as diferentes concentrações (Figura 14A).

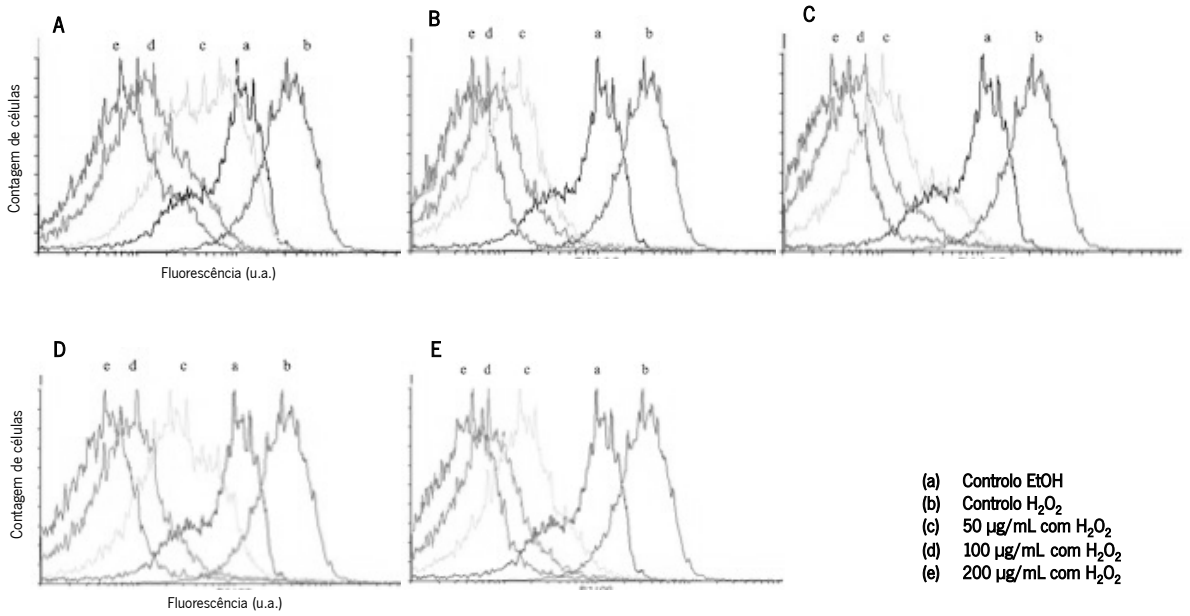


Figura 14. Co-incubação com extratos etanólicos de própolis diminui a oxidação celular interna provocada por H_2O_2. A fluorescência emitida pela sonda H_2DCFDA nas células de *S. cerevisiae* incubadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) e H_2O_2 a 5 mM está representada em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e são uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

No que respeita aos ensaios de pré-incubação com H_2O_2, as células tratadas previamente com P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} e 200 μgmL^{-1} são incubadas com o peróxido de hidrogénio a 5 mM. Os extratos e o H_2O_2 não entram em contacto direto no meio de cultura, ao contrário do que acontece nos ensaios de co-incubação. Os resultados obtidos para estes ensaios mostraram também atividade antioxidante (Figura 15), embora sejam ligeiramente diferentes dos resultados apresentados anteriormente. Nos ensaios de pré-incubação os extratos apresentam a mesma tendência na diminuição da oxidação celular em relação ao controlo com H_2O_2 (controlo positivo). Contudo, para as concentrações de 50 μgmL^{-1} e 100 μgmL^{-1}

de todos os extratos, a oxidação celular é ainda superior ao controlo negativo. Na concentração de 200 μgmL^{-1} observa-se uma discrepância em relação ao controlo negativo maior, sendo este efeito mais visível para o P12.EE onde a fluorescência é bastante reduzida (Figura 15C). O P10.EE é o extrato que exibe menor capacidade antioxidante (Figura 15A).

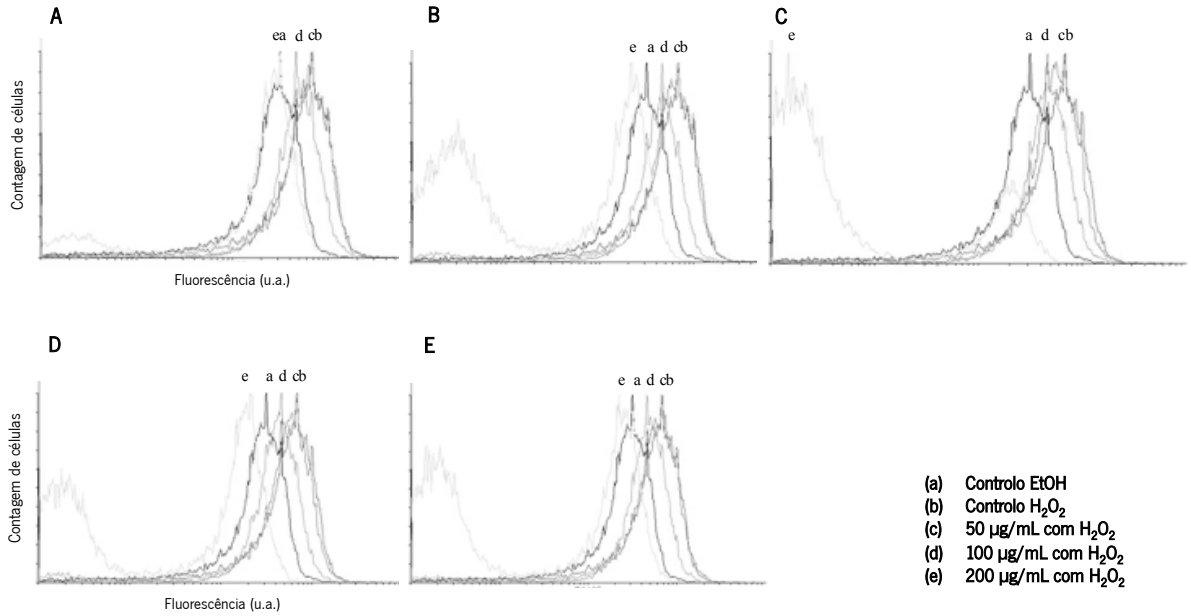


Figura 15. Pré incubação com extratos etanólicos de própolis diminui a oxidação celular interna provocada por H_2O_2. Células de *S. cerevisiae* pré-incubadas com 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) foram lavadas com dH_2O e ressuspendidas em meio de cultura ao qual se adicionou H_2O_2 a 5 mM. A fluorescência emitida pela sonda H_2DCFDA está representada em função do número de células. Os resultados foram tratados no programa *Flowing Software 2.5.1* e são uma experiência representativa de 3 réplicas independentes.

Estudos de Mavri et al. (2012) com extratos etanólicos de própolis esloveno mostraram uma diminuição da oxidação intracelular em células de *S. cerevisiae* dependente da concentração recorrendo à sonda H_2DCFDA. Provaram também um comportamento antimicrobiano e antioxidante por parte dos mesmos extratos. Ensaios em própolis português mostraram também atividade antioxidante por parte de extratos etanólicos recorrendo a ensaios de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiozolina-6-ácido-sulfónico)) (Cruz, 2011). Outro estudo com própolis português do Pereiro realizado por Sousa (2015) mostrou uma elevada capacidade antioxidante por parte de alguns dos extratos, avaliada quer por voltametria cíclica e diferencial quer por ensaios com o radical DPPH. Comparando deste modo extratos colhidos em anos diferentes mas com a mesma localização, verificou algumas diferenças nos seus comportamentos antioxidantes.

Em suma estes resultados mostram a capacidade antioxidante dos P.EEs, que se correlaciona com os ensaios de viabilidade. Embora existam diferenças entre os extratos etanólicos de própolis do

Pereiro e entre o método utilizado, a tendência é semelhante. Comprova-se deste modo que os mesmos extratos podem atuar como antioxidantes e citotóxicos dependendo da concentração.

3.6 Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro provocam danos no DNA de *S. cerevisiae* BY4741

Os danos no DNA podem ser consequência de diversos processos e agentes de origem endógena e exógena (Sirbu e Cortez, 2013). A extensão dos danos no DNA pode ser avaliada por eletroforese individual, célula-a-célula, ou ensaio cometa, onde a distância de migração do DNA cromossómico está diretamente relacionada com a extensão dos danos. A rutura do DNA em cadeia simples introduz um relaxamento no DNA cromossómico super-enrolado resultando num DNA mais móvel, permitindo a migração. O DNA é marcado com um fluorocromo e as células são observadas por microscopia de fluorescência (Olive e Banáth, 2006; Azevedo *et al.*, 2011). Este método foi descrito pela primeira vez em 1984 por Ostling e Johanson, é uma técnica rápida e barata, permitindo medir os efeitos genotóxicos ou de proteção de determinados produtos, avaliar a reparação de danos no DNA e medir os danos oxidativos (Oliveira e Johansson, 2012). Alguns estudos já demostraram que o própolis pode ser genotóxico a concentrações mais elevadas para as células de animais (Ozkul *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2006).

Para avaliar esta atividade no própolis de Pereiro efetuou-se a técnica do ensaio cometa em células de *S. cerevisiae*, com as concentrações de 10 μgmL^{-1}, 25 μgmL^{-1}, 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE ou P14.EE. Na Figura 16 observam-se, a título de exemplo, os resultados recolhidos por microscopia de fluorescência para um controlo negativo (A), controlo positivo (B) e para 200 μgmL^{-1} de P13.EE (C).

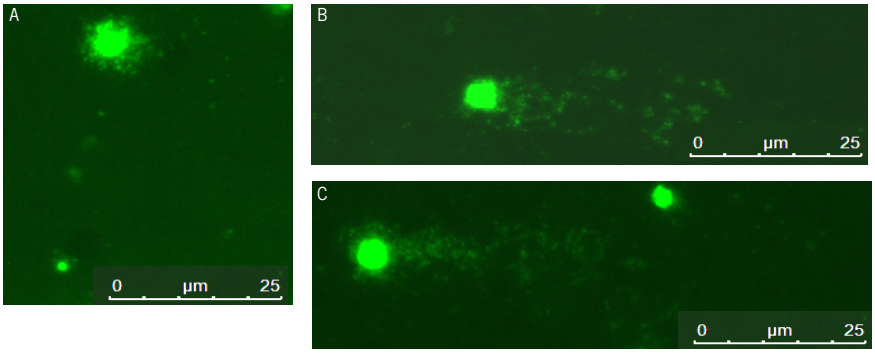


Figura 16. Fotomicrografias de cometas de *S. cerevisiae* depois da marcação do DNA com *GelRed*, ampliadas 400x. A: corresponde um controlo negativo, com EtOH 5%; B: controlo positivo com H_2O_2 10 mM; C: tratamento com 200 μgmL^{-1} de P13.EE.

Neste exemplo pode observar-se a ausência de danos no DNA em A, e o aumento dos danos com o aumento da cauda de B para C. Os resultados obtidos para os extratos de Pereiro são diferentes dependendo do ano de colheita (Figura 17).

