

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC

ELLEN GLEICER LIMA SANTOS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO EXTRATO
ETANÓLICO DE TRÊS TIPOS DE PRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL
SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA K1735

ILHÉUS-BA

2015

ELLEN GLEICER LIMA SANTOS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO EXTRATO
ETANÓLICO DE TRÊS TIPOS DE PRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL
SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA K1735

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de
Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Dr^a Roueda Abou Said

ILHÉUS-BA

2015

ELLEN GLEICER LIMA SANTOS

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO EXTRATO
ETANÓLICO DE TRÊS TIPOS DE PRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL
SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA K1735

Ilhéus-BA, 14 de abril de 2015

Roueda Abou Said – DSc
Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais/UESC
(Orientador)

Danielle Oliveira dos Anjos – DSc
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPqGm – Fiocruz-BA

Aline Oliveira da Conceição – DSc
Departamento de Ciências Biológicas/UESC

ILHÉUS-BA

2015

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO EXTRATO ETANÓLICO DE TRÊS TIPOS DE PRÓPOLIS DO NORDESTE DO BRASIL SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA K1735

RESUMO

O extrato de própolis, uma substância resinosa coletada pelas abelhas através de fontes botânicas, tem sido bastante utilizado em estudos *in vitro*, devido à conhecida atividade citotóxica que a própolis possui, inibindo o crescimento de células tumorais e sua proliferação e afetando a viabilidade celular através da indução da morte celular. Não existem relatos sobre o efeito *in vitro* anti-melanoma de extrato etanólico de própolis ou os seus mecanismos funcionais na linhagem de células de melanoma murino K1735. Investigou-se o efeito antitumoral de três amostras de própolis do nordeste brasileiro, duas amostras de apiários distintos de Ilhéus-BA e uma amostra de João Pessoa-PB. A avaliação da citotoxicidade/viabilidade celular, através do ensaio MTT e do método de exclusão do corante azul de tripan, revelou que a própolis do nordeste do Brasil inibiu significativamente o crescimento de células de melanoma K1735, de forma tempo e dose dependente *in vitro*. A amostra 3 de própolis de Ilhéus-BA foi a mais citotóxica apresentando diminuição do IC₅₀ de forma tempo-dependente, reduzindo 84,5% (95-14,7µg/mL) em 24h e 72h de tratamento, respectivamente. A análise morfológica das células através de microscópio óptico e de contraste de fase revelou que a própolis induz alterações como presença de grânulos em volta do núcleo e no centro dele, fragmentação nuclear, intensa formação de vacúolos citoplasmáticos, surgimento de *blebbings* de membrana e as células se tornam arredondadas e individualmente separadas. Além disso, a própolis induz a morte celular por apoptose tardia e por necrose, analisado por Citometria de fluxo. Os nossos resultados indicam que a própolis do nordeste brasileiro inibe a viabilidade de células de melanoma murino K1735 e que constitui uma excelente fonte de agente natural anti-tumoral.

Palavras-chave: Antineoplásico. Citotoxicidade. Extrato de própolis. Viabilidade celular. MTT.

AVALIAÇÃO IN VITRO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO EXTRATO ETANÓLICO DE TRÊS TIPOS DE PRÓPOLIS DA BAHIA E PERNAMBUCO, BRASIL

ABSTRACT

The propolis extract, a resinous substance collected by the bees from botanical sources, has been widely used in in vitro studies due to the known cytotoxic activity that has propolis, inhibiting the growth of tumor cells and affect their proliferation and cell viability by induction of cell death. There are no reports on the effect in vitro anti-melanoma ethanolic extract of propolis or its functional mechanisms in melanoma murine cell line K1735. The antitumor effect of three propolis samples from northeastern Brazil, two samples of different apiaries of Ilheus, Bahia and a sample of João Pessoa-PB was investigated. The assessment of cytotoxicity / cell viability by the MTT assay and the exclusion of trypan blue dye method, revealed that propolis of northeastern Brazil significantly inhibited the growth of K1735 melanoma cells, so time and dose dependent in vitro. Sample 3 of propolis Ilheus-BA was the most cytotoxic IC50 with decreased time-dependently reduced 84.5% (95-14,7µg / ml) for 24 and 72 hours of treatment, respectively. Morphological analysis of the cells through an optical microscope and phase contrast revealed that propolis induces changes as the presence of beads on and around the core at its center, nuclear fragmentation, formation of intense cytoplasmic vacuoles, blebbings emergence of membrane and cells become rounded and individually separated. Furthermore, propolis induces cell death by apoptosis and necrosis later analyzed by flow cytometry. Our results indicate that propolis northeastern Brazil inhibits the viability of K1735 murine melanoma cells and is an excellent source of natural anti-tumor agent.

Keywords: Antineoplastic. Cytotoxicity. Propolis extract. Cell viability. MTT.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Porcentagem de viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle), determinada pelo ensaio MTT, após 24h da incubação das células K1735 com os três extratos de própolis.....	37
2. Porcentagem de viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle), determinada pelo ensaio MTT, após 48 h da incubação das células K1735 com os três extratos de própolis.....	38
3. Porcentagem de viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle), determinada pelo ensaio MTT, após 72 h da incubação das células K1735 com os três extratos de própolis.....	39
4. Efeito dos extratos de própolis no crescimento de células de melanoma K1735 em estudo tempo-resposta. Concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL , em relação aos tratamentos de 24, 48 e 72h.....	41
5. Efeito dos extratos de própolis no crescimento de células de melanoma K1735 em estudo tempo-resposta (24-48-72 horas)...	42
6. Teste de exclusão do corante Azul de Tripan realizado após 24h de tratamento com os extratos de própolis, nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL.....	47
7. Aspecto morfológico das células K1735, coradas com o corante Azul de tripan, após 24h de tratamento na concentração de 400 µg/mL do extrato 3 e avaliadas através de microscópio de contraste de fase, com aumento de 100x.....	48
8. Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato etanólico da amostra 1 de própolis.....	49
9. Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato etanólico da amostra 2 de própolis.....	51
10. Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato etanólico da amostra 3 de própolis.....	52
11. Células K1735 apresentando morfologia normal.....	54
12. Células K1735 após 48h de tratamento com o Extrato 3, na concentração de 400 µg/mL.....	54
13. Formação de blebbings de membrana em células K1735 de melanoma murino após 48h de tratamento com o extrato 1.....	55
14. Células K1735 após tratamento por 48h com extrato 1 na concentração de 400 µg/mL.....	56
15. Análise morfológica das células K1735. A) Antes do tratamento com própolis (controle negativo). B) Após 48h de tratamento com extrato 3 de própolis.....	58

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Amostras de própolis que foram utilizadas, segundo sua localização geográfica e característica de coloração.....	29
2. Análise comparativa das médias (%) da viabilidade celular, após 24h de tratamento com o extrato 3 utilizando os veículos DMSO e etanol.....	35
3. Valores de IC ₅₀ após 24, 48 e 72h de tratamento com extratos etanólicos de própolis.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

nm – nanômetro

mL – mililitros

µL – microlitros

µg/mL – microgramas por mililitros

mg/mL – miligramas por mililitros

IC₅₀ – concentração inibitória

DMSO – dimetilsulfóxido

h – hora

PI – Iodeto de propídio

MTT - Ensaio 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS - solução salina tamponada com fosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 A própolis: composição e atividades biológicas	15
3.1.1 A atividade antitumoral da própolis do Brasil e principais ensaios biológicos empregados <i>in vitro</i>	18
3.1.1.1 Ensaio 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)	21
3.1.1.2 Método de exclusão do corante Azul de Tripan	23
3.1.1.3 Citometria de fluxo	24
3.1.1.4 Avaliação morfológica das células	26
3.2 Cultura celular e células K1735	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Delineamento experimental	29
4.2 Preparo dos extratos etanólicos de própolis	29
4.3 Preparo das soluções estoque de própolis e solução de uso	30
4.4 A linhagem e cultura celular	31
4.5 Plaqueamento das células	31
4.6 Avaliação da viabilidade celular	31
4.6.1 Teste de citotoxicidade MTT	31
4.6.1.1 Cálculo do IC 50	32
4.6.2 Método de exclusão do corante Azul de Tripan	32
4.7 Avaliação das alterações morfológicas	33
4.7.1 Avaliação através do microscópio de contraste de fase	33
4.7.2 Método de coloração panótico	33
4.8 Teste para distinguir o mecanismo de morte celular: apoptose ou necrose	34
4.8.1 Citometria de fluxo	34

4.9 Análise estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Escolha do veículo	34
5.2 Ensaio MTT	37
5.3 IC 50	44
5.4 Método de exclusão do corante Azul de Tripán	45
5.5 Citometria de fluxo	48
5.6 A avaliação morfológica através do microscópio de contraste de fase	53
5.7 Avaliação morfológica através de microscopia óptica	58
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO I	

1. INTRODUÇÃO

A própolis se constitui como um produto natural resinoso, elaborado por abelhas a partir de várias fontes botânicas, e que representa uma fonte promissora de agentes terapêuticos (DÍAZ-CARBALLO et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014). Sua composição química varia de acordo com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas, sofrendo influência da localização geográfica (SULAIMAN et al., 2011). Tendo em vista que suas propriedades biológicas se relacionam com a composição química, tais propriedades também são variáveis de acordo com a localização geográfica (VALENTE et al., 2011).

Estudos *in vitro* demonstraram que a própolis possui atividade antitumoral, indicando inclusive citotoxicidade seletiva. Em ensaios *in vitro* foi observado que as células tumorais, quando expostas aos extratos de própolis, apresentaram maior índice de inibição da proliferação em comparação às células normais (VALENTE et al., 2011; DA SILVA FROZZA et al., 2013).

O papel de uma substância citotóxica está relacionado com a inibição do crescimento celular e da proliferação, afetando a viabilidade das células por desencadeamento de morte celular (CARVALHO et al., 2012). Alguns autores afirmam que o mecanismo de morte celular induzido pela própolis seria por apoptose (LI et al., 2008) enquanto outros por necrose (CAMPOS et al., 2014). Tais divergências se devem a fatores como tipo de própolis, tipo de extrato e concentrações utilizadas, bem como modelo experimental empregado. Sobre este último quesito, faz-se necessária a utilização de diferentes ensaios biológicos, visando integrar e complementar as informações obtidas por múltiplos parâmetros.

Neste sentido, existem vários ensaios *in vitro* que podem ser empregados como indicadores de viabilidade celular e de citotoxicidade (KIM et al., 2009). A exemplo tem-se o ensaio do MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, que é um ensaio amplamente utilizado por ser simples, sensível, rápido e de baixo custo. Trata-se de um ensaio colorimétrico que avalia a formação de cristais de formazan pelas células que permanecem viáveis (KOUIDHI et al., 2010). Entretanto, alguns estudos desenvolvidos para testar a confiabilidade do ensaio de MTT confirmaram haver uma sobreavaliação do número de células (POZZOLINI et al., 2003) e alguns resultados falso-positivos (ROLLINO et al., 1995).

A viabilidade celular também pode ser avaliada pelo método de exclusão do corante azul de tripan (CARVALHO et al., 2012), um ensaio quantitativo (TYNGA et al., 2013) que baseia-se no fato de células viáveis possuírem membranas celulares intactas e não absorverem o corante, que se difunde apenas em células que estejam com a membrana danificada (ABO-ZEID et al., 2013). Tendo em vista que o ensaio do MTT e o método de exclusão do corante azul de Tripan investigam alterações celulares distintas, o uso de ambos permite avaliar a citotoxicidade celular, de acordo com os diferentes tipos de danos celulares (KIM et al., 2009). Entretanto, em nenhuma destas técnicas é possível distinguir se o mecanismo de morte celular ocorre por apoptose ou por necrose.

Para este fim, recomenda-se o uso da citometria de fluxo, mediante o emprego dos corantes Anexina-V e iodeto de propídio (PI) (MOTOMURA et al., 2008). A Anexina-V identifica células que estão em fases iniciais ou tardias de apoptose. Já o PI marca células que se encontram em fase tardia de apoptose e células que sofreram necrose (AWALE et al., 2008).

Além dos ensaios citados, a avaliação morfológica das células é uma importante ferramenta para investigar as alterações decorrentes da citotoxicidade (SULAIMAN et al., 2012). A partir desta análise, é possível observar alterações nucleares e de membrana celular (CHARRAS et al., 2008).

Em estudo prévio realizado por esta equipe, foi observado que o tratamento de células da linhagem J774 de murinos incubadas com os extratos de própolis (800, 400, 200 e 100 µg/mL) induziu alterações em membrana celular, constatadas por microscopia óptica e eletrônica, levando ao desencadeamento de mecanismos de morte celular, compatíveis com necrose. Apesar destas alterações, nos grupos tratados com extratos de própolis, foi verificado aumento da redução do MTT, de maneira dose dependente. Estes dados são inversos ao esperado, pois, em circunstância de morte celular, deveria ocorrer diminuição da redução do MTT. Tais resultados demonstram a importância de integração de diferentes testes para a avaliação do potencial antitumoral de um produto.

Sendo assim, como continuidade da pesquisa, o presente estudo visou integrar diferentes ensaios biológicos com o intuito de avaliar o potencial antitumoral da própolis sobre cultura celular de melanoma murinho K1735. Como forma de investigar a possível variabilidade de efeitos existentes nas amostras de própolis de diferentes localizações geográficas, utilizaram-se três amostras, sendo uma proveniente do município de João Pessoa – PB e duas do município de Ilhéus-BA, porém extraídas de

localidades com vegetações distintas. Foram realizadas análises físico-químicas destas amostras, cujos resultados deram subsídios para a interpretação dos testes biológicos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Objetivou-se avaliar o potencial antitumoral de três extratos de própolis, uma do município de João Pessoa-PB e duas do município de Ilhéus-BA, sobre cultura celular de melanoma murino K1735, mediante o emprego de diferentes ensaios biológicos *in vitro*.

Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial do uso de extratos de própolis como agente antitumoral;
- Avaliar a viabilidade celular/citotoxicidade celular, após tratamento com extratos de própolis de João Pessoa-PB e Ilhéus-BA, comparando e integrado os resultados obtidos pelo ensaio do MTT e azul de Tripán;
- Determinar o IC₅₀ de cada um dos três extratos de própolis, mediante os dados obtidos no ensaio do MTT;
- Avaliar o mecanismo de morte celular, a partir da marcação dos corantes Anexina V e Iodeto de propídio, por citometria de fluxo
- Realizar a análise morfológica das células tratadas através da microscopia ótica e microscopia de contraste de fase;
- Avaliar comparativamente os resultados obtidos nos ensaios biológicos em que foram testados extratos de própolis de municípios distintos (Ilhéus-BA e João Pessoa-PB) que apresentam similaridade de vegetação; e entre própolis de um mesmo município (Ilhéus-BA), porém coletadas em locais com vegetações distintas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A PRÓPOLIS: COMPOSIÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A própolis é um produto natural elaborado pelas abelhas, a partir da coleta de substâncias resinosas e gomosas de espécies vegetais (CHEN et al., 2007), sendo também incorporadas secreções salivares e cera (SALATINO et al., 2005; LÓPEZ et al., 2014). A própolis possui odor agradável e sua cor varia de amarelo-esverdeado a castanho escuro, dependendo da sua fonte (BANSKOTA et al., 2000).

A etimologia da palavra própolis é de origem grega, cujo prefixo pro = em defesa ou diante de; e polis = cidade. Desta maneira, a palavra reflete sua importância para as abelhas (BANKOVA et al., 2000) que a utilizam para selar aberturas da colmeia, impermeabilizando as paredes, protegendo contra invasores e servindo como isolante térmico. É utilizada também para embalsamar insetos, impedindo a proliferação de bactérias e de fungos no interior da colmeia (SALATINO et al., 2005).

A própolis possui odor agradável e sua cor varia de amarelo-esverdeado a castanho escuro, dependendo da sua fonte (BANSKOTA et al., 2000).