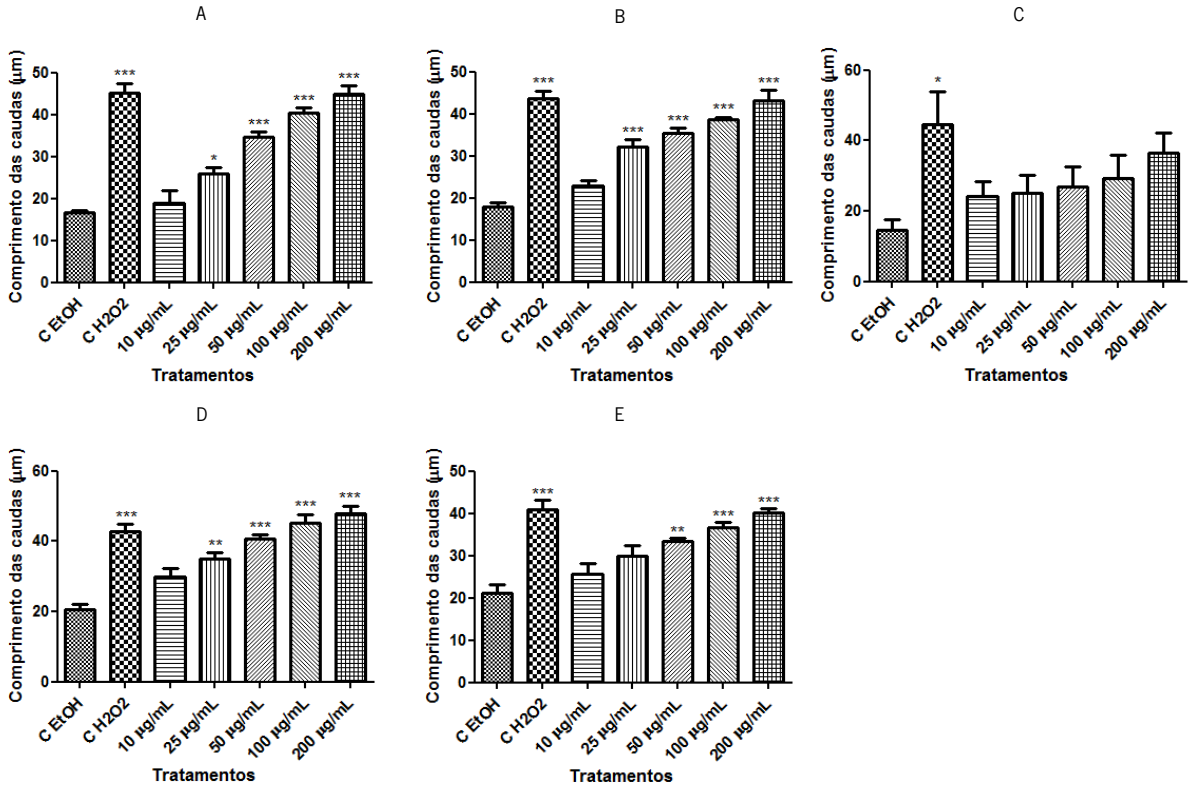


Figura 17. Os extratos etanólicos de própolis de Pereiro provocam, em geral, danos no DNA. Células de *S. cerevisiae* foram tratadas com 10 μgmL^{-1}, 25 μgmL^{-1}, 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E). Os controlos foram tratados com EtOH absoluto, no caso do negativo e com H_2O_2 5 mM, para o positivo. As imagens foram visualizadas ao microscópio de fluorescência. Os valores de média ± SD são resultado de três experiências independentes (* significa $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e *** $p < 0.001$).

Os P10.EE, P11.EE, P13.EE e P14.EE revelam atividade genotóxica em células de *S. cerevisiae* marcadamente acima dos 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} e 200 μgmL^{-1}. Esta atividade é também notoriamente significativa em relação ao controlo negativo para P11.EE e P13.EE na concentração de 25 μgmL^{-1} O comprimento das caudas, ou seja, o aumento de danos no DNA aumenta com o incremento da concentração de própolis. Em oposição aos restantes P.EEs, P12.EE não provoca danos significativos no DNA para qualquer das concentrações estudadas. No geral podemos afirmar existir uma atividade genotóxica dos extratos de própolis do Pereiro. A toxicidade observada destes extratos pode estar diretamente ligada às quebras/ danos no DNA. Extratos mais genotóxicos são também mais citotóxicos para as células de *S. cerevisiae*.

3.6.1 Mutante *yca1* é menos suscetível a danos no DNA provocados por P10.EE

A apoptose é caracterizada por condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina do lado exterior da membrana, quebras no DNA em pequenos fragmentos e formação de corpos apoptóticos (Madeo *et al.*, 2002). Como já foi referido anteriormente, o gene *YCA1* codifica uma metacaspase envolvida na indução da apoptose. Dado que o mutante *yca1* mostrou maior resistência ao P10.EE nos ensaios de viabilidade, analisou-se a influência do extrato ao nível do DNA. Os resultados mostram que o P10.EE não afeta significativamente o DNA do mutante *yca1*, mesmo nas concentrações mais elevadas (Figura 18). A indução da apoptose pode culminar em danos no DNA que a célula não é capaz de reparar. O mecanismo de indução da apoptose via metacaspases está silenciado nesta estirpe mutante, o própolis não é capaz de iniciar a apoptose não havendo por isso danos no DNA visíveis.

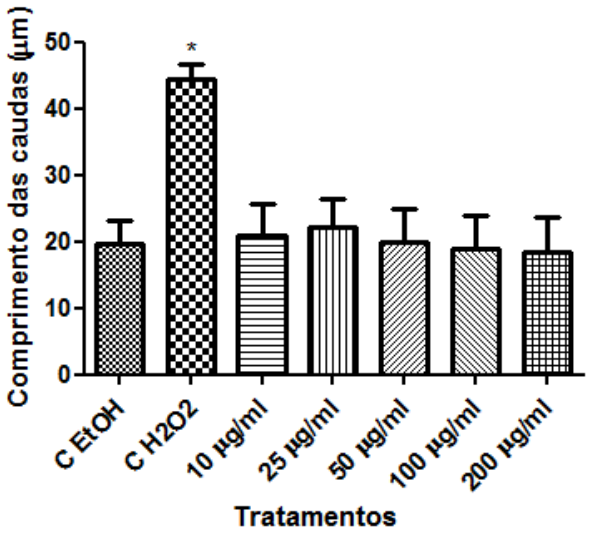


Figura 18. O mutante *yca1* não apresenta suscetibilidade a danos do DNA provocados pelo extrato etanólico de Pereiro. Células de *yca1* foram tratadas com 10 μgmL^{-1}, 25 μgmL^{-1}, 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1} ou 200 μgmL^{-1} de P10.EE. Os controlos foram tratados com EtOH 5%, no caso do negativo, e com H_2O_2 5 mM, para o positivo. As imagens foram visualizadas ao microscópio de fluorescência. Os resultados são expressos em termos dos valores de média do comprimento das caudas ± SD relativos a três experiências independentes (* significa $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, e *** $p < 0.001$).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de própolis do Pereiro demostraram possuir de forma global várias bioatividades, nomeadamente as avaliadas no presente trabalho: propriedades citotóxicas, genotóxicas, atividade antibacteriana e antifúngica e a atividade antioxidante.

O interesse crescente na pesquisa de própolis é importante para o desenvolvimento de novos produtos, em particular de novos agentes antibacterianos e antifúngicos. As leveduras do género *Candida*, em particular, têm mostrado ser sensíveis aos extratos de própolis, o que os torna interessantes para o desenvolvimento de novos produtos nomeadamente antifúngicos. A atividade antibacteriana também tem sido associada a estes extratos especialmente contra bactérias Gram-positivas. A conjugação de própolis com antibióticos pode permitir a redução da dose de agentes antimicrobianos, e melhorar a terapia antimicrobiana. Isto é especialmente importante devido ao número elevado de estirpes resistentes a antibióticos que tem vindo a surgir e agentes patogénicos oportunistas, que exigem novas estratégias e novos agentes terapêuticos. Têm sido amplamente estudados sinergismos entre extratos de própolis e alguns antibióticos de forma a aumentar a eficiência dos tratamentos. Estudos por exemplo com *Staphylococcus aureus* mostraram efeito antimicrobiano cumulativo entre extrato etanólico de própolis e cefoxitina, clindamicina, tetraciclina, tobramicina, linezolida, penicilina e eritromicina (Wojtyczka *et al.*, 2013). A gentamicina e amoxicilina também mostraram um efeito sinérgico com própolis em estirpes de *Staphylococcus spp.* (Silva *et al.*, 2015). O potencial antimicrobiano do própolis combinado com antibióticos ou antifúngicos pode ser clinicamente interessante (Stepanović *et al.*, 2003).

Os extratos de própolis do Pereiro mostraram ação antimicrobiana distinta entre os diferentes anos de colheita. Enquanto P10.EE e P11.EE apresentam uma elevada atividade antifúngica, nomeadamente contra leveduras do género *Candida*, nas amostras de P12.EE e P14.EE a atividade antifúngica é insignificante nas concentrações testadas. No P13.EE a atividade é intermédia, verificando-se alguma atividade antifúngica. Em relação à atividade antibacteriana os extratos que se revelaram mais fortes foram P12.EE, P13.EE e P14.EE, com resultados interessantes contra bactérias Gram-positivas. Os resultados com P14.EE contra *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* destacaram-se pela obtenção de um MIC relativamente baixo em relação aos restantes extratos.

Em ensaios de viabilidade com *S. cerevisiae* verificou-se uma citotoxicidade geral provocada pelos P10.EE, P11.EE, P13.EE e P14.EE. No entanto P10.EE e P11.EE são mais tóxicos verificando-se uma diminuição mais abrupta da viabilidade para as concentrações de 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. Pelo

contrário, para o P12.EE a citotoxicidade nas células de levedura é praticamente nula em concentrações até 750 μgmL^{-1}. A mesma tendência se verifica ao nível do DNA, sendo que os extratos mais genotóxicos para *S. cerevisiae* são P10.EE e P11.EE, que para concentrações mais baixas conduzem a danos significativos no DNA. O P12.EE, ao contrário de todos os outros extratos, não provoca danos significativos no DNA de levedura, mesmo nas concentrações mais elevadas testadas. A toxicidade observada por parte destes extratos pode estar em parte ligada às quebras/ danos no DNA e as células, não os conseguindo reparar, perdem viabilidade. No que respeita aos ensaios em meio respirável as células são mais resistentes a vários tipos de stresse, e o própolis não provocou toxicidade nestas células nas concentrações testadas.

Para o desenvolvimento de novos produtos é fundamental descobrir o(s) alvo(s) celular(es) do extrato e compreender se estão envolvidos nos mecanismos de interação sinérgica com outros medicamentos. Com o aumento da concentração, os extratos de Pereiro afetam o potencial da membrana mitocondrial em células de *S. cerevisiae*. Pela análise das diferenças de viabilidade nos mutantes observou-se que a citotoxicidade dos extratos de própolis pode estar envolvida na biogénese e acidificação vacuolar, no desencadeamento de fenómenos autofágicos no interior das células e na indução da apoptose via metascapases. Pode-se concluir também que a ação tóxica do própolis não parece estar ligada à via oxidativa, não atuando como agente oxidante. Pelo contrário, e em geral, todos os extratos de própolis possuem atividade antioxidante, verificada quer em ensaios de viabilidade como através de citometria de fluxo com H_2O_2. Pelos ensaios de viabilidade os antioxidantes mais fortes são P11.EE, P12.EE e P13.EE. Por citometria de fluxo verificou-se a mesma tendência sendo os extratos mais fracos, de forma geral, P10.EE e P14.EE. Outro estudo de Sousa (2015) com extratos de própolis de Pereiro verificou também uma elevada capacidade antioxidante por parte de alguns dos extratos, avaliada quer por voltametria cíclica e diferencial quer por ensaios com o radical DPPH. Embora os métodos utilizados sejam distintos e haja uma pequena diferença nos resultados, estes estudos mostraram uma correlação bastante evidente entre os diferentes métodos e posicionam também P11.EE, P12.EE e P13.EE como os extratos mais antioxidantes e P14.EE como o extrato menos antioxidante.