Alguns autores consideram “própolis” como um termo genérico, uma vez que os aspectos físico-químicos deste produto variam segundo as fontes botânicas visitadas pelas abelhas que, por sua vez, variam segundo a localização geográfica e época do ano em que a mesma foi coletada (TAGLIACOLLO; DE OLIVEIRA ORSI, 2011).

Assim, a própolis de origem brasileira tem composição bastante diferente das própolis de outros países (AHN et al., 2007; KASOTE et al., 2014). E mesmo no Brasil, devido à vegetação altamente diversificada, há variações substanciais nas amostras de própolis. Considerando estas diferenças, amostras de própolis brasileiras foram agrupadas, de acordo com suas características físico-químicas. Em uma das classificações existentes, considerou-se a presença de compostos químicos (marcadores), identificados e quantificados pelo método de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em 200 amostras de própolis de diferentes localizações geográficas do país. A partir daí, estas foram agrupadas em três grupos principais, denominados BRP, tipo que aparece nos Estados da região sudeste, incluindo São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro; o tipo BRG que aparece nos estados mais do sul do Brasil, como Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e o tipo BRPG, que é uma mescla dos dois tipos anteriores (MARCUCCI et al., 2006). A segunda classificação,

levou em consideração um maior número de amostras de própolis, representativas de diversas regiões do país, e estas foram agrupadas em 13 tipos (PARK et al., 2000; DAUGSCH et al., 2008).

Ressalta-se que é frequente que amostras de própolis brasileiras sejam referidas segundo a sua coloração em “própolis verde”, “própolis vermelha” ou “própolis marrom”. Entretanto, a coloração constitui-se como uma característica física e não determina, necessariamente, as características químicas. Este fato confirma a necessidade de avaliar adequadamente a composição química das amostras (LÓPEZ et al., 2014).

Banskota et al. (2000) relataram que mais de 300 diferentes compostos podem ser encontrados na própolis. Ela é composta principalmente por ácidos fenólicos ou os seus ésteres, flavonóides, terpenos, aldeídos aromáticos e álcoois, ácidos graxos, estilbenos e β -esteróides. Os flavonóides geralmente representam os principais componentes das própolis, porém, quando a própolis brasileira é considerada, destacam-se os ácidos fenólicos (GARDANA et al., 2007), exceto as amostras de própolis vermelha do nordeste, pois possuem altos teores de flavonóides (TRUSHEVA et al., 2006). O Artepillin C é um ácido fenólico e é encontrado especificamente nas própolis brasileiras, tendo conhecida atividade supressora da angiogênese tumoral. Além deste composto, a própolis do Brasil também é rica em *p-coumaric*, encontrado apenas neste país. Essa variedade de compostos é a razão pela qual é muito importante o estudo da composição da própolis de diferentes regiões (DIAS et al., 2012), além disso, pesquisadores têm investigado alguns compostos isolados presentes na própolis que possam ser os responsáveis pela sua ação (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A principal fonte botânica que tem sido utilizada pelas abelhas para a produção da própolis brasileira, principalmente da própolis verde, é a *Baccharis dracunculifolia*, encontrada principalmente nos Estados do Sudeste (AHN et al., 2007) e Sul do país, porém, outras espécies de plantas também são utilizadas pelas abelhas para a produção de própolis. No Brasil, existem diversas espécies vegetais para a retirada de resina. No entanto, poucas foram as espécies identificadas até agora, mas o assa-peixe, aroeira, alecrim e eucalipto são alguns exemplos de vegetais onde as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis (BANKOVA et al., 2000). A própolis verde tem sido extensivamente estudada (JORGE et al., 2008; DA SILVA FROZZA et al., 2013), porém não fez parte do nosso estudo.

A própolis vermelha brasileira foi nomeada como o 13º tipo de própolis e é encontrada no nordeste do Brasil. Devido aos seus exsudatos resinosos vermelhos, a *Dalbergia ecastophyllum*, principalmente, e outras plantas do gênero *Dalbergia* tem sido indicadas como a principal responsável por esta coloração e como fonte botânica deste tipo de própolis (AWALE et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; DA SILVA FROZZA et al., 2013). Este tipo difere dos demais por apresentar em sua composição isoflavonas, e outros compostos não descritos anteriormente (ALENCAR et al., 2007).

A própolis vermelha tem sido uma importante fonte de investigação desde 2007, por grupos de pesquisa nacionais e internacionais, principalmente devido ao seu efeito antitumoral (ALENCAR et al., 2007; LI et al., 2008; XUAN et al., 2011; DA SILVA FROZZA et al., 2013). Em relação às diferenças na composição química, Franchi Jr. et al. (2012) relataram que a própolis vermelha é mais citotóxica do que o tipo verde em linhas celulares de leucemia. Vários estudos já demonstraram seu potencial citotóxico sobre diversas linhagens tumorais (AWALE et al., 2008; NOVAK et al., 2014). Ainda que tenham sido realizadas pesquisas avaliando as atividades biológicas de própolis vermelha de municípios do nordeste, torna-se interessante a realização de um estudo comparativo entre a própolis de diferentes municípios, bem como de amostras distintas de um mesmo município.

Além da cor, a dose, os veículos utilizados para a extração dos compostos e o tipo de própolis interferem na sua atividade antitumoral (KUMAZAWA et al., 2004; AHN et al., 2007). Cenić-Milošević et al. (2014) observaram que o extrato de própolis apresentou um fraco efeito citotóxico contra células HeLa e isso pode ter ocorrido devido ao uso de uma baixa concentração de própolis extraída em solventes fracamente polares ou devido à época de colheita da própolis.

A própolis não deve ser utilizada na forma bruta, deve ser purificada por extração com solvente para remover o material inútil e preservar a fração polifenólica ativa. A extração com etanol, como solvente, é a forma mais frequentemente utilizada (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006), porém uma alternativa é o extrato de própolis obtido com óleo vegetal comestível. Ambos os extratos são eficazes na inibição do crescimento tumoral *in vitro* (CARVALHO et al., 2011), porém é possível proceder à extração dos compostos da própolis com diferentes solventes (ALENCAR et al., 2007) e estudos têm sido realizados comparando-os. Banskota et al. (2000) compararam o efeito citotóxico de extratos metanólicos e extratos aquosos de própolis brasileira, sendo que o primeiro foi mais eficaz contra carcinomas.

Em relação às dosagens, deve-se utilizar nos estudos pelo menos três doses variadas, pois isso é necessário para o estabelecimento de curvas de dose-resposta representativas (COS et al., 2006). Alguns autores utilizam doses iniciais altas e outros doses mais baixas, pois não existe uma dose ideal pré-estabelecida. Xuan et al. (2011) utilizaram as doses de 12,5, 25 e 50 µg/mL para avaliar a indução de apoptose em células endoteliais humanas HUVEC. Awale et al. (2008) utilizaram a dose de 10 µg/mL e obteve excelente atividade citotóxica em meio privado de nutrientes. Em contrapartida, Seda Vatansever et al. (2010) utilizaram extratos de própolis nas concentrações de 500, 250, 125 e 63 µg/mL em células de carcinoma.

As atividades biológicas da própolis são diversas. Própolis encontradas em vários estados do Brasil e em outros países tem conhecida atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (DIAS et al., 2012; NEDJI; LOUCIF-AYAD, 2014), hepatoprotetora (BANSKOTA et al., 2001), anti-inflamatória, imunomoduladora (WATANABE et al., 2011) e antiviral contra o vírus influenza (KAI et al., 2014) e o herpes simples (BANKOVA et al., 2014).

3.1.1 A atividade antitumoral da própolis do Brasil e principais ensaios biológicos empregados *in vitro*

Além dessas atividades, a própolis constitui, excepcionalmente, uma excelente fonte de antioxidantes naturais e agentes quimiopreventivos, ou seja, que impedem, paralisam ou revertem o processo de carcinogênese (LINK et al., 2010; VALENTE et al., 2011). Sabe-se que o estresse oxidativo tem um papel importante na iniciação e progressão do câncer (CARVALHO et al., 2012) e a própolis tem demonstrado exercer efeito protetor contra vários tipos de carcinomas (VALENTE et al., 2011). Estudos comprovam que a própolis vermelha brasileira possui atividade antioxidante e é capaz de inibir o crescimento de células cancerosas (ALENCAR et al., 2007; DA SILVA FROZZA et al., 2013). Ela pode ser utilizada como um medicamento preventivo contra o estresse oxidativo e danos às moléculas celulares e membranas, mantendo assim a integridade estrutural e funcional das células (VALENTE et al., 2011).

A própolis tem sido usada durante séculos pela humanidade, mas só nos últimos quarenta anos é que tem aumentado o interesse científico por estudá-la (MARTINEZ, 2011) devido às diversas propriedades biológicas e principalmente a atividade antitumoral (SAWICKA et al., 2012), outra função biológica importante da própolis. A

perspectiva de utilização de produtos naturais para criar um tratamento mais seletivo e eficaz contra o câncer é uma realidade, uma vez que a própolis e seus compostos além de possuir forte potencial antitumoral (CHAN et al., 2013), também tem baixa citotoxicidade contra células normais, sendo seletiva contra as células malignas. A seletividade é uma questão importante na prevenção e tratamento do câncer (DA SILVA FROZZA et al., 2013; VALENTE et al., 2011). Desta forma, a própolis tem sido considerada como um dos mais promissores produtos usados na quimioprevenção (ORSOLIC et al. 2005) e tratamento antitumoral.

A própolis tem se mostrado eficaz contra vários tipos de células tumorais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Apesar de existirem poucos estudos sobre citotoxicidade de extratos de própolis em cultivo de melanomas na literatura, vários trabalhos clínicos demonstram sua eficácia em outras linhagens tumorais como GRUNBERGER et al. (1988); MATSUNO et al. (1997); BANSKOTA et al. (1998); BANSKOTA et al. (2000); PARK et al. (2000); AKAO et al. (2003); CHEN et al. (2004); LEE et al. (2005); ORSOLIC et al. (2005); ORSOLIC et al. (2006); LI et al. (2007); NAJAFI et al. (2007); AWALE et al. (2008); DÍAZ-CARBALLO et al. (2008); INOUE et al. (2008); LI et al. (2008) e BÚFALO et al. (2009) . A maior parte desses trabalhos refere-se à ação da própolis de diferentes regiões do Brasil e do mundo, dessa maneira, observa-se como produtos naturais continuam a ser um recurso inestimável para a descoberta de drogas antineoplásicas (PAN et al., 2010), aumentando a sua busca a cada ano.

O processo de carcinogênese apresenta vários estágios incluindo a iniciação, a promoção e a progressão do tumor. Assim, o alvo de muitas pesquisas tem sido a descoberta de compostos naturais ou sintéticos que possam prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (ORSOLIC et al., 2005). Estudos são realizados no sentido de testar o efeito quimioterápico de produtos naturais, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento das neoplasias malignas, utilizando metodologias *in vitro* (LUO et al., 2001) e modelos experimentais de indução de carcinogênese em roedores (KAVITHA & MANOHARAN, 2006).

Entretanto, estudos ainda são necessários para elucidar os benefícios da própolis em relação as suas atividades antitumorais (WATANABE et al., 2011). Muitos destes estudos têm sido realizados utilizando própolis originárias do Brasil como Banskota et al. (2000) que avaliaram atividades biológicas de nove tipos de própolis, dentre as quais seis eram brasileiras e de diferentes origens. Ao avaliarem o efeito do extrato metanólico das própolis brasileiras, através do ensaio MTT, observaram que todos

exerceram atividade citotóxica, *in vitro*, contra células 26-L5 de carcinoma de cólon de murino, apresentando IC₅₀ que variava de 14,3-56,4 mg/mL e contra células HT-1080 de fibrossarcoma humano, apresentando IC₅₀ entre 12,5-65,6 mg/mL. Em células de eritroleucemia K562 observou-se atividade citotóxica e morte causada por necrose quando tratadas por 24h com extrato etanólico de uma própolis brasileira originária do Mato Grosso do Sul e posteriormente avaliadas por citometria de fluxo (CAMPOS et al., 2014).

Um estudo também foi realizado utilizando própolis brasileira coletada em Minas Gerais e ao utilizarem o extrato etanólico em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), observaram que houve supressão da angiogênese, inibindo a proliferação das células tumorais de forma dependente da concentração (3,13-50 µg/mL), tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa inibição da formação de novos vasos foi relacionado ao Artepillin C, importante componente da própolis brasileira (AHN et al., 2007).

Chen et al. (2007) relataram que os flavonóides e ácidos fenólicos, extraídos da própolis brasileira através de água quente pressurizada, suprimiu fortemente o crescimento de células de leucemia (HL-60, U937), câncer de pulmão (A549, Ch27) e do câncer de fígado (Hep G2, Hep 3B) de modo dependente da concentração (1-60 µg/mL) utilizando os testes de exclusão do corante azul de tripan e citometria de fluxo para a avaliação da viabilidade celular e o tipo de morte celular, respectivamente. Com o mesmo objetivo de verificar o tipo de morte celular utilizando a citometria de fluxo, Awale et al. (2008) relataram que o extrato de própolis vermelha da Paraíba inibiu 100% das células de câncer pancreático humano PANC-1 a uma concentração de apenas 10µg/mL, em condições de baixo estado de nutrição, ocasionando morte por necrose.

Observa-se assim que diferentes ensaios biológicos podem ser utilizados para a avaliação do potencial citotóxico *in vitro*. Alguns desses podem ser utilizados para a estimativa de um mesmo parâmetro (ex.: citotoxicidade) e outros para complementar a informação sobre os mecanismos que os eventos ocorreram (ex.: avaliação da morfologia celular). Portanto, a compreensão dos ensaios utilizados é de fundamental importância para a interpretação dos resultados. Existem vários ensaios *in vitro* atualmente disponíveis para a avaliação da citotoxicidade/viabilidade das células (KIM et al., 2009) e são amplamente utilizados (HAMID et al., 2004), dentre estes se destacam o ensaio MTT e o método de exclusão do corante azul de tripan. A avaliação morfológica através de diversos tipos de microscopia também é importante para que se

identifiquem as alterações estruturais que ocorreram nas células. E, a fim de se conhecer qual o mecanismo de morte celular causado pelo tratamento com própolis, geralmente utiliza-se a citometria de fluxo.

3.1.1.1 Ensaio 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Ensaio, como o de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), são ensaios baseados em células utilizados para o rastreamento de compostos a fim de determinar se eles têm efeitos sobre a proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos que conduzem eventualmente à morte celular (RISS et al., 2004). O MTT é um corante amarelo, solúvel em água (VALENTE et al., 2011). Nesse ensaio avalia-se a capacidade da célula tumoral metabolicamente ativa (viável) reduzir o sal de tetrazólio (MTT) a cristais de formazan insolúveis de coloração violeta (KOUIDHI et al., 2010), que se acumula dentro da célula em gotículas lipídicas (STOCKERT et al., 2012).

Neste tipo de ensaio é importante saber quantas células remanescentes são viáveis no fim do experimento. Sob a maioria das condições de cultura, a incubação das células viáveis com o tratamento irá resultar na geração de um sinal que é proporcional ao número de células vivas presentes. Quando as células morrem, elas rapidamente perdem a capacidade de converter o MTT para cristais de formazan colorido, portanto, a cor serve como um marcador útil das células viáveis (RISS et al., 2004). Trata-se de um ensaio colorimétrico (KOUIDHI et al., 2010) medindo a cor a partir da absorvância da solução a 570nm. Usando placas de microtitulação de 96 poços e um espectrofotômetro de poços múltiplos este ensaio pode ser semi-automático, para processar um grande número de amostras e proporcionar uma medição rápida do número de células (POZZOLINI et al., 2003).

A maioria dos autores sugerem que quem realiza a redução do MTT é a enzima mitocondrial succinato desidrogenase (VALENTE et al., 2011), outros atribuem a redução a coenzimas nicotinamida. Entretanto, está amplamente difundido que a quantidade de cristais de formazan é diretamente proporcional ao número de células vivas e que o ensaio é um indicador apropriado da função mitocondrial. Porém isto vem sendo questionado, pois as mitocôndrias não mostram redução de propriedades, mas sim o poder oxidante. O uso de redução de MTT como um ensaio direto da atividade mitocondrial seria apenas um método indireto (STOCKERT et al., 2012).