Uma análise química preliminar por HPLC-DAD-ESI-MS (cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de varrimento de díodos acoplada à espectrometria de massa) dos extratos de própolis do Pereiro recolhidos nos diferentes anos mostra uma semelhança na composição em relação aos compostos fenólicos, embora possam estar em concentrações bastante diferentes, dependendo do ano de colheita. Os P10.EE e P11.EE são mais semelhantes entre si assim como o P12.EE e P13.EE, pelo

contrário o P14.EE parece ser o extrato relativamente menos rico em relação à composição. Estas associações nas composições químicas podem ser a causa das diferenças nas atividades biológicas e na semelhança de atividade entre alguns extratos. Alguns dos compostos identificados nos extratos de Pereiro possuem atividades biológicas já reconhecidas. O ácido cafeico e derivados com atividades antibacterianas, antioxidantes e antifúngicas (Bedendo e Bianchini, 1998; Oliveira *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Cigut *et al.*, 2011; Junior *et al.*, 2012; Mavri *et al.*, 2012; Fabris *et al.*, 2013); o CAPE associado à atividade citotóxica (Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012), a quercetina com atividade antioxidante ou pro-oxidante (Kessler *et al.*, 2003) bem como o ácido ferrúlico e ácido cumárico e derivados também com atividade antioxidante (Chao e Lin, 2011).

É necessário estabelecer padrões de composição entre os variados tipos de própolis e entre amostras recolhidas em diferentes anos do mesmo local. No entanto, ainda continuam por identificar totalmente muitos compostos bioativos, o que se afigura indispensável para isolar e identificar o composto ativo principal subjacente às atividades biológicas, de modo a iniciar a investigação em novos medicamentos. Futuramente é importante confirmar a ação do própolis de Pereiro ao nível da indução da apoptose e clarificar melhor os seus modos de ação. Uma análise mais aprofundada da composição química a par da determinação do conteúdo total de fenóis dos extratos dos diferentes anos serão também importantes para caracterizar melhor os vários P.EEs e tentar correlacionar os perfis de bioatividades e as suas especificidades com compostos específicos.

BIBLIOGRAFIA

Adelmann, J. (2005). Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., e Nakajima, S. (1994). Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 58: 945-946.

Aliyazicioglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. e Kolayli, S. (2013). Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*. 16: 277-287.

Alizadeh, A. M., Afrouzan, H., Dinparast-Djadid, N., Sawaya, A. C. H. F., Hemmati, H. R., Mohagheghi, M. A. e Erfani, S. (2015). Chemoprotection of MNNG-initiated Gastric Cancer in Rats Using Iranian Propolis. *Archives of Iranian Medicine*. 18: 18-23.

Artika , I., Susilo, H., Setyo, A.V.D. e Zainal, A.E. (2011). Antibacterial activity of propolis supplemented-chewing candy against *Streptococcus mutans*. *Microbiology Indonesia.* 5: 99-102.

Azevedo, F., Marques, F., Fokt, H., Oliveira, R. e Johansson, B. (2011). Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. *Yeast*. 28: 55-61.

Bankova, V., Popova, M. e Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*. 8(1): 28.

Banskota, A. H., Tezuka, Y. e Kadota, S. (2001). Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. *Phytotherapy Research*. 15: 561-571.

Bermingham-McDonogh, O., Gralla, E. B. e Valentine, J. S. (1988). The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning, sequencing, and biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 85: 4789-4793.

Berretta, A.A., Nascimento, A.P., Bueno, P.C.P., Vaz, M.M.O.L.L. e Marchetti, J.M. (2012). Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. *International Journal of Biological Sciences.* 8: 512-521.

Bianchini, L. e Bedendo, I.P. (1998). Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola.* 55: 149-152.

Boisard, S., Ray, A. M. L., Landreau, A., Kempf, M., Cassisa, V., Flurin, C. e Richomme, P. (2015). Antifungal and Antibacterial Metabolites from a French Poplar Type Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.

Boiteux, S. e Guillet, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*. 3: 1–12.

Botstein, D., Chervitz, S. A. e Cherry, J. M. (1997). Yeast as a Model Organism. *Science*. 277: 1259–1260.

Breeuwer, P. e Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 193-200.

Bryant, N. J. e James, D. E. (2001). Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation. *The EMBO Journal*. 20: 3380-3388.

Bryant, N. J., Piper, R. C., Gerrard, S. R. e Stevens, T. H. (1998). Traffic into the prevacuolar/endosomal compartment of *Saccharomyces cerevisiae:* A VPS45-dependent intracellular route and a VPS45-independent, endocytic route. *European Journal of Cell Biology*. 76: 43-52.

Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J. e Herman, P. K. (2004). The Ras/cAMP-dependent Protein Kinase Signaling Pathway Regulates an Early Step of the Autophagy Process in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 20663-20671.

Bulman, Z., Le, P., Hudson, A.O., Savka, M.A. (2011). A novel property of propolis (bee glue): Anti-pathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. *Journal of Ethnopharmacology.* 138: 788-797.

Burdock, G.A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of BeeP (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363.

Cabiscol, E., Piulats, E., Echaves, P., Herrero, E. e Ros, J. (2000). Oxidative Stress Promotes Specific Protein Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 27393-27398.

Cadelha, R. C., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., Vilas-Boas, M. e Ferreira, I. C. F. R. (2014). Cytotoxicity of Portuguese Propolis: The Proximity of the In Vitro Doses for Tumor and Normal Cell Lines. *BioMed Research International*. 2014.

Campos, J. F., Santos, U. P., Rocha, P. S., Damião, M. J., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., Estevinho, L. M., Souza, K. P. e Santos, E. L. (2015). Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.

Carocho, M. e Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 15-25.

Castaldo, S., e Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73: 1-6.

Castro, P. A., Bom, V. L. P., Brown, N. A., Almeida, R. S. C., Ramalho, L. N. Z., Savoldi, M., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A. e Goldman, G. H. (2013). Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 60: 74-86.

Castro, P. A., Savoldi, M., Bonatto, D., Barros, M. H., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A. e Goldman, G. H. (2011). Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae. American Society for Microbiology*. 10: 398-411.

Castro, P. A., Savoldi, M., Bonatto, D., Malavazi, I., Goldman, M. H. S., Berretta, A. A. e Goldman, G.H. (2012). Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(1): 194.

Castro, S. L. (2001). Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review Biomedical Sciences*. 3: 49-83.

Chang, E. C. e Kosman, D. J. (1990). O_2-Dependent Methionine Auxotrophy in Cu, Zn Superoxide Dismutase-Deficient Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 172: 1840-1845.

Chao, W. W. e Lin, B. F. (2011).Bioactivities of major constituents isolated from Angelica sinensis (Danggui). *Chinese Medicine*. 6(1): 29.

Chen, M. J., Shih, S. C., Wang, H. Y., Lin, C. C., Liu, C. Y., Wang, T., Chu, C. H. e Chen, Y. J. (2013). Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Pancreatic Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

Cheong, H., Nair, U., Geng, J., e Klionsky, D. J. (2008). The Atg1 Kinase Complex Is Involved in the Regulation of Protein Recruitment to Initiate Sequestering Vesicle Formation for Nonspecific Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 19: 668-681.

Chiller, K., Selkin, B. A. e Murakawa, G. J. (2001). Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *The Society for Investigative Dermatology*. 6: 170-174.

Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M. e Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*. 39: 756-761.

Chopra, S., Pillai K. K., Husain S. Z. e Giri D. K. (1995). Propolis protects against doxorubicin-induced myocardiopathy in rats. *Experimental and Molecular Pathology*. 62: 190-198.

Choudhari, M. K., Haghniaz, R., Rajwade, J. M. e Paknikar, K. M. (2013). Anticancer Activity of Indian Stingless Bee Propolis: An In Vitro Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

Christen, S., e Sauer, U. (2011). Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by ^{13}C fux analysis and metabolomics. *FEMS Yeast Research.* 11: 263–272.

Cigut, T., Polak, T., Gasperlin, L., Raspor, P. e Jamnik, P. (2011). Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 11449-11455.

Cruz, M. A. O. (2011). Evaluation and characterization of antioxidant and antigenotoxic properties of Portuguese propolis. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Bio-empreendorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais. Departamento de Biologia. Universidade do Minho.

Cui, K., Lu, W., Zhu, L., Shen, X. e Huang, J. (2013). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, inhibits Helicobacter pylori peptide deformylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 435: 289-294.

Cui, Y., Zhao, S., Wu, Z., Dai, P. e Zhou, B. (2012). Mitochondrial release of the NADH dehydrogenase Ndi1 induces apoptosis in yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 23: 4373-4382.

Dota, K. F. D., Consolaro, M. E. L., Svidzinski, T. I. E. e Bruschi, M. L. (2011). Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011.

Dziedzic, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Dzik, A. K., Tanasiewicz, M. e Morawiec, T. (2013). The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013.

Endler, A. L., Oliveira, S. C., Amorim, C. A., Carvalho, M. P. e Pileggi, M. (2003). Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. *UEPG Bioogical Health Sciences*. 9: 17-20.

Fabris, S., Bertelle, M., Astafyeva, O., Gregoris, E., Zangrando, R., Gambaro, A., Lima, G. P. P. e Stevanato, R. (2013). Antioxidant Properties and Chemical Composition Relationship of Europeans and Brazilians Propolis. *Pharmacology & Pharmacy*. 4: 46-51.

Falcão, S. I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C. e Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*. 49: 805- 812.

Falcão, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M. e Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*. 24: 309-318.

Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M. e Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 396: 887-897.

Fernandes Jr, A., Sugizaki, M. F., Fogo, M. L., Funari, S. R. C., e Lopes, C. A. M. (1995). In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1: 63-69.

Fernandes-Silva, C. C., Freitas, J. C., Salatino, A. e Salatino, M. L. F. (2013). Cytotoxic Activity of Six Samples of Brazilian Propolis on Sea Urchin (Lytechinus variegatus) Eggs. *Evidence-Based Complemmentary and Alternative Medicine*. 2013.

Fernandes-Silva, C. C., Salatino, A., e Salatino, M. L. F. (2013). Chemical profiling of six samples of brazilian propolis. *Quimica. Nova.* 36: 237-240.

Fernandes, F. F., Dias, A. L. T., Ramos, C. L., Ikegaki, M., Siqueira, A. M. D., e Franco, M. C. (2007). The" in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on Cryptococcus neoformans. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. *49*: 93-95.

Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. e StruhL, K. (1997). Yap, a Novel Family of Eight bZIP Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with Distinct Biological Functions. *Molecular and Cellular Biology*. 17:6982–6993.

Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. e Barros, L. (2007). Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*. 100: 1511-6.

Ferreira, P., Cardoso, T., Ferreira, F., Fernandes-Ferreira, M., Piper, P. e Sousa, M. J. (2014). Mentha piperita essential oil induces apoptosis in yeast associated with both cytosolic and mitochondrial ROS-mediated damage. *FEMS Yeast Research*. 14: 1006-1014.

Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A.M., Cunha, A. e Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 1: 481-493.

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy Sciences*. 893: 13-18.

Frozza, C. O. S., Garcia, C. S. C., Gambato, G., Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F. F., Seixas, F. K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O. A., Henriques, J. A. P. e Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical*

Toxicology. 52: 137-142.