O ensaio de MTT foi desenvolvido por Mosmann em 1983. A técnica original apresentou várias limitações técnicas, como por exemplo, uma baixa solubilidade do produto. Posteriormente, modificações foram realizadas e a confiabilidade e sensibilidade do ensaio foram aumentadas. A eliminação do meio contendo MTT passou a ser realizada após a reação, assim como a utilização de propranol puro ou etanol para solubilizar o formazan rapidamente (DENIZOT; LANG, 1986). Estudos desenvolvidos para testar a confiabilidade do ensaio de MTT na linha celular de macrófagos ativados, confirmaram haver interferência do metabolismo de macrófagos ativados na redução do MTT, levando a sobreavaliação do número de células (POZZOLINI et al., 2003). Além disto, como o teste do MTT é reduzido por enzimas mitocondriais, é recomendada cautela em atribuir a diminuição de viabilidade devida unicamente ao dano mitocondrial (GONZALEZ; TARLOFF, 2001).

Além destes, outro ponto negativo do ensaio de MTT é que este ensaio pode levar a resultados falso-positivos (ROLLINO et al., 1995). Este fato também foi observado ao se testar compostos naturais com potencial redutivo intrínseco. Ao avaliar os efeitos de kaempferol sobre o número de células de câncer de mama e observada a viabilidade celular através do ensaio de MTT, resultados conflitantes foram obtidos. O número de células diminuiu, mas a formação de formazan aumentou, sugerindo uma interação direta do kaempferol com a redução do MTT. Um potencial redutor direto foi observado em um sistema livre de células para o kaempferol, resveratrol e extratos de *Hypericum perforatum L.* e *Cimicifuga racemosa L.* Todos os agentes levaram à formação instantânea de formazan azul escuro na ausência de células. Além disso, os antioxidantes tais como ácido ascórbico, vitamina E e N-acetilcisteína interferiram com o ensaio de MTT. Quando células MCF-7 e HS578 tratadas com o kaempferol foram lavados antes da adição de MTT, a redução direta de corante foi reduzida significativamente (BRUGGISSER et al., 2002).

Apesar de relatos de alguns pontos falhos, o MTT ainda é um dos ensaios mais amplamente utilizados e consiste em um ensaio simples, sensível, rápido e de baixo custo (DA SILVA FROZZA et al., 2013) e já foi aplicado em vários estudos avaliando a atividade de extratos de própolis (AHN et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; AWALE et al., 2008; DA SILVA FROZZA et al., 2013).

O ensaio de MTT permite que seja identificado o valor de IC₅₀ (concentração inibitória) através de curvas de dose-resposta e para isso quanto maior o número de doses testadas mais fácil fica determinar este valor. Para que um extrato tenha uma

atividade relevante e seletiva, os valores de IC_{50} devem estar abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ (COS et al., 2006) e quanto menor o valor encontrado mais citotóxico é o extrato. Alencar et al. (2007) verificaram o efeito citotóxico do extrato etanólico de própolis vermelha brasileira, proveniente do estado de Alagoas, sobre linhagens de células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), com valor de IC_{50} de apenas 7,45 $\mu\text{g/mL}$, em contrapartida, Da Silva Frozza et al. (2013) verificaram ação citotóxica de própolis vermelha, proveniente do estado do Rio Grande do Sul, com IC_{50} aproximada de 80 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, existem estudos que encontram valores de IC_{50} bem acima de 100 $\mu\text{g/mL}$, principalmente após 24 horas de exposição aos extratos, quando aumentam o tempo de exposição ao tratamento frequentemente tem sido observado redução do valor de IC_{50} (MENEGHELLI et al., 2013).

3.1.1.2 Método de exclusão do corante Azul de Tripán

A viabilidade celular também pode ser avaliada pelo método de exclusão do corante azul de tripan (CARVALHO et al., 2012), um ensaio quantitativo (TYNGA et al., 2013), baseado no fato de que as células viáveis possuem membranas celulares intactas e não absorvem o corante azul de tripan, que é carregado negativamente. Este corante não reage com células íntegras, que não estejam com a membrana danificada (ABOZEID et al., 2013). As células viáveis, como não absorvem o corante, mantêm uma aparência clara sob o microscópio, enquanto as células não viáveis danificadas são coradas de azul, pois absorve o corante (TYNGA et al., 2013).

Em comparação com o ensaio de exclusão de azul de tripan, o ensaio de MTT prevê imprecisamente a toxicidade celular, principalmente nas condições em que as células cultivadas aumentem a formação de superóxidos (WANG et al., 2011). Quando as células são tratadas com fatores de stress oxidativo exógenos e endógenos, a redução do MTT é sensível a uma mudança para um ambiente celular mais oxidante dentro de um intervalo estreito, sendo este efeito aumentado de uma forma linear, dependente da dose de extratos. O método de exclusão do corante azul de tripan é útil para a avaliação da necrose e da morte celular por apoptose, em células com danos na membrana. Já no ensaio de MTT, não há perda da integridade da membrana (KIM et al., 2009).

O grau de citotoxicidade deve ser determinado usando, pelo menos, dois métodos experimentais, incluindo o ensaio de exclusão de azul de tripan para avaliar os danos da

membrana celular e o ensaio de MTT para verificar a mudança de redução celular, pois não existe qualquer correlação entre os dois ensaios. Coletivamente, os resultados permitiriam avaliar discriminativamente citotoxicidade celular, de acordo com os vários tipos de danos celulares (KIM et al., 2009). Deve-se ressaltar ainda, que a fim de evitar a sobreavaliação ou subestimação da toxicidade de uma substância, incubações com várias concentrações avaliadas em vários momentos diferentes são necessários para ser capaz de distinguir entre os efeitos sobre organelas específicas ou citotoxicidade geral (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

3.1.1.3 Citometria de Fluxo

Uma técnica que pode ser empregada para distinguir entre o processo de morte celular, se ocorre por apoptose ou necrose, é a citometria de fluxo. Para tanto, são empregados os corantes Anexina-V e iodeto de propídio (PI). A Anexina-V identifica a externalização de fosfatidilserina, que ocorre durante a progressão da apoptose (MOTOMURA et al., 2008). Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Na apoptose a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V (PERES; CURI, 2005). Sendo assim, a Anexina-V identifica células que estão em fases iniciais ou tardias de apoptose. Já o PI, produz marcação em células que se encontram em fase tardia de apoptose, e células que sofreram necrose. Depois de coradas, podem ser analisadas por microscopia de fluorescência (AWALE et al., 2008) ou contadas por um citômetro de fluxo.

Os citômetros de fluxo analisam as células em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O princípio da citometria de fluxo se baseia no fato de que, quando a luz da fonte de excitação incide nas partículas em movimento, a luz é desviada e ocorre emissão de fluorescência. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro (PERES; CURI, 2005).

O papel de uma substância citotóxica está relacionado com a inibição do crescimento celular e proliferação, afetando a viabilidade das células por desencadeamento da morte celular (CARVALHO et al., 2012). Além dessa inibição, a própolis pode induzir a morte de células de câncer por apoptose (LI et al., 2008) e também por necrose (CAMPOS et al., 2014), porém, ainda não foi claramente

demonstrado quais os mecanismos responsáveis pela apoptose em células de tumores tratados com própolis (SEDA VATANSEVER et al., 2010). Alguns autores sugerem que a própolis induz a diferenciação granulocítica (MISHIMA et al., 2005), induz um encurtamento crítico do telômero inibindo a expressão da telomerase (GUNDUZ et al., 2005), induz a parada do ciclo celular (WU et al., 2011) e atua por meio da via da caspase (SEDA VATANSEVER et al., 2010), principalmente a caspase-3 (MOTOMURA et al., 2008), induzindo assim a apoptose. A morte por necrose é interessante na terapia antitumoral, pois algumas células são resistentes à morte por apoptose e isso geralmente ocorre com o uso da quimioterapia convencional e terapia de radiação (GU et al., 2012).

O mecanismo de apoptose induzida por própolis pode ser dependente do tipo de substâncias e da concentração do extrato (SAWICKA et al., 2012), geralmente a resposta é dose dependente. Maiores concentrações de própolis apresentam uma ação de curto prazo, ao passo que as suas menores concentrações são eficazes com o tempo (KOUIDHI et al., 2010). Células apoptóticas são detectadas com a utilização de baixas concentrações de extratos de própolis. Quando as células são tratadas com altas concentrações de extratos de própolis, morrem por meio da via necrótica, antes da ativação da via apoptótica. A dosagem de extratos de própolis pode, portanto, ser importante no planejamento do tratamento ideal (SEDA VATANSEVER et al., 2010).

Em relação às formas de administração da própolis *in vivo*, em um recente estudo, a administração oral de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha brasileira teve um efeito modulatório significativo na formação, diferenciação e progressão de um carcinoma de células escamosas (PINHEIRO et al., 2014). De Melo et al. (2015) verificaram que a administração oral de extrato de própolis vermelha brasileira inibiu significativamente carcinomas de células escamosas orais, comprovando sua atividade quimiopreventiva. A administração oral de própolis, em ratos portadores de tumor, não causou nenhuma toxicidade detectável e foi associada com a diminuição de células mitóticas reduzindo o crescimento tumoral, evidenciando o efeito benéfico da própolis na dieta de pacientes que recebem terapias anticancerígenas (SULAIMAN et al., 2012).

O uso de extratos de própolis é economicamente importante, pois permite um tratamento de câncer relativamente barato (SEDA VATANSEVER et al., 2010; WATANABE et al., 2011). E, por ter boa biodisponibilidade por via oral e um bom histórico de segurança, a própolis se faz um agente adjuvante ideal para futuras terapias imunomoduladoras e anticancerígenas. No entanto, controles padronizados de qualidade

e ensaios clínicos são essenciais antes que a própolis ou seus ingredientes ativos sejam adotados rotineiramente como terapia (CHAN et al., 2013).

3.1.1.4 Avaliação morfológica das células

A apoptose é um mecanismo de morte celular que causa alterações morfológicas típicas na célula, como por exemplo, a condensação da cromatina nuclear e fragmentação do DNA. Uma das formas de se observar tais alterações é através de microscopia de fluorescência (MISHIMA et al., 2005), porém recomenda-se a observação através de microscopia eletrônica, já que uma das melhores características do processo apoptótico é a manutenção da integridade de organelas, especialmente a da mitocôndria (PERES; CURI, 2005). Essas alterações morfológicas características de apoptose podem ser causadas pelo tratamento com própolis (MOTOMURA et al., 2008). Em contrapartida, as alterações morfológicas que caracterizam a ocorrência de necrose incluem aumento do tamanho das células, devido ao aumento do citoplasma que leva a perda da integridade da membrana, ruptura celular e das organelas, particularmente das mitocôndrias, liberação de conteúdo celular e aparecimento de vacúolos. Nas etapas finais de necrose, quando todas as organelas se desfazem, as células ficam com aspecto diáfano e são chamadas de *ghost cells* (células-fantasmas), havendo rompimento total da célula (PERES; CURI, 2005). A avaliação morfológica é importante para avaliar se os efeitos citotóxicos foram relacionados com apoptose ou necrose (SULAIMAN et al., 2012).

Células não tratadas com extrato geralmente crescem como colônias, apresentam morfologia irregular e são homogeneamente coradas, com o citoplasma menos corado do que o núcleo e nucléolo bem visível. Por outro lado, quando as células são expostas a tratamentos com extratos, encolhem, tornam-se arredondadas e individualmente separadas, com a membrana citoplasmática enrugada e condensação nuclear (CARVALHO et al., 2012).

A forma da célula animal é controlada principalmente pelo córtex actomiosina, uma rede fina do citoesqueleto, que se situa imediatamente abaixo da membrana do plasma. O córtex regula a morfologia das células controlando muitos processos morfogenéticos, incluindo a divisão celular e migração (CLARK et al., 2013).

Os *blebbings* de membranas são saliências esféricas celulares que se expandem e retraem da superfície de uma célula. Podem ser formados em decorrência de um

processo apoptótico ou necrótico (CHARRAS et al., 2008). A expansão dos *blebbings* é conduzida por pressão hidrostática intracelular gerada no citoplasma pelo córtex contrátil actomiosina (PALUCH; RAZ, 2013) e serve como uma estratégia potencial para migração de células tumorais (SEKYROVA et al., 2012).

3.2 CULTURA CELULAR E CÉLULAS K1735

O cultivo de células se iniciou no início do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Essa técnica ainda é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

No organismo, a célula faz parte de uma estrutura que mantém contato com diversos tipos celulares que interferem na manutenção de um microambiente não completamente reproduzido em cultura. Por este motivo, o uso de culturas celulares como ferramenta de estudo das funções celulares ou do comportamento celular em condições que simulam uma determinada situação, tem sido frequentemente criticado. Por outro lado, é muito válido dispor de um sistema livre de interferências externas, que permita a investigação de uma única variável de forma precisa. Para isso, o cultivo de células é bastante indicado (PERES; CURI, 2005). Além disso, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Atualmente, a cultura celular é reconhecida e amplamente utilizada como modelo de estudos *in vitro* isoladamente ou em conjunto com ensaios *in vivo*. Esta técnica tem sido utilizada em estudos de biologia celular, bioquímica, interação com agentes patológicos e em testes de investigação de algum composto de interesse. Ensaios de citotoxicidade são de suma importância à indústria farmacêutica, empregados no desenvolvimento de potenciais fármacos (ZUCCO et al., 2004).

As linhagens celulares podem ser classificadas em dois tipos, linhagens aderentes ou em suspensão. As primeiras dependem da fixação à base dos frascos ou placas de cultura para se proliferarem e representam a grande maioria das linhagens em estudo. Já as linhagens em suspensão, como o próprio nome sugere, conseguem se

proliferar em suspensão. As culturas de células aderidas ou em suspensão podem ser classificadas como primária ou permanente. As culturas primárias originam-se de células recentemente isoladas de tecidos e possuem tempo limitado de vida em cultura, são chamadas culturas finitas. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de células *in vitro* devido à presença de suas características genotípicas e fenotípicas. Já as linhagens ditas permanentes, imortais ou contínuas têm a capacidade ilimitada de crescimento em cultura. Essas linhagens são derivadas de células tumorais ou de células que foram infectadas com oncogenes ou tratadas com carcinogênicos e ainda guarda grande parte das características do tecido original. No momento em que as características genéticas das células são modificadas, elas deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original e são então chamadas células transformadas. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta (PERES; CURI, 2005; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Melanomas são tumores agressivos de melanócitos, células que produzem pigmento, e ocorrem principalmente na pele. Este tipo de neoplasia pode apresentar diversos graus de pigmentação melânica, apresentando uma pigmentação marrom sutil ou total ausência (melanomas amelanocíticos), geralmente dificultando o diagnóstico clínico e patológico (YEŞIL et al., 2007; CHOI et al., 2013).

A célula K1735 é uma linhagem de célula de melanoma amelanocítico metastático, muito agressivo e invasivo, uma doença maligna, de prognóstico muito ruim se não for detectada a tempo e apresenta resistência à quimioterapia convencional (SERAFIM et al., 2008).

Muitas linhagens foram estabelecidas pelos pesquisadores do mundo inteiro, pois, atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*. Seu uso se estende cada vez mais na medicina, pois células em cultivo tem importante papel quando utilizadas no tratamento de doenças degenerativas, além de possibilitar estabelecimento de novos tratamentos, a partir de ensaios com novas drogas e da determinação de dosagens adequadas para a seletiva destruição de células tumorais (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Propõe-se neste estudo, a avaliação da atividade antitumoral de duas amostras de própolis vermelha e uma amostra de própolis marrom, provenientes do nordeste brasileiro, em células da linhagem K1735 de murinos, que são células de cultura

permanente e aderentes, comparando-se o efeito de seus extratos etanólicos em diferentes concentrações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

- Amostras de própolis

As amostras de própolis foram adquiridas de três apiários da região nordeste do Brasil, sendo uma proveniente do município de João Pessoa-PB e duas do município de Ilhéus-BA (Tabela 1). Após a aquisição das amostras, estas foram acondicionadas em recipiente de vidro, com tampa rosqueada, e armazenadas ao abrigo da luz e sob refrigeração.

Tabela 1. Amostras de própolis que foram utilizadas, segundo sua localização geográfica e característica de coloração.

Código	Amostra	Localização Geográfica
Amostra 1	Própolis vermelha	Apiário Edimel, João Pessoa-PB
Amostra 2	Própolis vermelha	Apiário Produtor José Carlos, Ilhéus-BA
Amostra 3	Própolis marrom	Apiário Etron, Ilhéus-BA

Em trabalho anterior deste grupo de pesquisa realizado por Batista (2013) foram avaliadas as características organolépticas das mesmas amostras de própolis utilizadas neste experimento e se encontram apresentadas em anexo (ANEXO I).

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS

Para o preparo dos extratos de própolis, pesou-se 20g de cada amostra bruta de própolis, previamente trituradas, e cada uma foi dissolvida em uma solução de 190 ml de etanol 95% PA e 10 ml de água destilada, em um balão volumétrico. Essas amostras foram colocadas sob agitação, durante sete dias, envolvidas com papel alumínio para proteger da incidência de luz, à temperatura de 30° C e velocidade de 150 rpm (rotações por minuto), numa Incubadora Refrigerada Shaker de Bancada, modelo CT712RN da

Cientec. Após esse período, os recipientes foram acondicionados em freezer, por 24 horas, e em seguida filtrados com papel filtro, para retirada do excesso de cera da própolis. Esse procedimento foi repetido no dia seguinte. Após esse processo de filtragem, as amostras foram transferidas para um béquer de boca larga, onde permaneceram por 24 horas em banho maria à 50° C, para evaporação do solvente (álcool). Posteriormente, utilizou-se o equipamento rotoevaporador, da marca Fisaton, modelo 550, sob temperatura e pressão controladas, para a remoção do solvente residual. Após estes dois processos, as amostras permaneceram por uma semana à temperatura ambiente até alcançar a evaporação completa do solvente. Este extrato seco permaneceu armazenado no freezer, protegido da luz, para posterior utilização.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DE PRÓPOLIS E SOLUÇÃO DE USO

A partir dos extratos secos foram preparadas soluções estoque, de cada uma das três amostras de própolis, utilizando como veículos etanol ou DMSO. Para o preparo dos extratos, respeitou-se a concentração final máxima para que o veículo não produzisse toxicidade, sendo estas de $\leq 0,5\%$ para o etanol (MENEGHELLI et al., 2013) e de $\leq 0,08\%$ para o DMSO (VALENTE et al., 2011). Foi pesado 0,5g de extrato de própolis e diluído em 1 mL dos veículos etanol ou DMSO, para o preparo da solução estoque. Cada solução estoque preparada foi dividida em alíquotas de 200 μ L em eppendorfs previamente autoclavados, identificados e que foram armazenados ao abrigo da luz e sob refrigeração.

No momento do experimento, foi realizado o preparo da solução de uso, sendo acrescentado ao eppendorf contendo 200 μ L de solução estoque, 800 μ L de meio RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino 10% e antibiótico penicilina/estreptomicina 1%. As concentrações utilizadas no experimento foram obtidas por diluições seriadas (400 μ g/mL; 200 μ g/mL; 100 μ g/mL; 50 μ g/mL; e 25 μ g/mL) e todas as concentrações foram preparadas no momento do experimento.

4.4 A LINHAGEM E CULTURA CELULAR

Foi realizado o cultivo celular da linhagem de células de melanoma de murinos K1735, cujas células foram gentilmente fornecidas pela professora Dr^a. Jane Lima dos Santos, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA.

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e incubadas a 37°C sob 5% de CO₂, em atmosfera umidificada. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas. Após a confluência de 80%, alcançada em aproximadamente sete dias de cultura, frações dessas células foram removidas e subcultivadas em novas garrafas.

4.5 PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS

Quando a densidade celular atingiu cerca de 80% de confluência, a contagem das células foi realizada, segundo protocolo de Peres e Curi (2005), com modificações. As células cultivadas foram descoladas da monocamada com 2 mL de tripsina-EDTA 0,25% por 10 minutos, coletadas juntamente com o sobrenadante e centrifugadas a 2000 rpm, por 10 minutos. Ao *pellet* celular obtido foi adicionado 1 mL de meio RPMI 1640. As células foram então coletadas, diluídas em solução tampão PBS, na proporção de 1:100, e contadas em hemocitômetro através de microscópio óptico. As células foram plaqueadas em placa de 96 poços, a razão de 1×10^5 células/poço e incubadas a 37° C e 5% de CO₂, por 24 horas, para formação da monocamada.

4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

4.6.1 TESTE DE CITOTOXICIDADE MTT

Realizou-se o ensaio do MTT, segundo o protocolo de Mesquita et al. (2009), com modificações. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço), durante 24 horas, conforme descrito no item 4.5. Posteriormente foi realizado o tratamento das células com os extratos (nas concentrações de 400 µg/mL; 200 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; e 25 µg/mL) por 24, 48 e 72 horas. Foram também incluídos na placa o controle negativo (células sem tratamento, apenas com meio de cultura), o controle veículo (etanol ou DMSO em diluição seriada, nas mesmas concentrações dos extratos testadas) e um grupo branco (contendo apenas PBS). Após o tempo de tratamento, foi desprezado o conteúdo dos poços e realizada uma lavagem dos

poços com 200 µL de PBS. Após a remoção do PBS, foi acrescentado em cada poço 200 µL de meio fresco contendo 0,5 mg/mL de MTT. As placas foram incubadas por 3 horas, a 37 °C e 5% CO₂, na ausência de luz. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado a cada poço 100 µL de DMSO, para completa dissolução dos cristais de formazan. A leitura da absorbância óptica foi realizada a λ 570 nm, com filtro de referência 620 nm, em espectrofotômetro de placa do tipo ELISA. Em cada placa, os tratamentos (concentrações) foram testados em triplicata e o experimento foi realizado com três repetições, totalizando nove leituras de cada tratamento. Os resultados expressos como porcentagem de redução do MTT em relação ao controle negativo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{absorbância dos tratamentos/absorbância do controle}) \times 100$$

4.6.1.1 Cálculo da inibição do crescimento (IC₅₀)

A partir das curvas de concentração-resposta, obtidas por meio da representação gráfica da porcentagem de inibição do crescimento (IC) em relação à concentração de extrato, foi calculada a concentração de extrato capaz de inibir em 50% o crescimento das células, sendo este o denominado como valor de IC₅₀. Para esse cálculo foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

4.6.2 MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN

A viabilidade celular também foi estimada pelo método de exclusão do corante azul de tripan de acordo ao protocolo descrito por Abo-Zeid et al. (2013). As células foram colhidas e ressuspendidas em PBS. O volume de 20 µL de suspensão de células foi corado com um volume igual (20 µL) de uma solução a 0,4% de azul Tripán. Posteriormente, foi realizada a contagem do número de células não coradas (viáveis) e do número de células coradas (não viáveis), utilizando-se um microscópio de luz e um hemocítmetro. A porcentagem de viabilidade foi determinada pela seguinte equação e os dados foram representados como a média ± o desvio padrão.

$$\% \text{ de viabilidade} = \text{número de células viáveis} / \text{total de células} \times 100$$

4.7 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

4.7.1 AVALIAÇÃO ATRAVÉS DO MICROSCÓPIO DE CONTRASTE DE FASE

Foi realizada a avaliação morfológica das células K1735 com o auxílio de um microscópio de contraste de fase da marca Leica, modelo DMI3000B. As imagens foram obtidas através de uma câmera DFC 295, acoplada ao microscópio, com barra de dimensão de 60 μm . Os parâmetros que foram avaliados neste teste incluíram alteração na morfologia celular, integridade da membrana celular e do núcleo, presença de vacúolos no citoplasma, presença de grânulos no núcleo e presença de protuberâncias na superfície celular (*blebbings*).

4.7.2 MÉTODO DE COLORAÇÃO PANÓTICO

Foi realizada a avaliação morfológica das células cultivadas mediante coloração com kit panótico rápido (coloração do tipo Romanowsky). A observação das células foi realizada com auxílio de microscópio óptico. Os parâmetros que foram avaliados neste teste foram os mesmos descritos no item 4.7.1.

As células K1735 foram cultivadas sobre lamínulas em placa de 24 poços e tratadas, conforme o protocolo descrito anteriormente no item 4.3. Após 24 horas de incubação das células com os extratos de própolis em estufa a 37° C e 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido de cada poço e as células foram fixadas com a solução nº 1 (triarilmetano 0,1%). Após um minuto, a solução fixadora foi removida e foi adicionada a solução nº 2 (xantenos 0,1%). Após um minuto, a solução nº 2 foi removida e foi adicionada a solução nº 3 (tiazinas 0,1%). Após um minuto, a solução nº 3 foi removida e as lamínulas foram lavadas com água deionizada pH 7,0. As lamínulas foram removidas com auxílio de uma pinça, secas à temperatura ambiente e montadas as lâminas com bálsamo do Canadá.

4.8 TESTE PARA DISTINGUIR O MECANISMO DE MORTE CELULAR: APOPTOSE OU NECROSE

4.8.1 CITOMETRIA DE FLUXO

As células a uma densidade de 1×10^5 células/poço foram incubadas com os extratos em todas as concentrações estudadas em placas de 24 poços por 24 horas. Posteriormente, a citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o Kit Alexa Fluor 488 annexin V/Dead cell apoptosis kit and PI for Flow Cytometry, da marca Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, todas as células foram recolhidas com tripsina e lavadas com PBS e centrifugadas. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e o sedimento celular foi, então, suspenso em tampão de ligação da anexina 1x. Uma amostra (500 μ L) desta suspensão de células foi transferida para um tubo de cultura de 5 mL, ao qual foram adicionados 5 μ L de anexina-V e 10 μ L de PI. As células foram agitadas suavemente e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. O percentual de células foi imediatamente determinado por citometria de fluxo (ABU BAKAR et al., 2010).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados quantitativos foram expressos em média \pm desvio padrão dos dados obtidos e submetidos à análise de variância e posteriormente ao Teste de Tukey, para a comparação das médias. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.0. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha do veículo

Com o intuito de testar qual seria o melhor veículo a ser utilizado para solubilizar os extratos de própolis, foram realizados testes de MTT utilizando como veículos o DMSO e o etanol, nas mesmas proporções, porém sempre respeitando a dosagem máxima recomendada para não causar toxicidade para a célula, conforme citado no item 4.3. Foi observado visualmente que desde o preparo da solução estoque os extratos de própolis, especialmente o extrato 3, não estavam sendo bem solubilizados quando era utilizado o etanol como veículo, comparado com o uso do DMSO que formava uma solução homogênea. Com o uso do etanol formavam-se grumos que não se desfaziam totalmente, mesmo sob agitação por um determinado tempo. Para confirmar esse efeito, foram realizados ensaios de MTT em placas de 96 poços,

utilizando o veículo etanol e também DMSO, para se realizar uma análise comparativa dos valores de absorvância resultantes da leitura no espectrofotômetro. Foram montadas placas utilizando os três extratos nas cinco concentrações, além de um grupo controle veículo e controle negativo, todos em triplicata. Este teste foi repetido três vezes para confirmação dos resultados. Observou-se que os resultados das leituras de absorvância (à 570nm) para os controles veículo DMSO e etanol, apresentaram-se similares aos valores do controle negativo, não havendo diferença significativa entre estes. Tais resultados indicaram que não estava ocorrendo interferência de nenhum dos veículos sobre as células cultivadas.

Outro parâmetro considerado para escolha do veículo foi a sua capacidade de solubilizar os extratos de própolis. Para tanto, também foram utilizados os resultados obtidos pelo ensaio do MTT. Observou-se que houve diferença entre as porcentagens de viabilidade celular, após 24 horas de incubação com os extratos de própolis, diluídos em DMSO e em etanol, considerando-se as mesmas concentrações e os mesmos extratos. Esta diferença foi mais significativa relação ao extrato 3, em que utilização do veículo DMSO promoveu diminuição significativa da viabilidade celular (nas concentrações de 400, 200 e 100 µg/mL), enquanto com o veículo etanol a diminuição da viabilidade celular não foi significativa, nas mesmas concentrações (Tabela 2). Esse fato sugere que o etanol não conseguiu solubilizar adequadamente os extratos de própolis, principalmente o extrato 3, interferindo nos resultados obtidos.

Tabela 2. Análise comparativa das médias (%) da viabilidade celular, após 24h de tratamento com o extrato 3 utilizando os veículos DMSO e etanol.

Concentração (µg/mL)	DMSO (média %)	Etanol (média %)
400	3,6	87
200	3,7	89
100	16	83
50	96	100
25	96	100

Sendo assim, foi descartado o uso de etanol como veículo neste trabalho e adotou-se como padrão o DMSO para solubilizar os extratos no momento do preparo das soluções estoque.

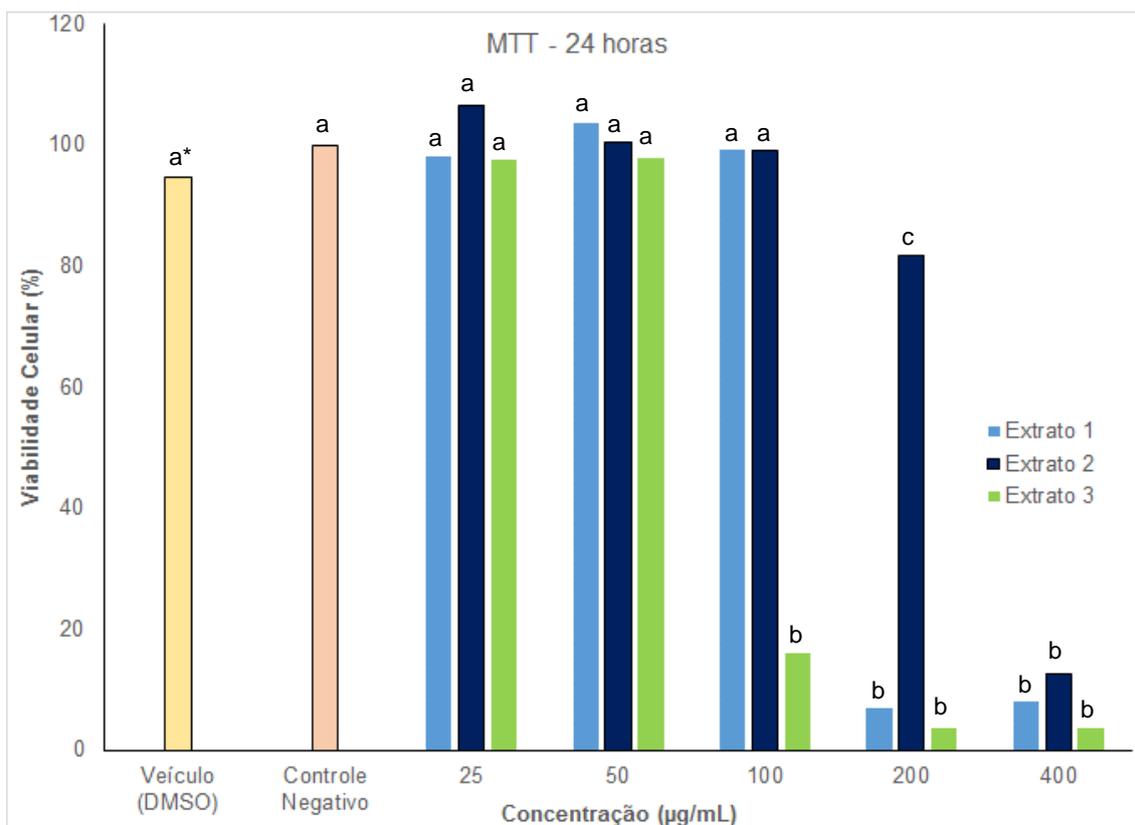
5.2 Ensaio MTT

O ensaio do MTT é uma metodologia frequentemente utilizada para investigar o potencial citotóxico de várias substâncias (SENFT et al., 2010; CHEN et al., 2007), sendo um dos testes mais utilizados para estimar o número de células viáveis em placas de múltiplos poços. A viabilidade celular pode ser estimada após a incubação das células com a substância teste (extrato), após diferentes períodos (RISS et al., 2004).