Fuliang H. U., Hepburn H. R. e Xuan H. (2005). Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with *Diabetes mellitus. Pharmacological Research*. 51: 147-152.

Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T. e Tamura, H. (2015). Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology*. 25: 189-198.

Gardner, A. M., Xu, F. H., Fady, C., Jacoby, F. J., Duffey, D. C., Tu, Y. e Lichtenstein, A. (1996). Apoptotic vs. Nonapoptotic Cytotoxicity Induced by Hydrogen Peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*. 22: 73-83.

Glab, N., Petit, P. X. e Slonimski, P. P. (1993). Mitochondrial dysfunction in yeast expressing the cytoplasmic male sterility *T-urfl3* gene from maize: analysis at the population and individual cell level. *Molecular Genetics and Genomics*. 236: 299-308.

Glab, N., Wise, R. P., Pring, D. R., Jacq, C. e Slonimski, P. (1990). Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male steriBty from maize: Respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. *Molecular Genetics and Genomics*. 223: 24-32.

Goffieau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. e Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*. 274: 546, 563-567.

Graham, L. A. e Stevens, T. H. (1999). Assembly of the Yeast Vacuolar Proton-Translocating ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 31: 39-47.

Grange, J. M., e Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*. 83: 159-160.

Gregoris, E., Fabris, S., Bertelle, M., Grassato, L. e Stevanato, R. (2011). Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 405: 97-101.

Grenho, L., Barros, J., Ferreira, C., Santos, V. R., Monteiro, F. J., Ferraz, M. P. e Cortes, M. E. (2015). *In vitro* antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. *Biomedical Materials*. 2015.

Hassani, R. A. e Dupuy, C. (2013). Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species (CM-H_2DCFDA). *Bio-protocol*. 3.

Hegazi, A. G., Hady, F. K. A. E. e Allah, F. A. M. A. (2000). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Nature*. 55: 70-75.

Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 602–607.

Houston, J. P., Naivar, M. A. e Freyer, J. P. (2010). Digital Analysis and Sorting of Fluorescence Lifetime by Flow Cytometry. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. 77: 861-872.

Huang, M. e Kolodner, R. D. (2005). A Biological Network in *Saccharomyces cerevisiae* Prevents the Deleterious Effects of Endogenous Oxidative DNA Damage. *Molecular Cell*. 17: 709-720.

Huberts, D. H. E. W., Bastian Niebel, B. e Heinemann, M. (2012). A flux-sensing mechanism could regulate the

switch between respiration and fermentation. *FEMS Yeast Res*. 12: 118-128.

Ilhan A., Akyol O. e Gurel A. (2004). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radical Biology Medicine*. 37: 386-394.

Ilhan A., Koltuksuz U. e Ozen S. (1999). The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/ reperfusion injury in rabbits. *European Journal Cardio-thoracic Surgery*. 16: 458-463.

Júnior, A. F., Lopes, M. M. R., Colombari, V., Monteiro, A. C. M. e Vieira, E. P. (2006). Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural.* 36: 294-297.

Junior, W. B., Miranda, E. O., Alvino, V., Araújo, B., Silva, D. W. e Porfirio, Z. (2012). Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*. 33: 03-10.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Mourtzinos, I. e Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 116: 452-461.

Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., e Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*. 86: 69-73.

Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. e Forgac, M. (2001). Yeast V-ATPase Complexes Containing Different Isoforms of the 100-kDa a-subunit Differ in Coupling Efficiency and *in Vivo* Dissociation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 17941-17948.

Kessler, M., Ubeaud, G. e Jung, L. (2003). Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 55: 131-142.

Kim, D. e Hahn, J. S. (2013) Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generating Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 5069–5077.

Kismet, K., Sabuncuoglu, M. Z., Kilicoglu, S. S., Kilicoglu, B., Devrim, E., Erel, S., Sunay, A. E., Erdemli, E., Durak, I. e Akkus, M. A. (2008). Effect of Propolis on Oxidative Stress and Histomorphology of liver Tissue in Experimental Obstructive Jaundice. *European Surgical Research*. 41: 231-237.

Koç, A. N., Silici, S., Kasap, F., Hörmet-Öz, H. T., Mavus-Buldu, H., e Ercal, B. D. (2011). Antifungal activity of the honeybee products against Candida spp. and Trichosporon spp. *Journal of Medicinal Food*. 14: 128-134.

Kotiranta, A., Lounatmaa, K. e Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection.* 2: 189-198.

Król, W., Bankova, V., Sforcin, J. M., Szliszka, E., Czuba, Z., e Kuropatnicki, A. K. (2013). Propolis: Properties, Application, and Its Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

Kubo, A., Lunde, C.S. e Kubo, I. (1995). Antimicrobial Activity of the Olive Oil Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 1629-1633.

Kubota, Y., Umegaki, K., Kobayashi K., Tanaka, N., Kagota, S., Nakamura, K., Kunitomo, M. e Shinozuka, K. (2004). Anti-hypertensive effects of Brazilian propolis in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 31: 29-30.

Kuge, S., Jones, N. e Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO Journal*. 16: 1710–1720.

Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M. e Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*. 19: 78-101.

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., e Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L. e Fernández-Mejía, C. (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-a Role for Antioxidants*. 9: 209-231.

Lee S., Kim K. S., Park Y., Shin K. H. e Kim B. K. (2003). *In vivo* anti-oxidant activities of tectochrysin. *Archives of Pharmacal Research*. 26: 43-46.

Lee, R. E. C., Puente, L. G., Kærn, M. e Megeney, L. A. (2008). A Non-Death Role of the Yeast Metacaspase: Yca1p Alters Cell Cycle Dynamics. *PLOS ONE*. 3.

Lin S. C., Chung C. Y., Chiang C. L. e Hsu S. H. (1999). The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. *American Journal of Chinese Medicine*. 27: 83-93.

Longhini, R., Raksa, S. M., Oliveira, A. C. P., Svidzinski, T. I., e Franco, S. L. (2007). Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacogn*. 17: 388-95.

Lopez, B. G. C., Lourenço, C. C., Alves, D. A., Machado, D., Lancellotti, M. e Sawaya, A. C. H. F. (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. *Journal of Applied Microbiology.* 119: 677-687.

Ludovico, P., Sansonetty, F. e Real, M. C. (2001). Assessement of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*. 147: 3335-3343.

Machado, J. L., Assunção, A. K. M., Silva, M. C. P., Reis, A. S., Costa, G. C., Arruda, D. S., Rocha, B. A., e Vaz, M. M. O. L. L. (2012). Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.

Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. e Fröhlich, K. U. (2002). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Current Genetics*. 41: 208-216.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Wesselborg, S. e Fröhlich, K. U. (2002). A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. *Molecular Cell*. 9: 911-917.

Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T. e Fröhlich, K. U. (2004). Apoptosis in yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 655-660.

Manolson, M. F., Proteau, D., Preston, R. A., Stenbit, A., Roberts, B. T., Hoyt, M. A., Preuss, D., Mulholland, J., Botstein, D. e Jones, E. W. (1992). The *V P H I* Gene Encodes a95-kDa Integral Membrane Polypeptide Required for *in Vivo* Assembly and Activity of the Yeast Vacuolar H+-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 14294-14303.

Marcucci, M.C. (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*. 19: 529-536.

Maris, A. F., Assumpção, A. L. K., Bonatto, D., Brendel, M. e Henriques, J. A. P. (2001). Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in Saccharomyces cerevisiae is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*. 39: 137-149.

Mavri, A., Abramovič, H., Polak, T., Bertoncelj, J., Jamnik, P., Možina, S. S. e Jeršek, B. (2012). Chemical Properties and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Slovenian Propolis. *Chemistry & Biodiversity*. 9: 1545-1558.

Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N. e Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*. 152: 239-246.

Nascimento, A. P., Ferreira, N. U., Barizon, E. A., Rocha, B. A., Vaz, M. M. O. L. L. e Berretta, A. A. (2013). Methodologies for the evaluation of the antibacterial activity of propolis. *African Journal of Microbiology Research*. 7: 2344-2350.

Olive, P. L. e Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*. 1: 23-29.

Oliveira, A. C. P., Shinobu, C. S., Longhini, R., Franco, S. L. e Svidzinski, T. I. E. (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro. 101: 493-497.

Oliveira, R. e Johansson, B. (2012). Quantitative DNA Damage and Repair Measurement with the Yeast Comet Assay. *Methods in Molecular Biology*. 920: 101-109.

Ostling, O. e Johanson, K. J. (1984). Micrdelectkophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123: 291-298.

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V. e Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses*. 44: 375-378.

Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis — the 'accidental' pathogen. *Nature reviews | Microbiology.* 7: 555-567.

Ozkul, Y., Eroglu, H. E. e Ok, E. (2006). Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes. *Pharmazie*. 61: 638-640.

Park, J. S., Li, Y. F. e Bai, Y. (2007). Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1772: 533-542.

Paulino, N., Barbosa, A. P., Paulino, A. S. e Marcucci, M. C. (2014). Hepatoprotective effect of green propolis is related with antioxidant action *in vivo* and *in vitro. Oxidants and Antioxidants in Medical Science*. 3: 43-50.

Pereira, A. S., Seixas, F. R. M. S. e Neto, F. R. A. (2002). Própolis: 100 Anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. *Química Nova*. 25: 321-326.

Pereira, H. (2013). Genotoxic, phytotoxic and protective effects of Portuguese própolis. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Bio-empreendorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais. Departamento de Biologia. Universidade do Minho.

Petelinc, T., Polak, T., Demsar, L. e Jamnik, P. (2013). Fractionation of phenolic compounds extracted from propolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE.* 8.

Pfaller, M. A., Rinaldi, M. G., Galgiani, J. N., Bartlett, M. S., Body, B. A., Ingroff, A. E., Fromtling, R. A., Hall, G. S., Hughes, C. E., Odds, F. C. e Sugar A. M. (1990). Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 34: 1648-1654.

Pimentel, C., Caetano, S. M., Menezes, R., Figueira, I., Santos, C. N., Ferreira, R. B., Santos, M. A. S. e Pousada, C. R. (2014). Yap1 mediates tolerance to cobalt toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840: 1977–1986.

Pinheiro, S. L., Nascimento, T. C., Bernardes, T., Silvestre, F. H. O. S. e Ribeiro, M. C. (2007). Avaliação da capacidade antimicrobiana dos sistemas adesivos associados a própolis ou a antibióticos sobre *S. mutans. Revista Ciências Médicas.* 16: 15-22.

Pippi, B., Lana, A. J. D., Moraes, R. C., Güez, C. M., Machado, M., Oliveira, L. F. S., Lino von Poser, G. e Fuentefria, A. M. (2015). In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on Candida spp.. *Journal of Applied Microbiology*. 118: 839-850.

Probst, I. S., Sforcin, J. M., VLM, R., Fernandes, A. A. H., e Fernandes Júnior, A. (2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 17: 159-167.

Ramos, A. F. N. e Miranda, J. L. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 13: 697-710.

Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A. e Stevens, T. H. (1992). *Molecular Biology of the Cell*. 3: 1389-1402.

Reddi, A. R. e Culotta, V. C. (2013). SOD1 Integrates Signals from Oxygen and Glucose to Repress Respiration. *Cell*. 152: 224-235.

Scheller, S., Dworniczak, S., Waldemar-Klimmek, K., Rajca, M., Tomczyk, A. e Shani, J. (1999). Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Zeitschrift für Naturforschung C. 54*: 549-553.

Seo K. W., Park M., Song Y. J., Kim S. J. e Yoon K. R. (2003). The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytotherapy Research*, 17: 250-253.

Sforcin, J. M. e Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. 133: 253-260.

Sforcin, J. M., Fernandes, A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., e Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 73: 243-249.

Silici, S. e Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 69-73.

Silici, S., Koç, N. A., Ayangil, D. e Çankaya, S. (2005). Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Journal of Pharmacological Sciences*. 99: 39-44.

Silva-Carvalho, R., Baltazar, F. e Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.

Silva-Carvalho, R., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Cardoso, S. M., Sobral, A. J. F. N., Almeida-Aguiar, C. e Baltazar, F. (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in *in vitro* and *in vivo* models. *Journal of Functional Foods*. 11: 160-171.

Silva, C. G., Raulino, R. J., Cerqueira, D. M., Mannarino, S. C., Pereira, M. D., Panek, A. D., Silva, J. F. M., Menezes, F. S. e Eleutherio E. C. A. (2009). In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology.* 16: 761–767.

Silva, W. E. L., Junior, W. D. F., Rosa, P. R., Peixoto, R. M., Tenório, J. A. B., Silva, T. M. S. e Costa, M. M. (2015). *In vitro* activity of propolis: Synergism in combination with antibiotics against *Staphylococcus* spp.. *African Journal of Microbiology Research*. 9: 1-5.

Sinhorini, W. A., Bordin, J. T., Vignoto, V. K. C., Cardozo, R. M., Martins, R. R. e Wosiacki, S. R. (2014). Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*. 1: 107-111.

Sirbu, B. M., e Cortez, D. (2013). DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5(8).

Sousa, J. M. D. (2015). Avaliação da capacidade antioxidante de própolis de diversas origens geográficas: Comparação de métodos. Projeto de Licenciatura em Biologia Aplicada. Departamento de Biologia. Universidade do Minho.

Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I. e Švabić-Vlahović, M. (2003). In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*. 158: 353-357.

Suzuki, K. e Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 581: 2156-2161.

Tavares, D. C., Barcelos, G. R. M., Silva, L. F., Tonin, C. C. C. e Bastos, J. K. (2006). Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro*. 20: 1154-1158.

Temple, M. D., Perrone, G. G. e Dawes, P. I. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *TRENDS in Cell Biology*. 15: 319-326.

Thomas, D.S. e Davenport, R.R. (1985). Zygosaccharomyces bailii-a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*. 2: 157-169.

Toone, W. M. e Jones, N. (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Oncogenes and Cell Proliferation*. 9: 55-61.

Tsai, Y. C., Wang, Y. H., Liou, C. C., Lin, Y. C., Huang, H., e Liu, Y. C. (2012). Induction of Oxidative DNA Damage by Flavonoids of Propolis: Its Mechanism and Implication about Antioxidant Capacity. *Chemical Research in Toxicology*. 25: 191−196.

Tsuchiya, I., Hosoya, T., Ushida, M., Kunimasa, K., Ohta, T. e Kumazawa, S. (2013). Nymphaeol-A Isolated from Okinawan Propolis Suppresses Angiogenesis and Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Inactivation of Survival Signals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

Valença, I. (2011). Estudo da actividade antimicrobiana e antitumoral do própolis português. Tese de Mestrado em Genética Molecular. Departamento de Biologia. Universidade do Minho.

Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., Heras, B., Hortelano, S. e Delporte, C. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*. 168: 37-44.

Vendrell, A., Pastor, M.M., Novo, A.G., Ahuir, A.P., Sinclair, D.A., Proft, M. e Posas, F. (2011). Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the Hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Reports*. 12: 1062-1068.

Wagh, V. D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2013.

Wang, D., Kreutzer, D. A. e Essigmann, J. M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 400: 99-115.

Wang, K., Zhang, J., Ping, S., Ma, Q., Chen, X., Xuan, H., Shi, J., Zhang, C. e Hu, F. (2014). Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (Populus canadensis). *Journal of Ethnopharmacology*. 155: 300-311.

Wided, K., Hassiba, R. e Mesbah, L. (2014). Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27: 1891-1897.

Wirth, F., e Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of Rhodotorula: an emerging pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012.

Wojtyczka, R. D., Dziedzic, A., Idzik, D., Kępa, M., Kubina, R., Kabala-Dzik, A., Smoleń-Dzirba, J., Stojko, J., Sajewicz, M. e Wąsik, T. J. (2013). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Molecules*. 18: 9623-9640.

Zhou, B. B. S. e Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 408: 433-439.

ANEXO I – EFEITO DE P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE E P14.EE AO LONGO DO TEMPO EM *S. CEREVISIAE* EM YPETOH

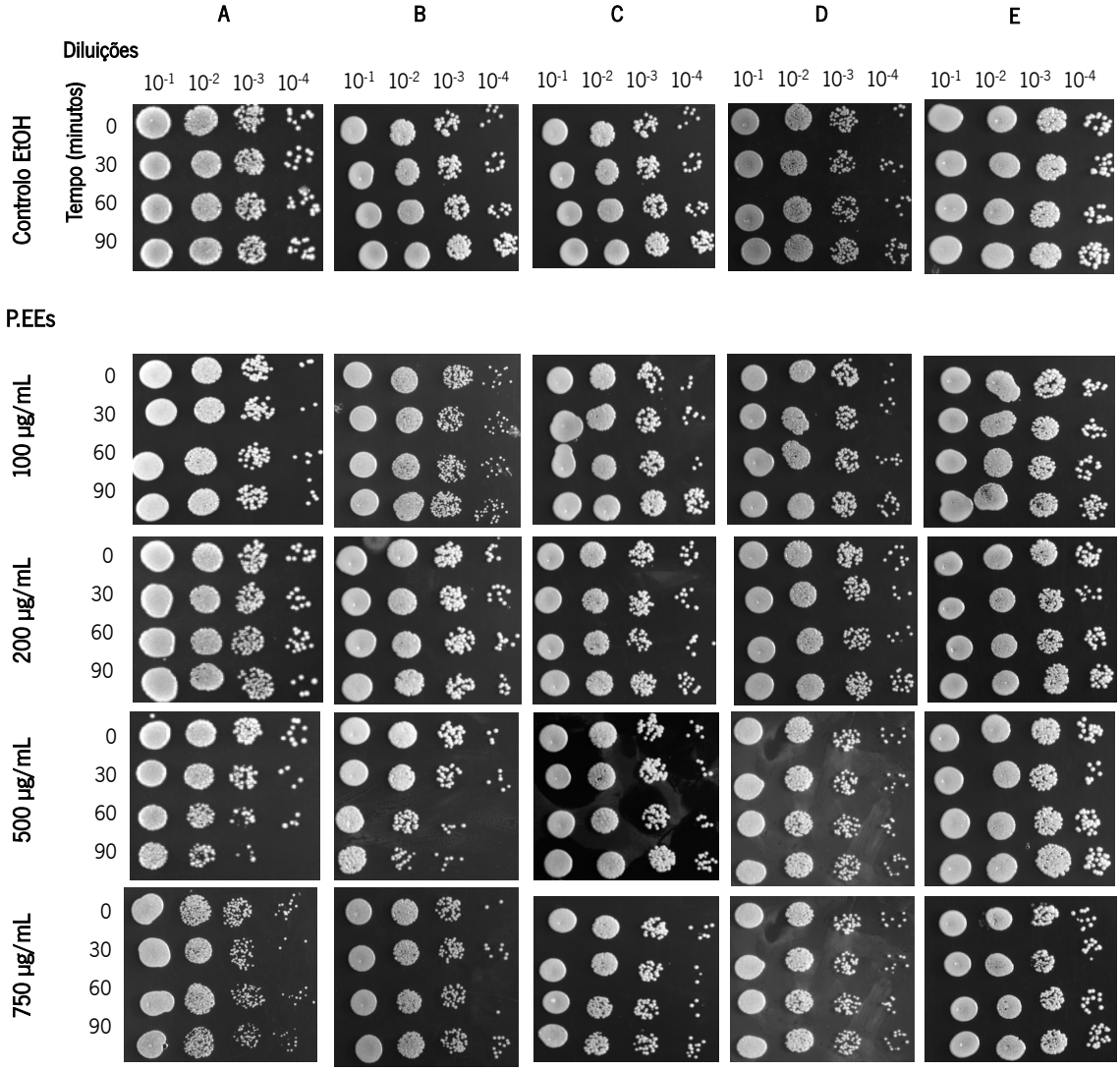


Figura A1. Células de *S. cerevisiae* em meio YPEtOH tratadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} ou 750 μgmL^{-1}. Como controlo negativo utilizou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato utilizado. As células foram incubadas retirando-se alíquotas em intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 90) para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, usadas para inocular YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

ANEXO II - MUTANTES DE *S. CEREVISIAE* BY4741 E W303 APRESENTAM SUSCETIBILIDADE DIFERENTE A P10.EE E P12.EE

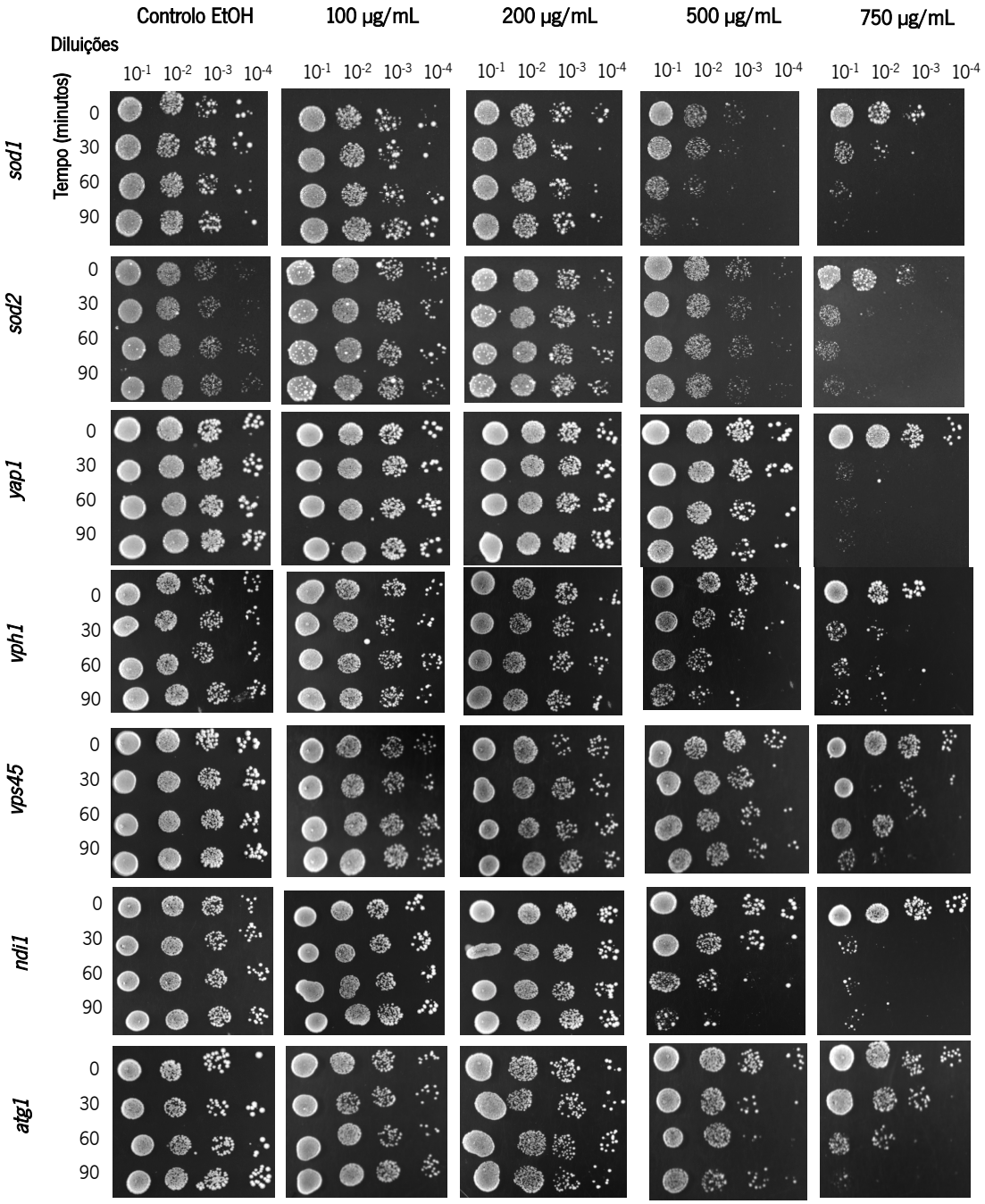


Figura A2. Os mutantes *sod1*, *sod2*, *yap1*, *vph1*, *vps45*, *ndi1* e *atg1* foram tratados durante 90 minutos com P10.EE nas concentrações de 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