No presente estudo, o ensaio do MTT foi realizado após 24, 48 e 72 horas da incubação das células com cada um dos extratos em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$). Observou-se diferenças na viabilidade celular obtida nos diferentes períodos testados e entre os extratos. Decorridas 24 horas, foi possível verificar diferença entre as atividades dos extratos, sendo que o extrato 3 acarretou em diminuição significativa da viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle) a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, enquanto nos extratos 1 e 2 esta redução só foi significativa a partir da concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

Observou-se que na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, todos os três extratos de própolis provocaram redução significativa da viabilidade celular, em relação ao controle negativo, com diminuição da viabilidade celular em porcentagens acima de 85%, e sem haver diferença significativa entre o efeito dos três extratos. Já na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade celular dos três extratos diferiu do controle negativo, assim como a redução da viabilidade celular dos extratos 1 e 3 diferiu do extrato 2, que foi aquele com menor redução da viabilidade celular.

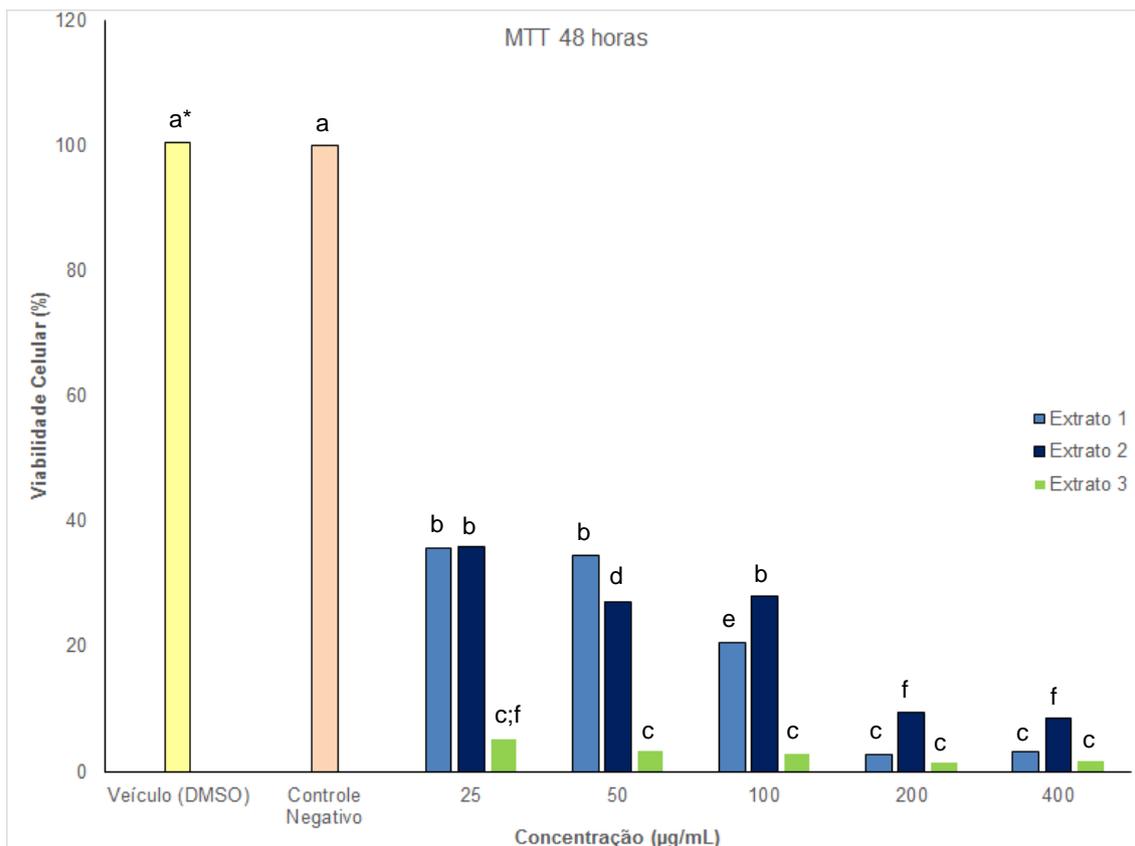
Apesar dos resultados deste estudo, Awale et al. (2008) verificaram que apenas a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de própolis vermelha brasileira foi suficiente para matar 100% das células de linhagem PANC-1, porém as condições de deficiência dos nutrientes durante o cultivo celular que ele aplicou potencializaram este efeito citotóxico. Inoue et al. (2008) observaram o efeito antitumoral de várias concentrações (0,5 a 128 $\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso de própolis em células de sarcoma (S-180) de forma dose-dependente, sendo que a menor concentração eficaz foi 1 $\mu\text{g/mL}$ e na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, houve 90% de inibição após 24h de exposição. Utilizando a concentração mais alta dos três extratos de própolis no presente estudo (400 $\mu\text{g/mL}$), foi observado que possuíam efeito inibitório similar ao desses autores.



* Análise estatística realizada pelos testes ANOVA e Teste de Tukey. Letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$)

Figura 1: Porcentagem de viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle), determinada pelo ensaio MTT, após 24h da incubação das células K1735 com os três extratos de própolis.

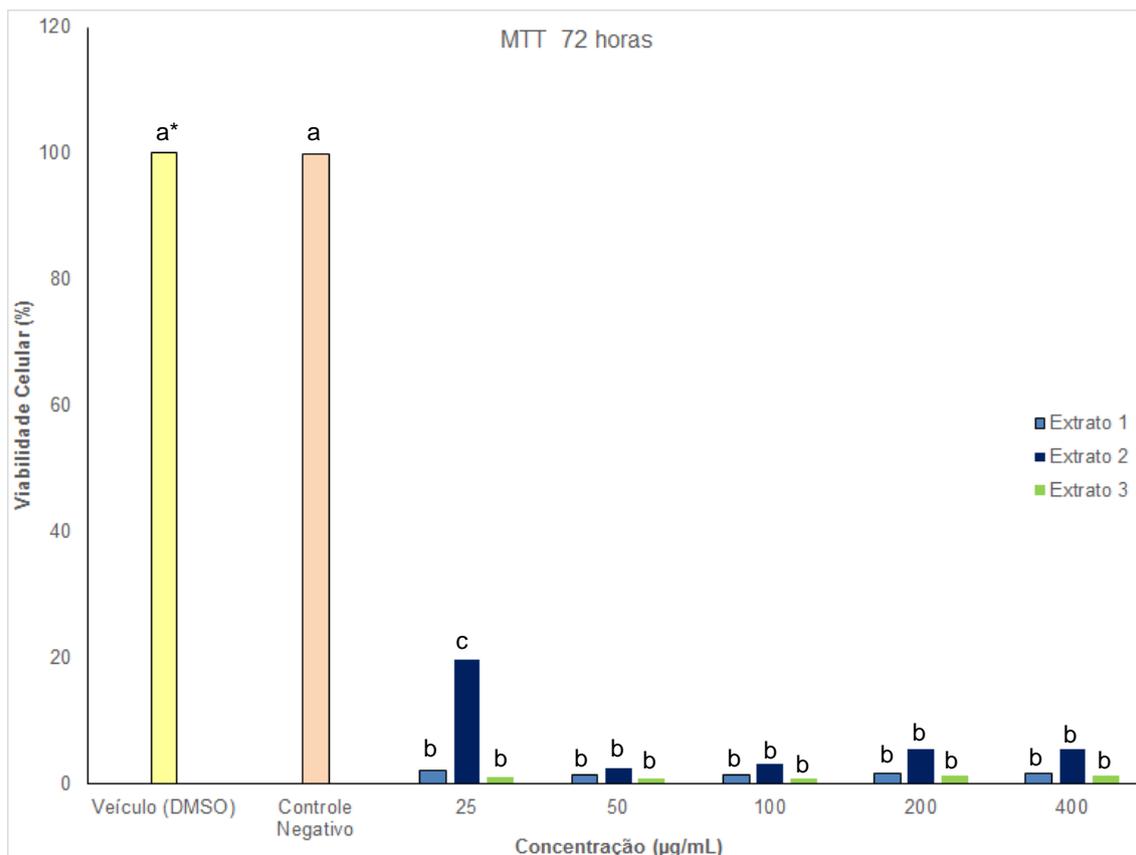
Após 48h de incubação das células com os tratamentos, observou-se redução da viabilidade, de forma significativa, nos três extratos e em todas as concentrações testadas, quando comparados ao controle negativo (Figura 2). Houve diferença significativa entre o efeito dos extratos, sendo que o extrato 3 foi aquele que demonstrou maior redução da viabilidade celular, desde a menor concentração testada, que foi de 25 µg/mL. Nas concentrações de 200 e 400 µg/mL não houve diferença significativa entre a redução da viabilidade desencadeada pelos extratos 1 e 3, e ambos diferiram do extrato 2, que novamente produziu menor efeito de redução da viabilidade celular.



* Análise estatística realizada pelos testes ANOVA e Teste de Tukey. Letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$)

Figura 2: Porcentagem de viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle), determinada pelo ensaio MTT, após 48 h da incubação das células K1735 com os três extratos de própolis.

Em relação ao tratamento após 72h (Figura 3), houve um aumento bastante consistente na inibição celular em todos os extratos quando comparados com os valores do tratamento após 24h e 48h, respectivamente, apresentando valores com significância estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). Porém, comparando-se os extratos nas mesmas concentrações entre eles, nenhum apresentou diferença significativa em relação ao outro após 72h de incubação, exceto na concentração de 25 que houve diferença significativa entre os extratos 1 e 2 e entre o 2 e o 3 ($p < 0,01$).



* Análise estatística realizada pelos testes ANOVA e Teste de Tukey. Letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$)

Figura 3: Porcentagem de viabilidade celular (% de células viáveis em relação ao controle), determinada pelo ensaio MTT, após 72 h da incubação das células K1735 com os três extratos de própolis.

A divergência na citotoxicidade entre os três extratos de própolis analisados neste trabalho pode ser atribuída ao fato de que diversos fatores interferem na sua atividade antitumoral, dentre eles destacam-se o tipo de própolis, a dose utilizada, o veículo e a região fornecedora de matéria prima para sua produção (KUMAZAWA et al., 2004; AHN et al., 2007).

Em trabalho anterior realizado por esta equipe foi realizada a análise de fenóis e flavonóides totais presentes nestas amostras de própolis. Vale salientar que a amostra 2 de própolis possuía a maior quantidade de flavonóides entre as três estudadas, porém se mostrou neste estudo como o extrato com a menor atividade citotóxica. E a amostra 3 era a que possuía a menor quantidade de fenóis e apresentou a maior atividade citotóxica comparativamente. Embora a própolis vermelha do nordeste se destaque por ser rica em flavonóides, este não pode ser o único parâmetro a ser avaliado para medir a citotoxicidade. Outros componentes presentes na própolis também podem exibir ações inibitórias sobre o crescimento de células tumorais (VALENTE et al., 2011) e estes

variam diretamente com a vegetação visitada pelas abelhas e época de colheita. Além disso, o efeito citotóxico da própolis sobre as células não se relaciona com a concentração dos compostos em particular, mas em estabelecer a atividade sinérgica dos fenóis e flavonóides presentes (BARBARIC^Ć et al., 2011). Isso confirma a necessidade de caracterizar adequadamente a composição química da própolis (LÓPEZ et al., 2014).

Avaliando-se o efeito dos tratamentos no decorrer do tempo, observou-se que, quanto maior o tempo de incubação das células K1735 com os extratos de própolis, maiores eram as porcentagens de morte celular, indicando diminuição do metabolismo ou da viabilidade celular. Pode-se afirmar assim, que os extratos de própolis podem inibir o crescimento de células K1735 de forma tempo-dependente (Figura 4).

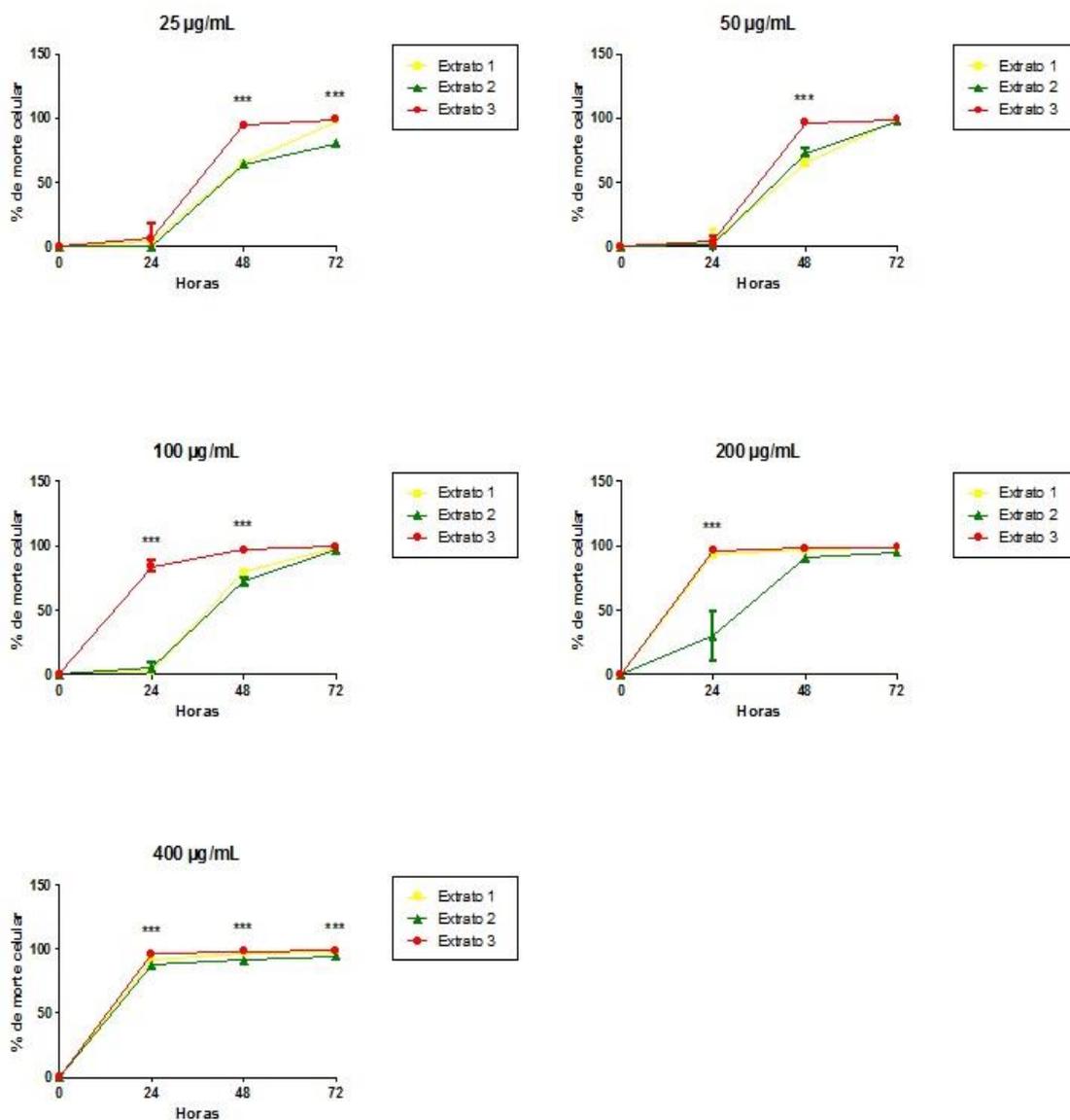
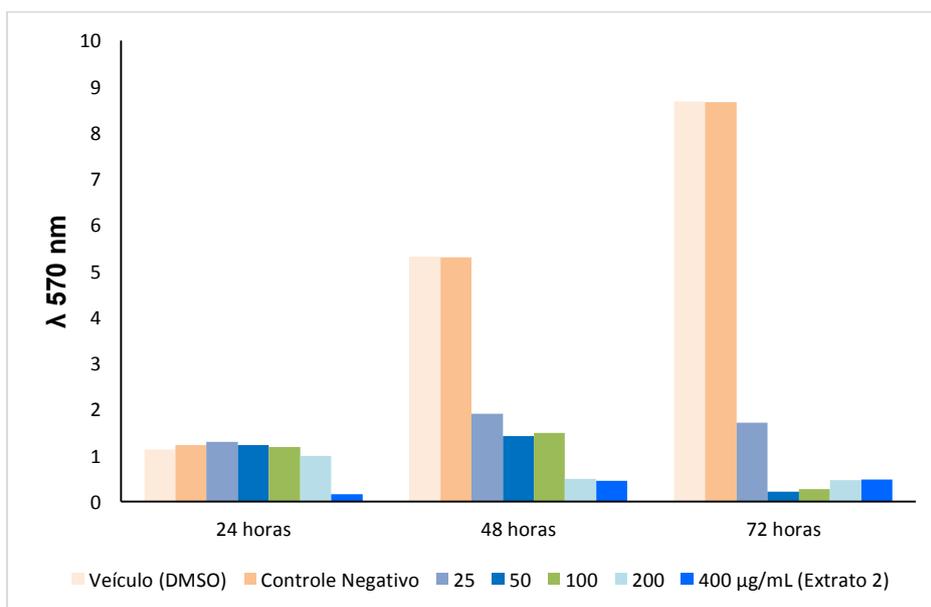
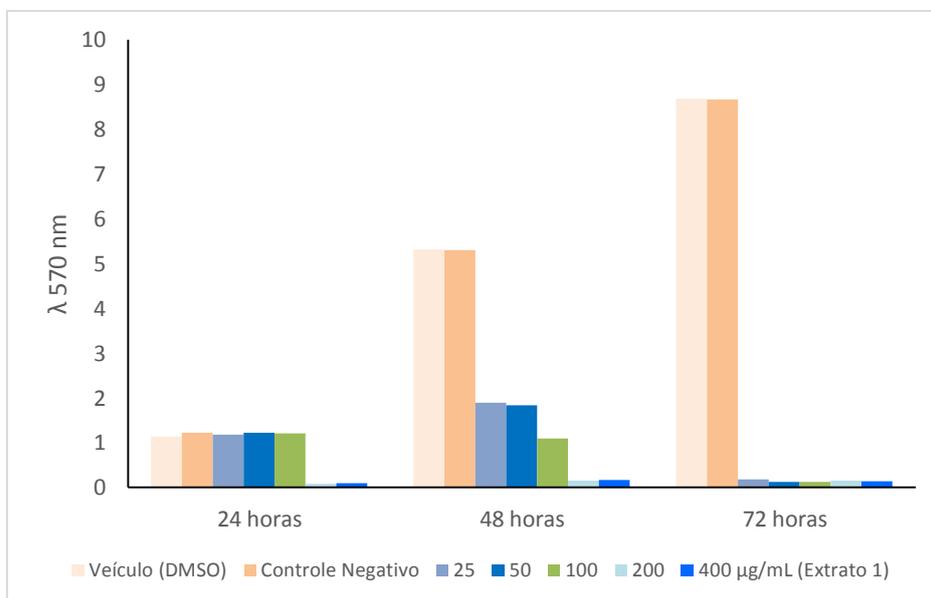