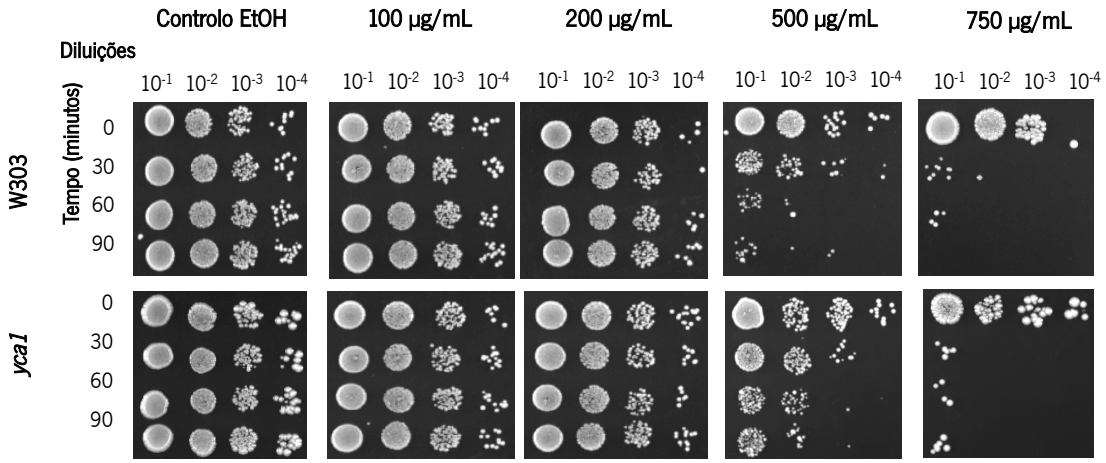


Figura A3. Culturas de W303 e *yca1* foram tratadas durante 90 minutos com P10.EE nas concentrações de 100 µgmL^{-1}, 200 µgmL^{-1}, 500 µgmL^{-1} e 750 µgmL^{-1}; ao controlo negativo adicionou-se etanol absoluto. Aos minutos 0, 30, 60 e 90 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

ANEXO III – P.EES PROTEGEM *S. CEREVISIAE* BY4741 SUJEITA A CONDIÇÕES DE STRESSE OXIDATIVO COM H_2O_2

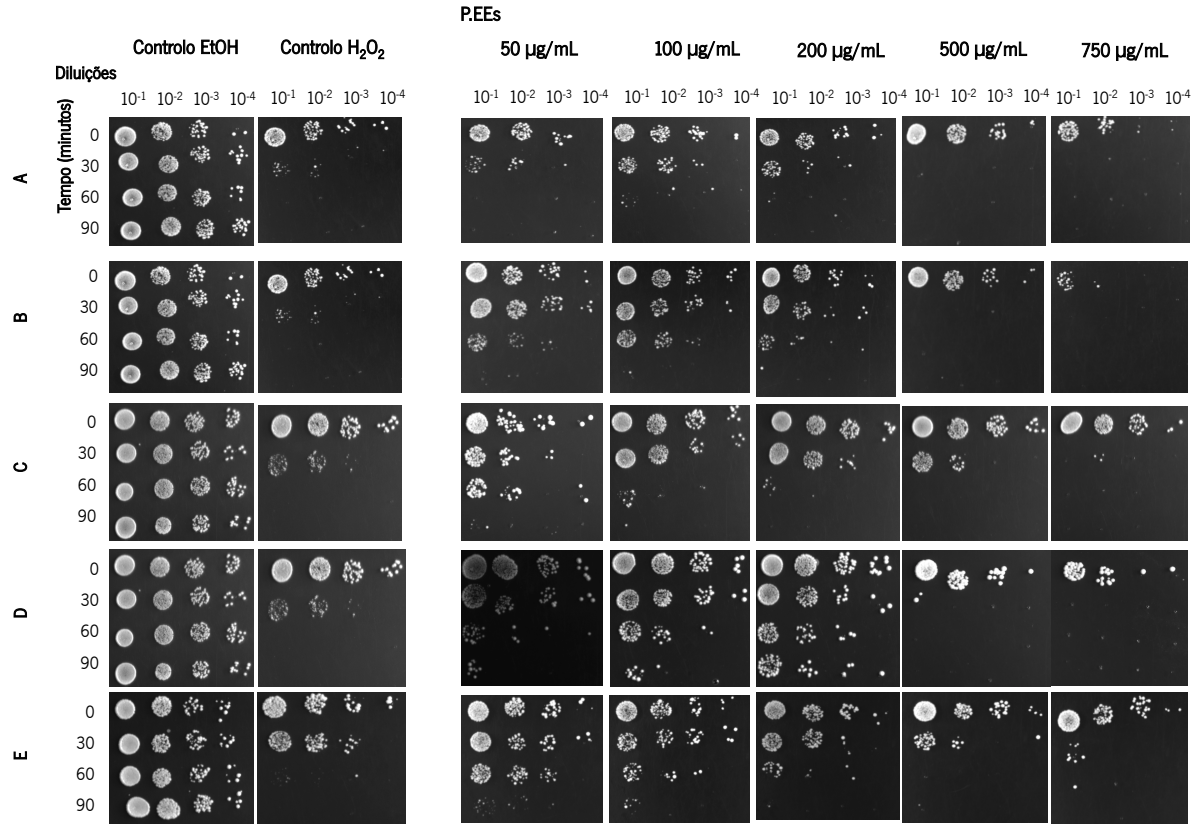


Figura A4. Co-incubação com extratos etanólicos de própolis Pereiro. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas em simultâneo com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E), nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1} e H_2O_2 a 5 mM. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 a 5 mM e ao negativo etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

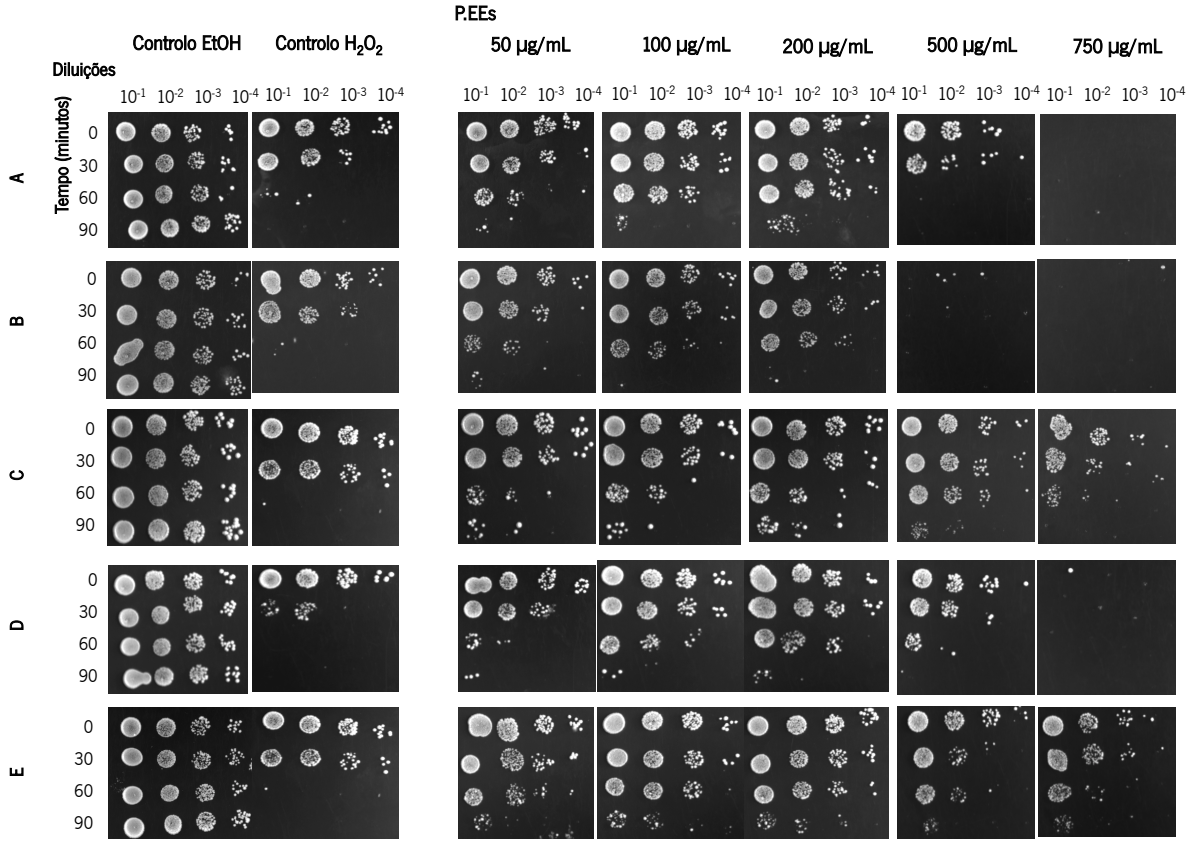


Figura A5. Pré-incubação com extratos etanólicos do própolis de Pereiro. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas com P10.EE (A), P11.EE (B), P12.EE (C), P13.EE (D) ou P14.EE (E) nas concentrações de 50 μgmL^{-1}, 100 μgmL^{-1}, 200 μgmL^{-1}, 500 μgmL^{-1} e 750 μgmL^{-1}. Aos controlos positivo e negativo adicionou-se etanol absoluto no volume máximo de extrato adicionado. As células foram incubadas durante 20 minutos, lavadas em dH_2O e ressuspendidas em meio de cultura. Ao controlo positivo adicionou-se H_2O_2 5mM assim como às amostras com extratos. Aos minutos 0, 20, 40 e 60 de incubação retiraram-se alíquotas para proceder às diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4} e inoculação em YPDA. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Resultados representativos de 3 réplicas independentes.