Figura 4. Efeito dos extratos de própolis no crescimento de células de melanoma K1735 em estudo tempo-resposta. Concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL, em relação aos tratamentos de 24, 48 e 72h. ***Análise estatística realizada pelos testes ANOVA e Teste de Tukey, com $P < 0,05$.

Por outro lado, os grupos controle negativo e controle veículo apresentaram aumento das absorbâncias, no decorrer do tempo (24-72h), indicando maior metabolismo ou proliferação celular (Figura 5). Analisando a leitura da absorbância das células tratadas com os extratos 1 e 2, observa-se que, nas concentrações 25 e 50 µg/mL houve aumento da absorbância após 48 horas, em comparação à absorbância obtida em 24 horas. Já nas concentrações de 200 e 400 µg/mL observou-se diminuição da absorbância. Este resultado pode indicar que a incubação das células com os extratos exerça efeitos de

diminuição da absorvância mediante redução do metabolismo, da viabilidade e/ou da proliferação celular.



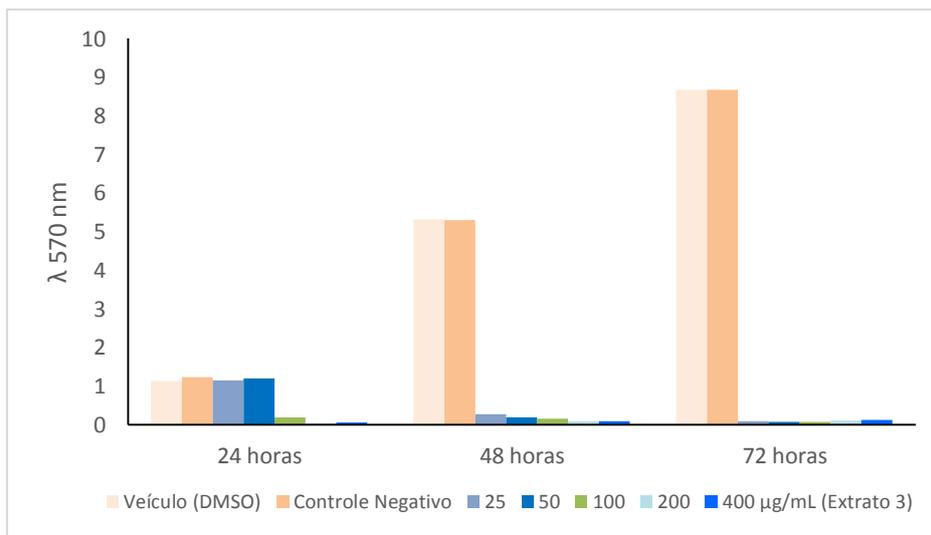


Figura 5. Efeito dos extratos de própolis no crescimento de células de melanoma K1735 em estudo tempo-resposta (24-48-72 horas). (A) Extrato 1 (B) Extrato 2 e (C) Extrato 3.

Para proceder com a interpretação do teste do MTT, é preciso considerar que este teste baseia-se na redução do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan insolúveis de coloração violeta, reação que ocorre sobretudo pela atividade de enzimas mitocondriais (KOUIDHI et al., 2010). Diante deste princípio, percebe-se que variáveis como a concentração de MTT, período de incubação, número de células viáveis e atividade metabólica das células exercem influência no resultado (RISS et al., 2004).

Não há estudos em que extratos de própolis tenham sido avaliados pelo ensaio do MTT em culturas de células de melanoma K1735. Entretanto, existem publicações em que outras substâncias foram testadas nesta linhagem celular, indicando que a mesma pode ser avaliada mediante o ensaio do MTT. A exemplo, Liu et al. (2011), demonstraram o efeito inibitório induzido pela substância decitabina em células de melanoma K1735, após diferentes tempos de tratamento (24-120h) em concentrações de 0,5, 5 e 20 μg/mL. A taxa de inibição passou de 18% após 72h de tratamento com 0,5 μg/mL de decitabina para 78,2% após 120h de tratamento, comprovando sua atividade tempo-dependente. Além disto, testando doses que variavam de 0,1-40 μg/mL após 72h de tratamento, observaram que a taxa de inibição celular aumentava, sendo que a dose mais baixa (0,1 μg/mL) inibiu menos de 10% das células e a maior dose (40 μg/mL) inibiu mais de 55% das células, comprovando sua atividade dose-dependente. Esse estudo mostra que, similares ao tratamento com os extratos de própolis do presente estudo, muitos compostos naturais afetam a viabilidade celular especialmente com a

extensão do tempo de incubação. No estudo de Barbaric et al. (2011), diferentes concentrações de extratos etanólicos de própolis (0,001-1 mg/mL) foram avaliadas em linhagens celulares HeLa após 72h de incubação. Com a maior concentração testada (1 µg/mL) foram alcançadas taxas de inibição da proliferação celular entre 60-85%, enquanto que no presente estudo os extratos, em todas as concentrações (25-400 µg/mL), após o mesmo tempo de exposição, apresentaram taxas de inibição da proliferação celular entre 80% a 99% variando de modo dose dependente.

5.3 O IC₅₀

A partir dos resultados obtidos no ensaio do MTT, foi possível determinar a concentração dos extratos capaz de inibir em 50% o crescimento das células, sendo este o denominado como valor de IC₅₀. A tabela 3 apresenta os valores de IC₅₀ exercidas pelos extratos, após 24h, 48h e 72h de tratamento.

Tabela 3. Valores de IC₅₀ após 24, 48 e 72h de tratamento com extratos etanólicos de própolis.

Amostras	Concentração IC ₅₀		
	24h	48h	72h
Extrato 1	141,4 µg	102,9 µg	35,4 µg
Extrato 2	219,8 µg	108,1 µg	35,2 µg
Extrato 3	95 µg	62,6 µg	14,7 µg

Os resultados demonstram que o IC₅₀ de um mesmo extrato diminui com o tempo, ou seja, se altera de forma tempo-dependente. Estes resultados corroboram com o estudo de Meneghelli et al. (2013), em que o extrato da própolis de Santa Catarina que foi coletada no outono diminuiu o IC₅₀ de 297-130 µg/mL (redução de 56%) entre 24h e 72h de exposição, respectivamente. Da mesma forma, a redução do IC₅₀ após tratamento com extrato de própolis do mesmo local, coletada no inverno, foi de 302-215 µg/mL (redução de cerca de 29%) entre 24h a 72h de exposição, respectivamente.

No presente estudo, os extratos de própolis mostraram possuir uma potente atividade de inibição da viabilidade celular, pois, mesmo iniciando com valores de IC₅₀

elevados com 24h de tratamento, após 72h todos os extratos passaram a apresentar valores de IC_{50} abaixo de 35,4%. Sabe-se que quanto menor o valor de IC_{50} mais citotóxica é a substância, assim, o extrato 3 caracteriza-se neste estudo como o mais citotóxico entre os três, apresentando IC_{50} 14,7 após 72h de tratamento (Tabela 4). Este dado confirma o que havia sido observado através dos gráficos apresentados para o ensaio de MTT e método de exclusão do corante Azul de tripan.

Tanto no presente estudo quanto no estudo de Meneghelli et al. (2013) foram encontrados valores de IC_{50} relativamente elevados, pois, dentre os critérios que devem ser avaliados para que um extrato tenha uma atividade considerada relevante e seletiva, os valores de IC_{50} devem estar abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ (COS et al., 2006). No presente estudo, nos tempos de incubação de 24h e 48h os extratos apresentaram valores acima do recomendado por estes autores, exceto o extrato 3 que apresentou valores de IC_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ em todos os três tempos de incubação. Após 72h de tratamento, os valores de IC_{50} de todos os extratos estavam bem abaixo do que recomenda Cos et al. (2006), com valores de 35,4, 35,2 e 14,7 para os extratos 1, 2 e 3 respectivamente. Sendo assim, os extratos de própolis demonstraram atividade citotóxica potente. De forma comparativa, pode-se destacar o estudo de Alencar et al. (2007) que encontrou valor de IC_{50} de 7,45 $\mu\text{g/mL}$ ao avaliar a atividade citotóxica de extratos etanólicos de própolis de Alagoas em células tumorais HeLa, sendo um dos menores valores encontrados nas pesquisas realizadas avaliando a atividade antitumoral da própolis.

5.4 Teste de exclusão do corante Azul de Tripan

Para confirmar o efeito inibitório dos extratos de própolis sobre a viabilidade das células de melanoma K1735 foi utilizado o teste de exclusão do corante Azul de Tripan, após 24h de tratamento com os três extratos de própolis, nas concentrações de 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Como quase não houve inibição da viabilidade celular, após 24h de tratamento com os extratos de própolis nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, não foi realizado esse teste nestas concentrações.

Os resultados do teste de exclusão do corante Azul de Tripan mostraram percentuais de células coradas similares aos resultados encontrados no ensaio de MTT para inibição celular, após 24h de tratamento, de modo dose-dependente (Figura 6). Obteve-se uma porcentagem de células viáveis (não coradas) de 7% e 8% nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ do extrato 1, respectivamente, de 76% e 12% nas

concentrações de 200 e 400 µg/mL do extrato 2, respectivamente e de 16%, 4% e 4% nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL do extrato 3. Gunduz et al. (2005) também utilizaram o teste de exclusão do corante Azul de tripan para realizar a contagem de células de leucemia (CCRF-CEM) após 24h de tratamento com extrato etanólico de própolis da Turquia, porém a porcentagem de células viáveis foi de 70%.

Comparando-se no presente estudo a viabilidade das células tratadas, após 24h, houve diferença estatística significativa entre as concentrações de 200 e 400 µg/mL do extrato 1 e do extrato 2 em relação ao controle negativo ($p < 0.001$). Analisado de forma similar, o extrato 3 apresentou inibição da viabilidade celular significativa com as concentrações 100, 200 e 400 µg/mL em relação ao controle negativo ($p < 0.001$). Comparando-se os extratos na mesma concentração de 100 µg/mL, houve diferença estatística significativa ($p < 0.01$) entre os extratos 1 e 3 e entre o 2 e 3. Houve diferença significativa ($p < 0.01$) na inibição da viabilidade celular, após 24h, entre os extratos 1 e 2 e entre 2 e 3, na concentração de 200 µg/mL. Fazendo a mesma comparação, porém, em relação à concentração de 400 µg/mL dos três extratos, não houve diferença estatística significativa entre estes grupos na mesma concentração.

A coloração é um importante recurso para se avaliar e qualificar células provenientes de cultura primária ou permanente em condições normais ou obtidas após um determinado tratamento experimental (PERES; CURI, 2005). Na figura 7, ilustra-se a morfologia das células quando coradas pelo Azul de tripan, que se trata de um corante que só penetra nas células que estão com as membranas danificadas.

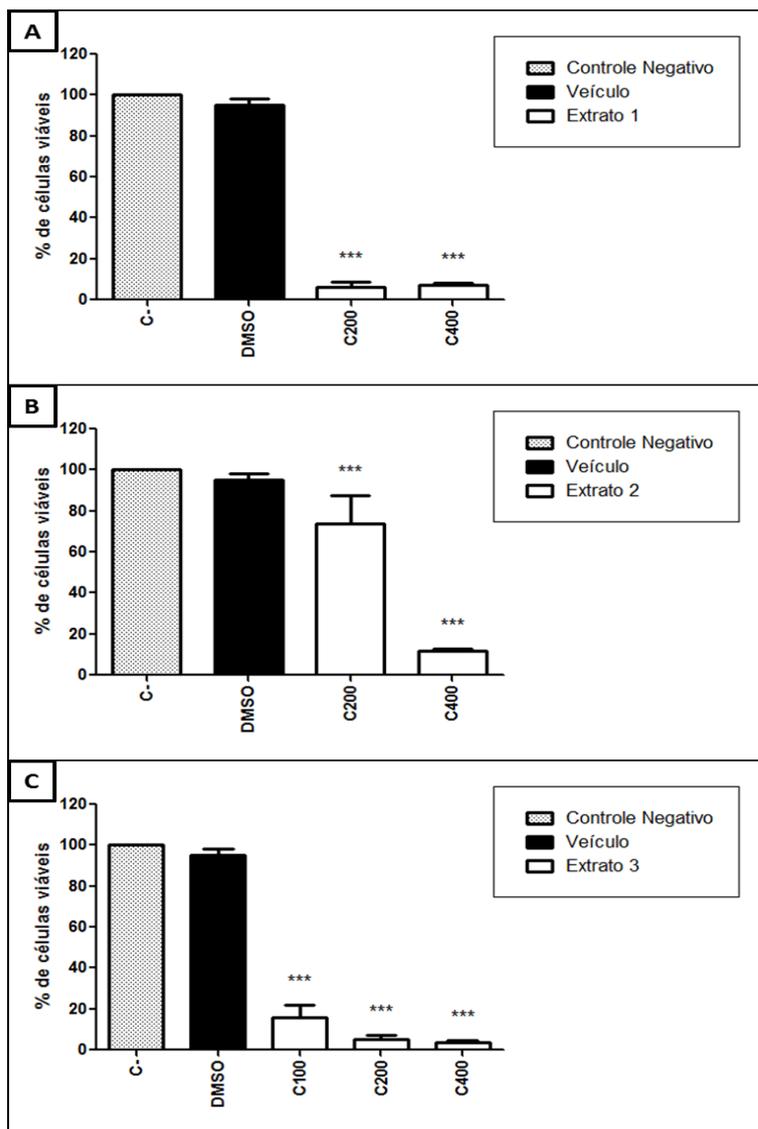


Figura 6. Teste de exclusão do corante Azul de Tripán realizado após 24h de tratamento com os extratos de própolis, nas concentrações de 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. ***Análise estatística realizada pelos testes ANOVA e Teste de Tukey, com $P < 0,05$.