Anexo IV – Atividade antibacteriana de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra 19 bactérias

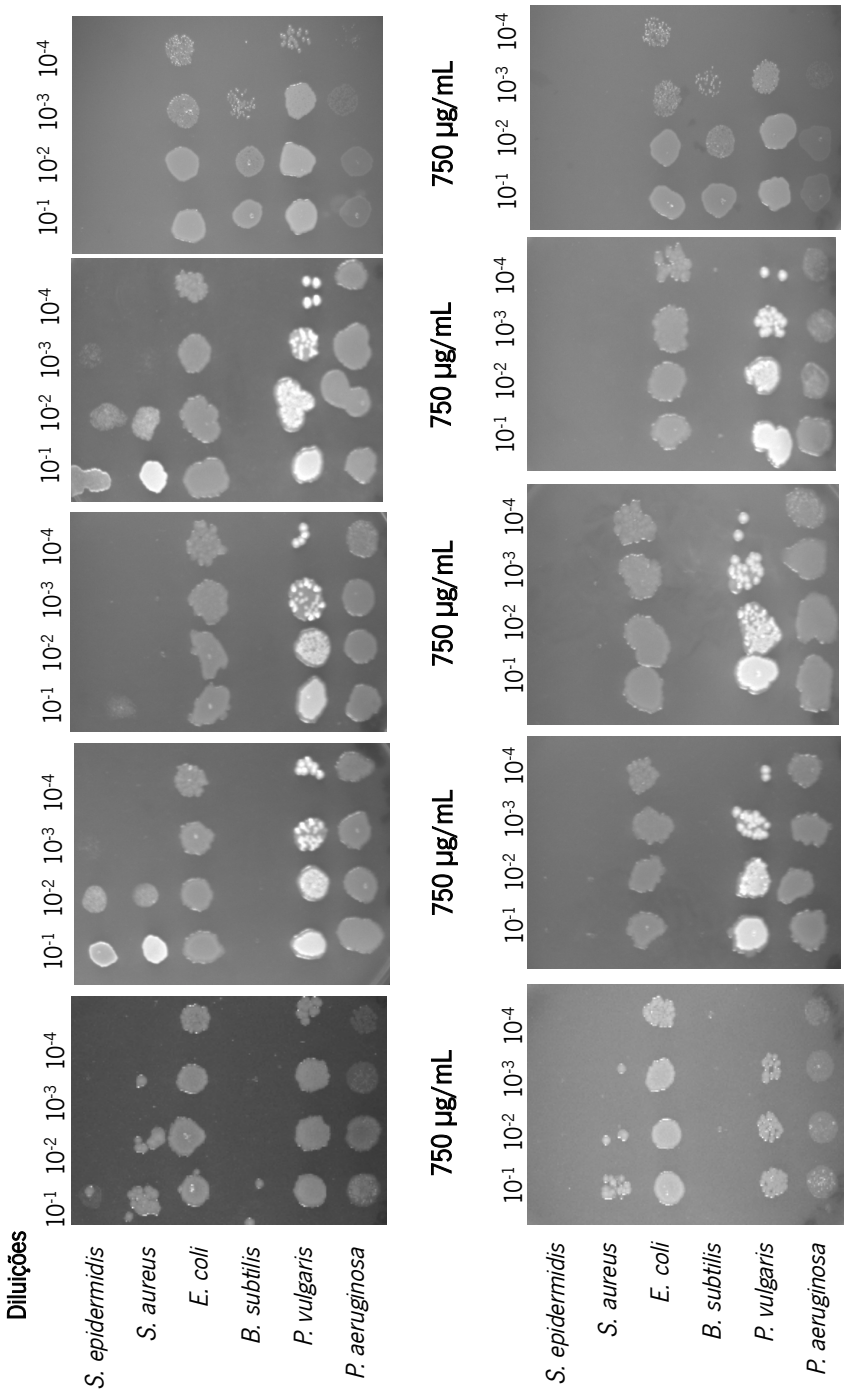


Figura A6. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de bactérias testadas em meio LBA suplementado com 500 μgml^{-1} e 750 μgml^{-1} de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

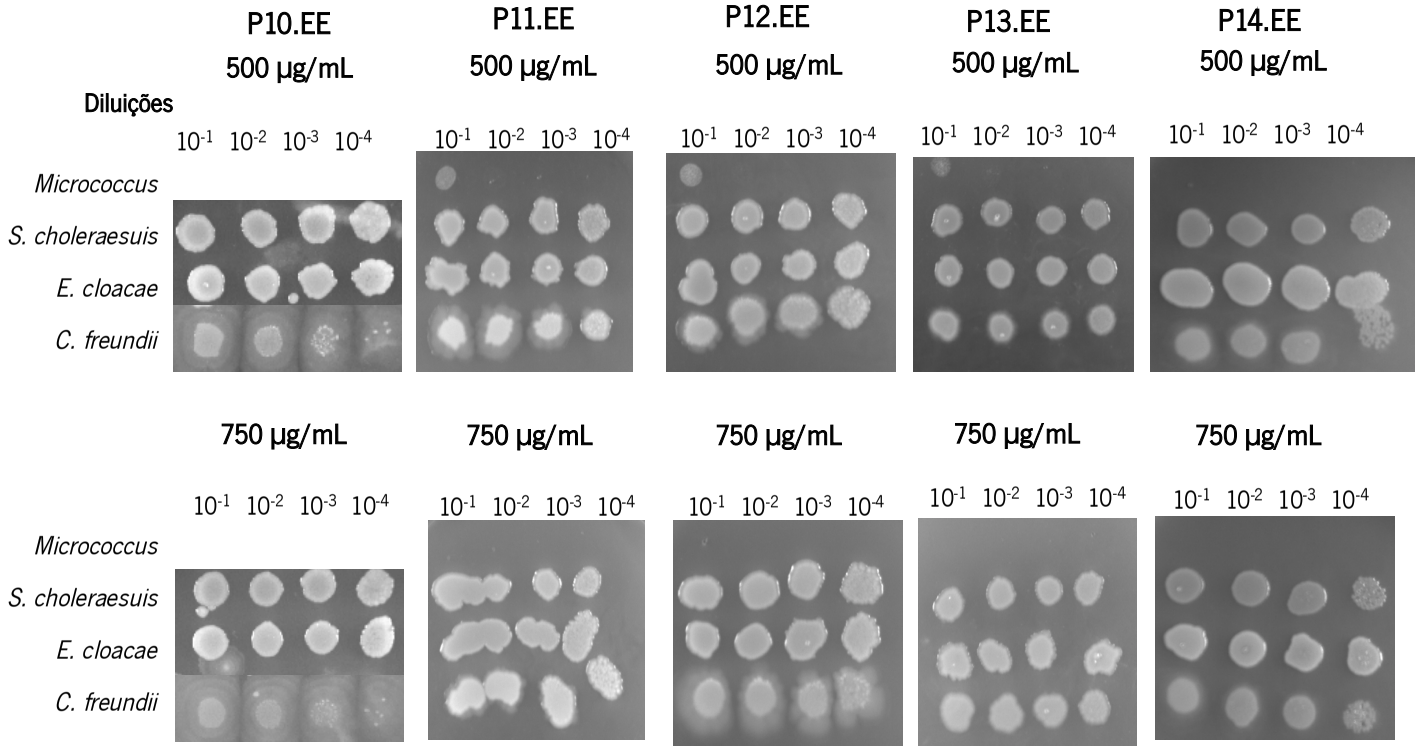


Figura A7. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de bactérias testadas em meio LBA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

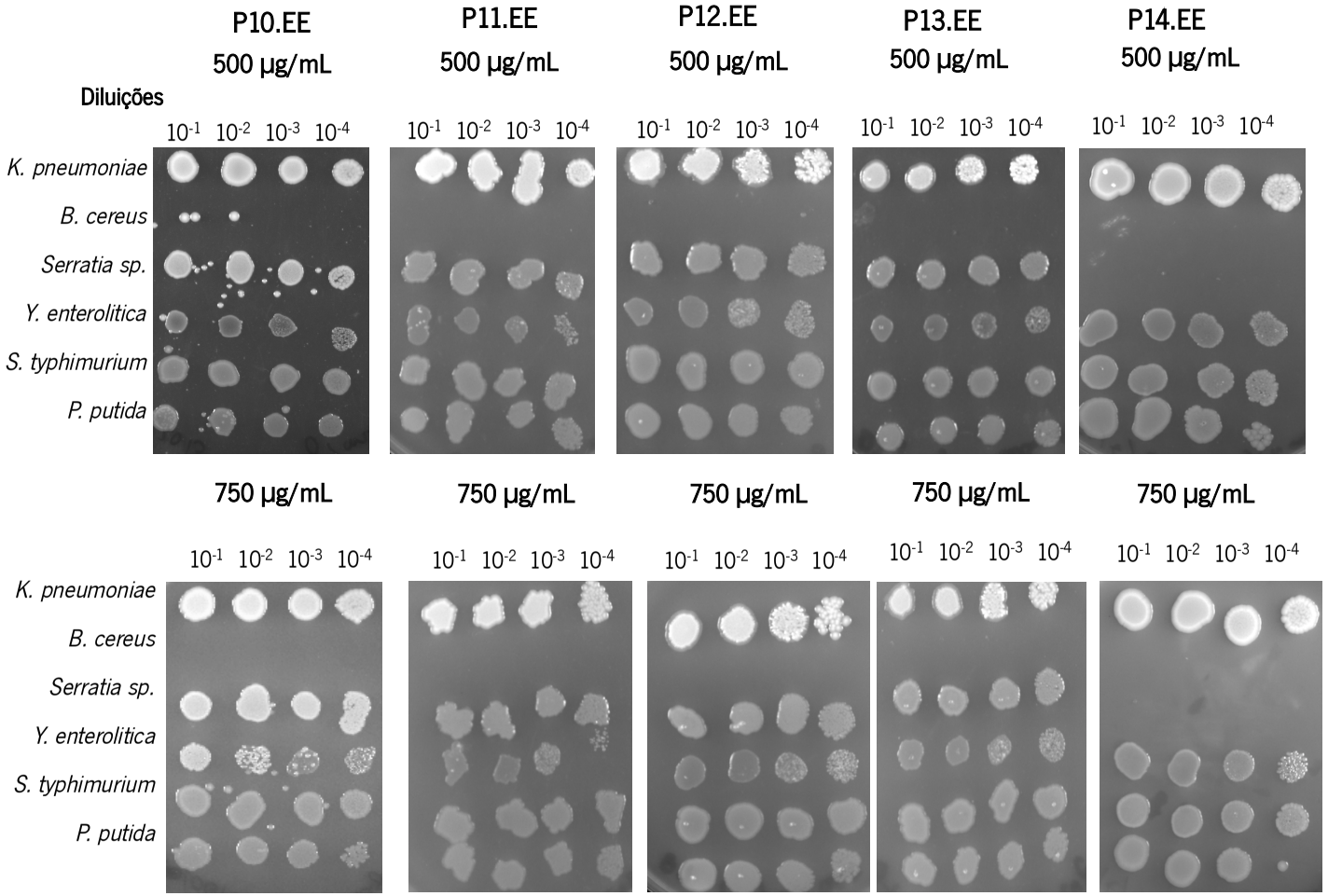


Figura A8. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de bactérias testadas em meio LBA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

Anexo V – Atividade antifúngica de P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o painel de 18 leveduras selecionado

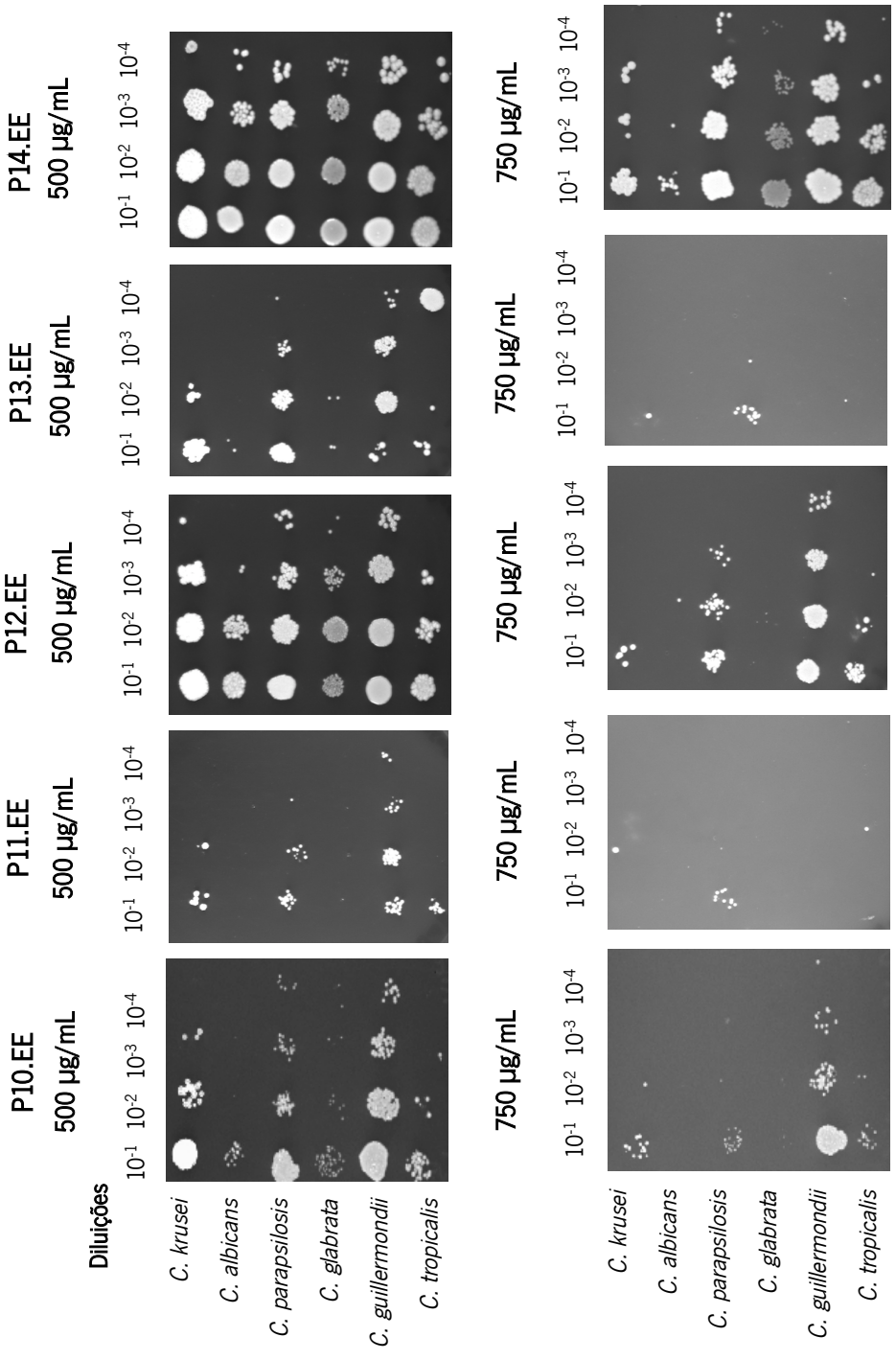


Figura A9. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de leveduras. Ensaio em meio YPDA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

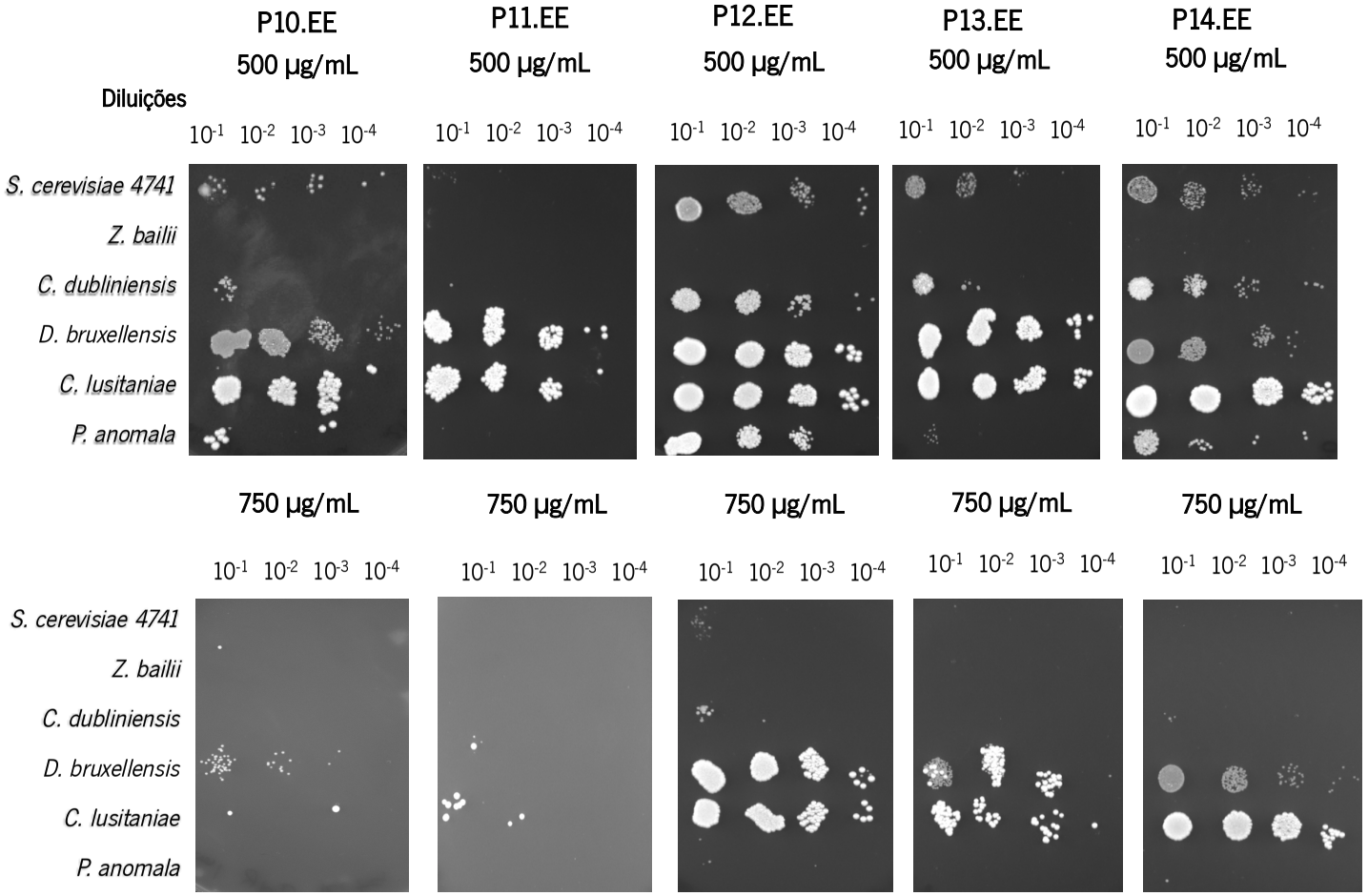


Figura A10. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de leveduras, testadas em meio YPDA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.

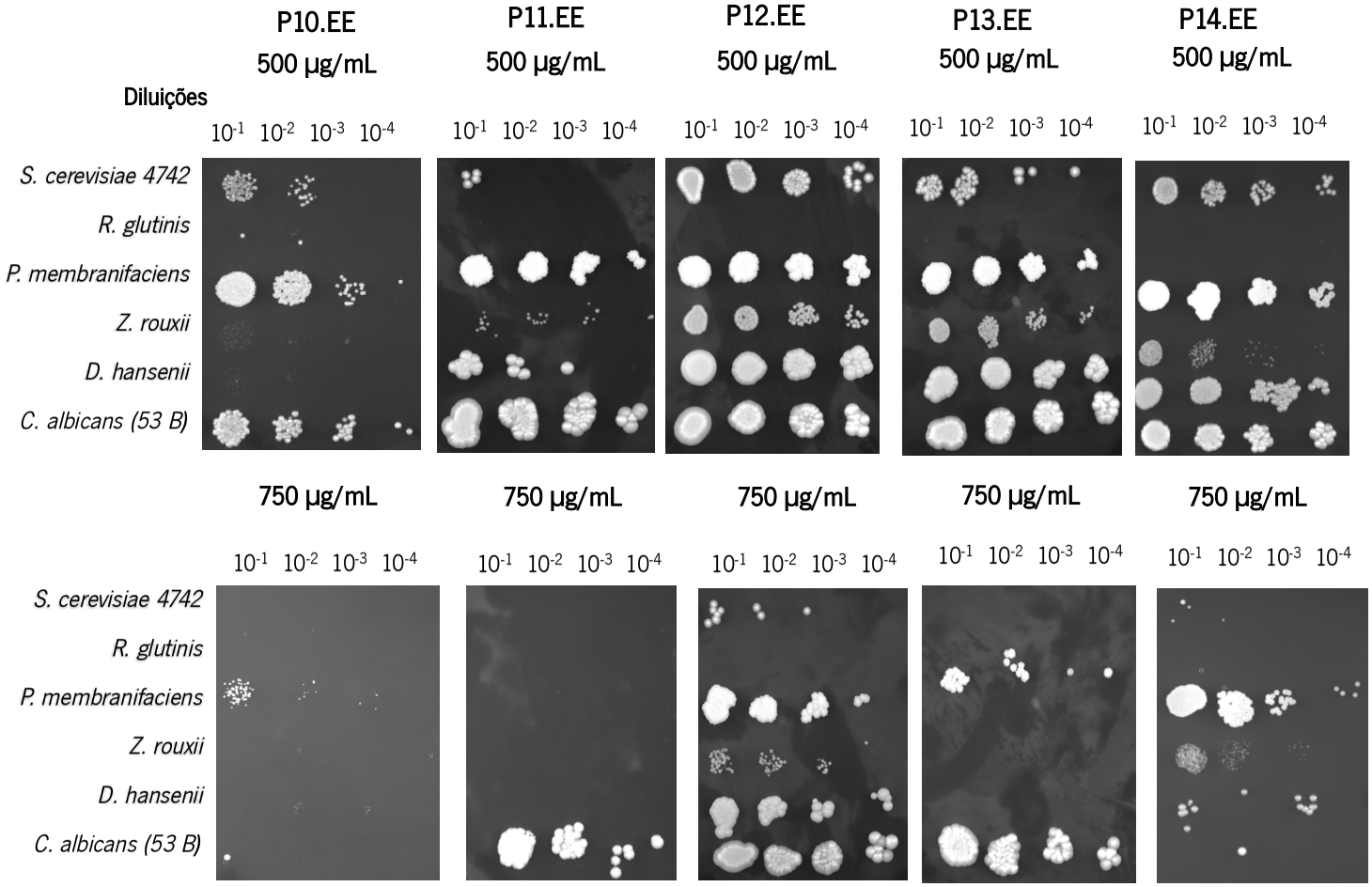


Figura A11. Ensaio pelo método de diluição em agar para determinação dos valores de MIC para P10.EE, P11.EE, P12.EE, P13.EE e P14.EE contra o leque de leveduras testadas em meio YPDA suplementado com 500 $\mu g ml^{-1}$ e 750 $\mu g ml^{-1}$ de P.EEs. Ensaio representativo de 3 réplicas independentes.