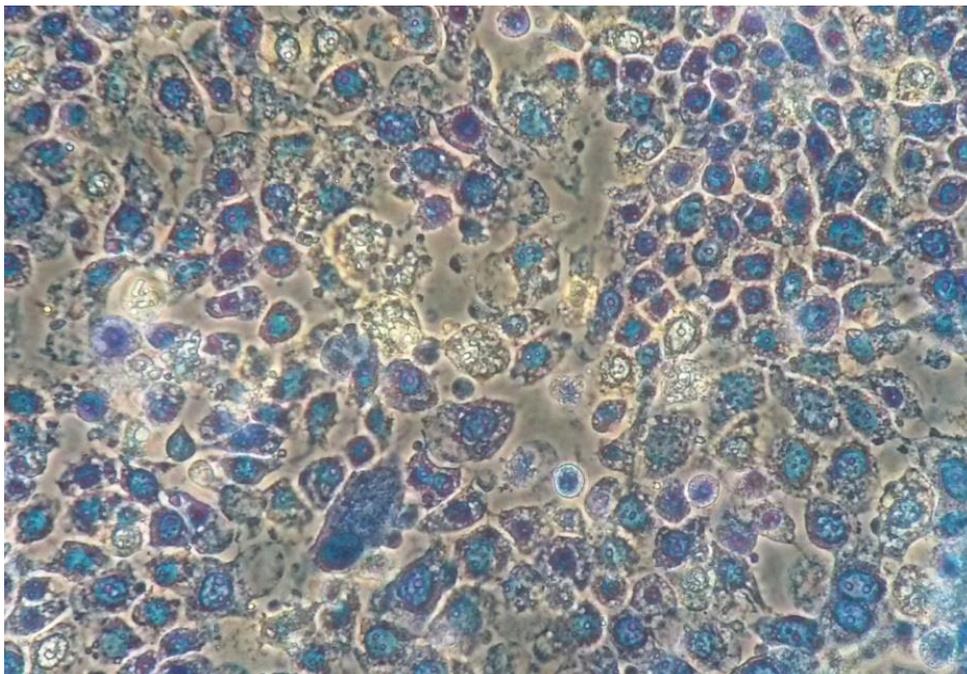


Figura 7. Aspecto morfológico das células K1735, coradas com o corante Azul de tripan, após 24h de tratamento na concentração de 400 µg/mL do extrato 3 e avaliadas através de microscópio de contraste de fase, com aumento de 100x.

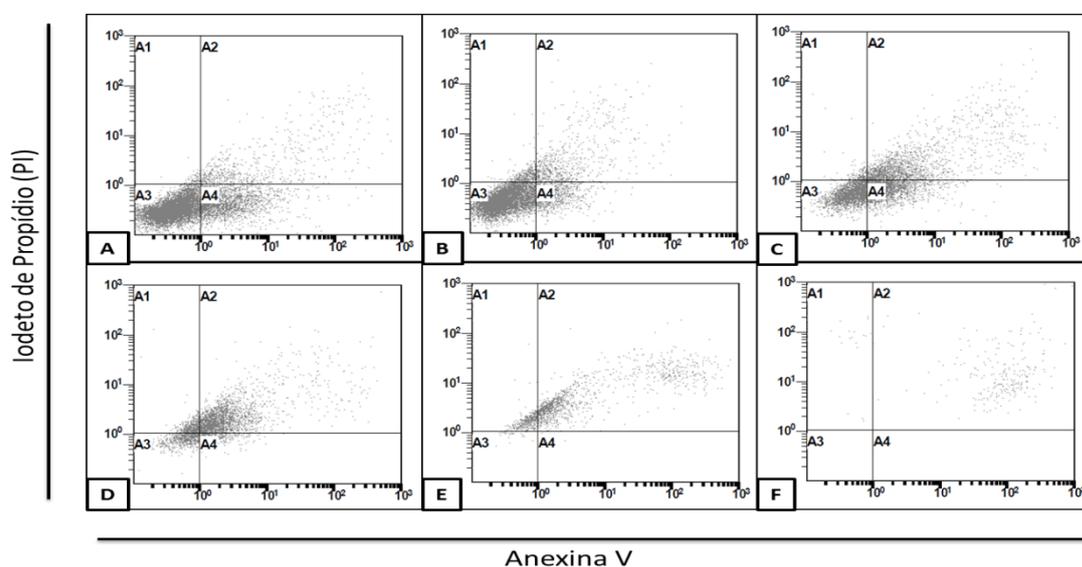
5.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um teste capaz de distinguir entre o processo de morte celular, se ocorre por apoptose ou por necrose. Uma mudança morfológica associada à morte celular por apoptose é a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática e este evento pode ser identificado por ligação de anexina V (WANG et al., 2012; LEE et al., 2013). Para determinar qual o tipo de morte celular que está associado ao tratamento com os extratos etanólicos de própolis em células K1735 foi realizado uma análise da exposição de fosfatidilserina como um marcador de apoptose utilizando um Kit de coloração dupla Anexina V/PI. A porcentagem de células foi analisada por Citometria de Fluxo no grupo controle negativo (sem tratamento) e após uma exposição por 24h aos extratos, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL (Figuras 8, 9 e 10).

Para uma melhor compreensão dos gráficos provenientes do citômetro de fluxo que serão apresentados abaixo, o mesmo foi dividido em quadrantes A1, A2, A3 e A4. O quadrante A1 corresponde à área em que as células presentes foram coradas apenas pelo PI e não pela Anexina V e isso indica que as células estão em processo de necrose. O quadrante A2 corresponde à área em que as células foram coradas tanto pelo PI como

pela Anexina V, indicando que existem células que estão tanto processo de apoptose tardia como em necrose. O quadrante A3 corresponde à área em que as células estão viáveis, ou seja, não foram coradas por nenhum dos dois corantes e o quadrante A4 corresponde à área em que as células foram coradas apenas pela Anexina V e não pelo PI sugerindo estar havendo morte por apoptose precoce.

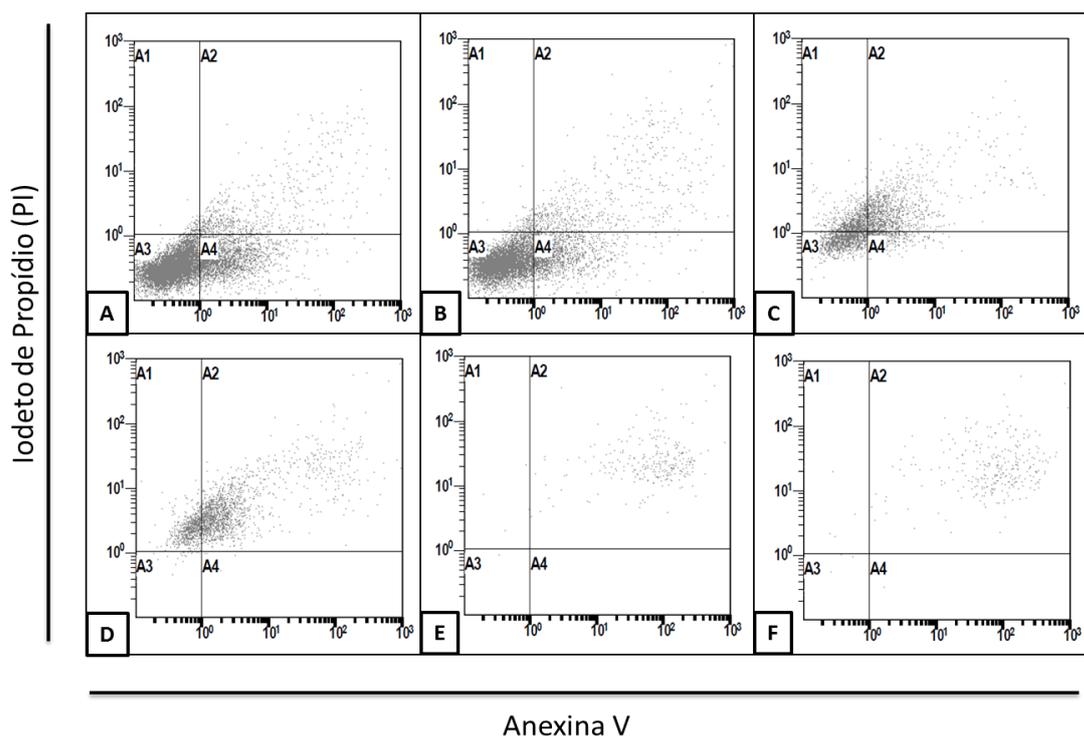
Como pode ser observado na figura 8, as células do controle negativo se encontram no quadrante A3 e isso indica que a maioria delas se encontrava viáveis, pois não receberam tratamento. Conforme o tratamento com o extrato 1 vai sendo aplicado de forma crescente em concentrações nas células, após 24h, observa-se um aumento igualmente crescente do número de células no quadrante A2 (84,84% na concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que corresponde à marcação tanto pela Anexina V como pelo PI.



Porcentagem dos eventos (%)						
Extrato 1						
Quadrantes	C-	C25	C50	C100	C200	C400
A1	1,03	5,24	3,02	16,72	26,72	14,42
A2	6,28	7,93	28,72	59,37	71,66	<u>84,84</u>
A3	<u>71,28</u>	76,71	38,91	15,95	1,34	0,74
A4	21,41	10,13	28,35	7,95	0,29	0

Figura 8. Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato etanólico da amostra 1 de própolis. Gráficos representando controle negativo (A) e as concentrações de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D), 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E) e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F) após tratamento durante 24h pelo Extrato 1, marcadas por Anexina V e Iodeto de propídio. A tabela demonstra os valores em percentual de células presentes em cada quadrante do gráfico.

Como pode ser observado na figura 9, conforme o tratamento com o extrato 2 vai sendo aplicado de forma crescente em concentrações nas células, após 24h, observa-se um aumento também crescente do número de células no quadrante A2, da mesma forma que aconteceu quando utilizado o extrato 1. Isto corresponde à marcação tanto pela Anexina V como pelo PI de aproximadamente 95% das células quando tratadas nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Essa dupla marcação sugere que o efeito citotóxico foi associado à ocorrência de apoptose tardia, segundo Awale et al. (2008). Eles realizaram um estudo que avaliou a atividade citotóxica da própolis vermelha brasileira em células de câncer pancreático humano e realizaram a citometria de fluxo após 24h de tratamento obtendo resultados similares aos deste estudo, células marcadas por ambos os corantes e segundo eles isso é indicativo de morte por apoptose tardia.



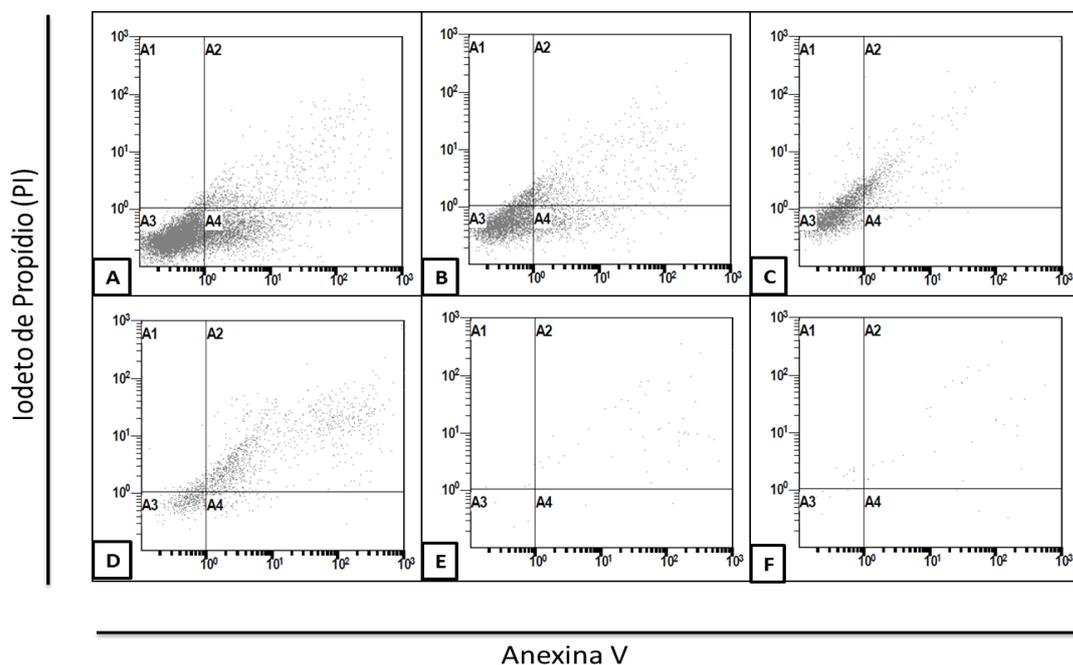
Porcentagem dos eventos (%)						
Extrato 2						
Quadrantes	C-	C25	C50	C100	C200	C400
A1	1,03	1,46	26,23	33,35	1,99	2,81
A2	6,28	7,5	31,83	65,53	96,56	94,55
A3	71,28	73,80	32,54	0,87	1,45	2,31
A4	21,41	17,23	9,41	0,25	0	0,33

Figura 9. Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato etanólico da amostra 2 de própolis. Gráficos representando controle negativo (A) e as concentrações de 25 µg/mL (B), 50 µg/mL (C), 100 µg/mL (D), 200 µg/mL (E) e 400 µg/mL (F) após tratamento durante 24h pelo Extrato 2, marcadas por Anexina V e Iodeto de propídio. A tabela demonstra os valores em percentual de células presentes em cada quadrante do gráfico.

Observa-se na figura 10, que conforme o tratamento com o extrato 3 vai sendo aplicado de forma crescente em concentrações nas células, após 24h de tratamento com os extratos, observa-se também um aumento crescente do número de células no quadrante A2, assim como ocorreu com os outros extratos. Entretanto, apenas 63% das células se encontravam neste quadrante quando utilizada a concentração de 400 µg/mL de extrato 3. Essa redução da porcentagem de células presentes no quadrante A2, observada de forma comparativa em relação ao tratamento com os extratos 1 e 2, ocorreu pois aproximadamente 15% das células se encontraram presentes no quadrante A1, ou seja, foram marcadas apenas pelo corante PI, que é um marcador de morte celular do tipo necrose.

Quando as células são coradas apenas pelo PI, isto é indicativo de que está ocorrendo morte por necrose e isso foi observado principalmente com o uso do extrato 3 que se destacou neste trabalho por ser mais citotóxico do que os demais. Quando as células são coradas pelos dois corantes, Anexina V e PI, isto também pode ser indicativo de que as células se encontram em fase tardia de apoptose e em necrose. Desta forma, conforme observado em todos os gráficos da citometria de fluxo presentes neste trabalho, podemos inferir que os extratos de própolis utilizados neste estudo produziram marcações das células K1735 pelos dois corantes, Anexina V e PI, indicando que existe uma população de células morrendo através do processo de apoptose tardia e outra por necrose. Apesar de que vários trabalhos descrevem os tipos de morte celular como eventos independentes, as observações feitas em alguns estudos

não sustentam essa distinção em sistemas biológicos. Em vez disso, sugerem que múltiplos tipos de morte podem ser observados simultaneamente em tecidos ou cultura de células exposta aos mesmos estímulos (ANKARCRONA et al., 1995). A intensidade do estímulo inicial pode influenciar diferentes mecanismos de morte em uma mesma população (BONFOCO et al., 1995; FISCHER et al., 2000).



Porcentagem dos eventos (%)						
Extrato 3						
Quadrantes	C-	C25	C50	C100	C200	C400
A1	1,03	8,24	24,27	7,74	6,61	14,56
A2	6,28	13,11	13,93	63,87	77,69	63,11
A3	71,28	63,87	59,97	20,24	9,92	19,42
A4	21,41	14,79	1,83	8,15	5,79	2,91

Figura 10. Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato etanólico da amostra 3 de própolis. Gráficos representando controle negativo (A) e as concentrações de 25 µg/mL (B), 50 µg/mL (C), 100 µg/mL (D), 200 µg/mL (E) e 400 µg/mL (F) após tratamento durante 24h pelo Extrato 3, marcadas por Anexina V e Iodeto de propídio. A tabela demonstra os valores em percentual de células presentes em cada quadrante do gráfico.

5.6 Avaliação morfológica através do microscópio de contraste de fase

O desenvolvimento de fármacos com alto potencial para causar morte celular é de grande interesse para o tratamento de melanoma resistente aos atuais quimioterápicos disponíveis (BENTKE et al., 2013). A apoptose é um mecanismo de morte molecularmente regulado que desempenha papel fundamental no desenvolvimento tecidual, na homeostase, na progressão e controle do câncer (CHIPUK & GREEN, 2005). A morte por apoptose parece ser um mecanismo de ação comum associado à própolis, isso é mostrado por diversos estudos (AWALE et al., 2008; LI et al., 2008). A morfologia celular indicativa de apoptose, processo de morte celular programada tipo I, é caracterizada pela fragmentação nuclear, condensação de cromatina, condensação citoplasmática, vacuolização no citoplasma, arredondamento da célula e formação de vesículas na superfície da membrana plasmática, denominados *blebbings* (BRÁS et al., 2005), a clivagem do DNA por endonucleases específicas e a formação de corpos apoptóticos (BEGNINI et al., 2014).

A análise dos aspectos morfológicos das células K1735 após tratamento com os extratos de própolis (Figuras 12, 13, 14 e 15) demonstrou alterações características de células em processo de morte celular, como presença de grânulos em volta do núcleo e dentro dele, o aparecimento de vacúolos citoplasmáticos e alteração no citoesqueleto da célula, além da formação de *blebbings* de membrana (Figura 12).

Segundo Chen et al. (2004), a própolis taiwanesa foi capaz de induzir fragmentação nuclear e condensação de cromatina em células A2058 de melanoma humano após 24 horas de tratamento. Aso et al. (2004) demonstraram em células de linfoma histiocítico humano (U937) que o extrato etanólico bruto da própolis brasileira inibe o crescimento destas células por apoptose de maneira dose e tempo-dependente.

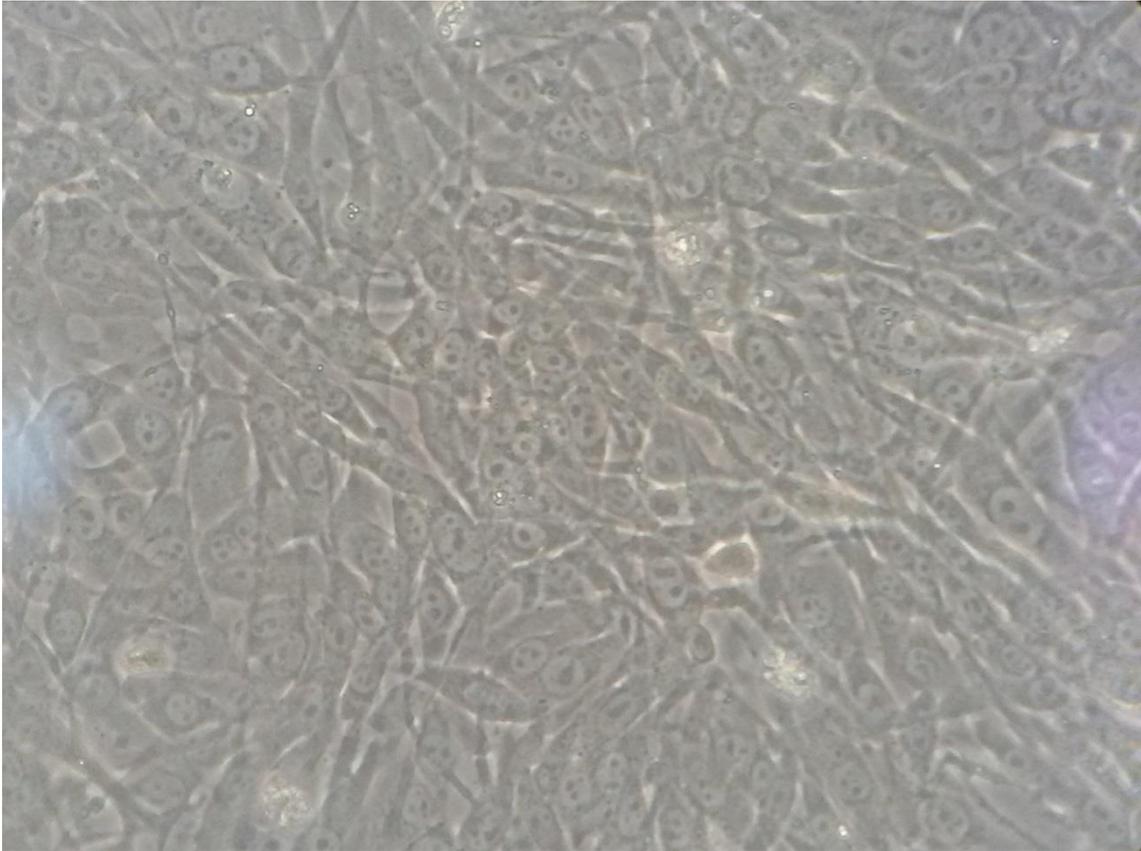


Figura 11. Células K1735 apresentando morfologia normal. Núcleo, nucléolos e citoplasma bem visíveis. Não há um padrão na morfologia das células, característica de células tumorais. Controle negativo (sem tratamento). Avaliação através de microscópio de contraste de fase com aumento de 100x.

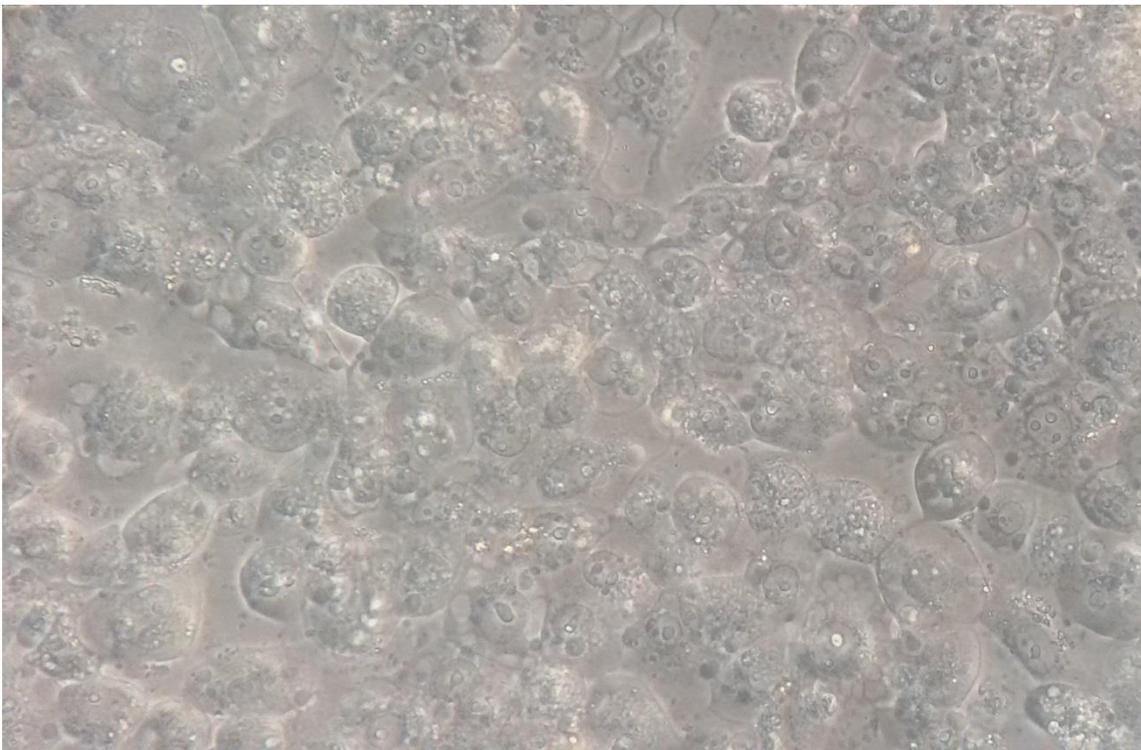


Figura 12. Células K1735 após 48h de tratamento com o Extrato 3, na concentração de 400 µg/mL . Observa-se presença de grânulos em volta do núcleo e no centro dele, com formação de vacúolos citoplasmáticos e volume celular aumentado. Células arredondadas e individualmente separadas com aparência rugosa, porém com membranas intactas. Avaliação através de microscópio de contraste de fase com aumento de 100x.

Após avaliação comparativa das figuras acima, percebe-se que células não tratadas (Figura 11) ou tratadas apenas com o solvente DMSO apresentam-se aderidas à placa de cultura, bem distribuídas e com prolongamentos irregulares em várias direções, aspectos característicos do melanoma em cultura. Ao contrário, as células tratadas com própolis (Figura 12) apresentam-se mais arredondadas e em suspensão no meio de cultura, indicando um processo de morte celular.

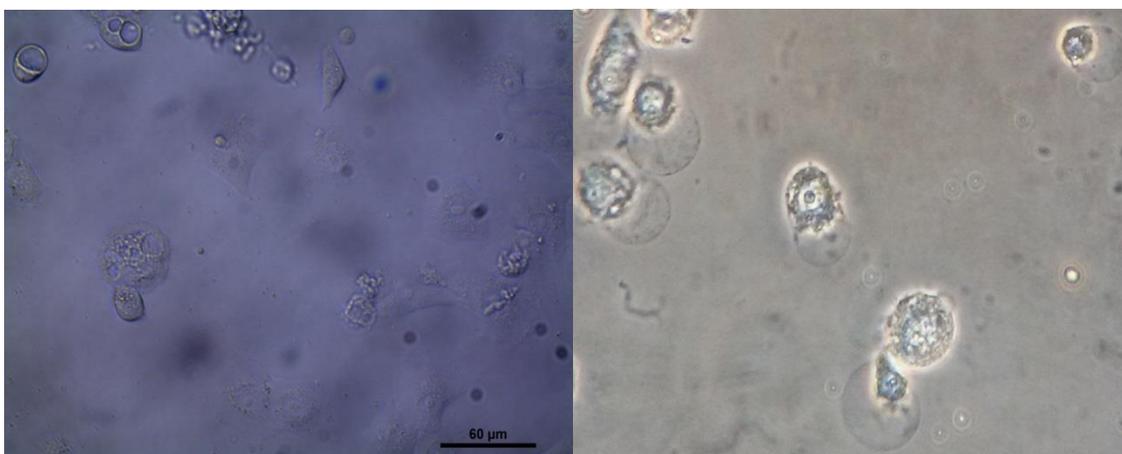


Figura 13. Formação de *blebbings* de membrana em células K1735 de melanoma murino após 48h de tratamento com o extrato 1. Avaliação através de microscópio de contraste de fase com aumento de 400x.

5.7 A avaliação morfológica através de microscopia óptica

Após tratadas por 48h com os três extratos de própolis, realizou-se a coloração celular com panótico rápido (coloração do tipo Romanowsky) e a avaliação através de microscopia óptica revelou que as células não apresentaram rompimento da membrana plasmática, porém, houve alteração da morfologia celular como alterações no citoesqueleto (Figura 15B), prolongamentos dendríticos acentuados (Figura 15B) e formação de muitos vacúolos no citoplasma (Figuras 13, 14 e 15B) e fragmentação nuclear (Figuras 12 e 13), indicando a ação de processos apoptóticos.

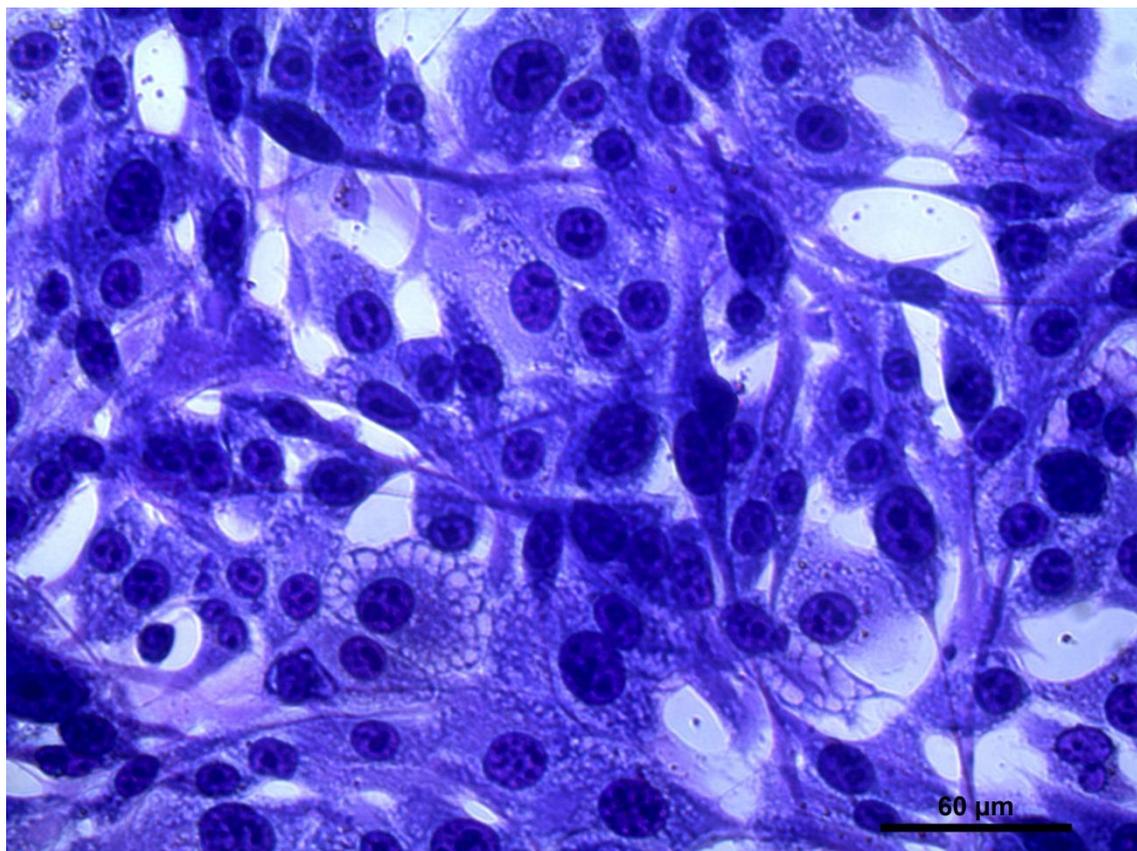


Figura 14. Células K1735 após tratamento por 48h com extrato 1 na concentração de 400 µg/mL. Presença de vacúolos no citoplasma. Avaliação através de microscópio de contraste de fase, com aumento de 400x.

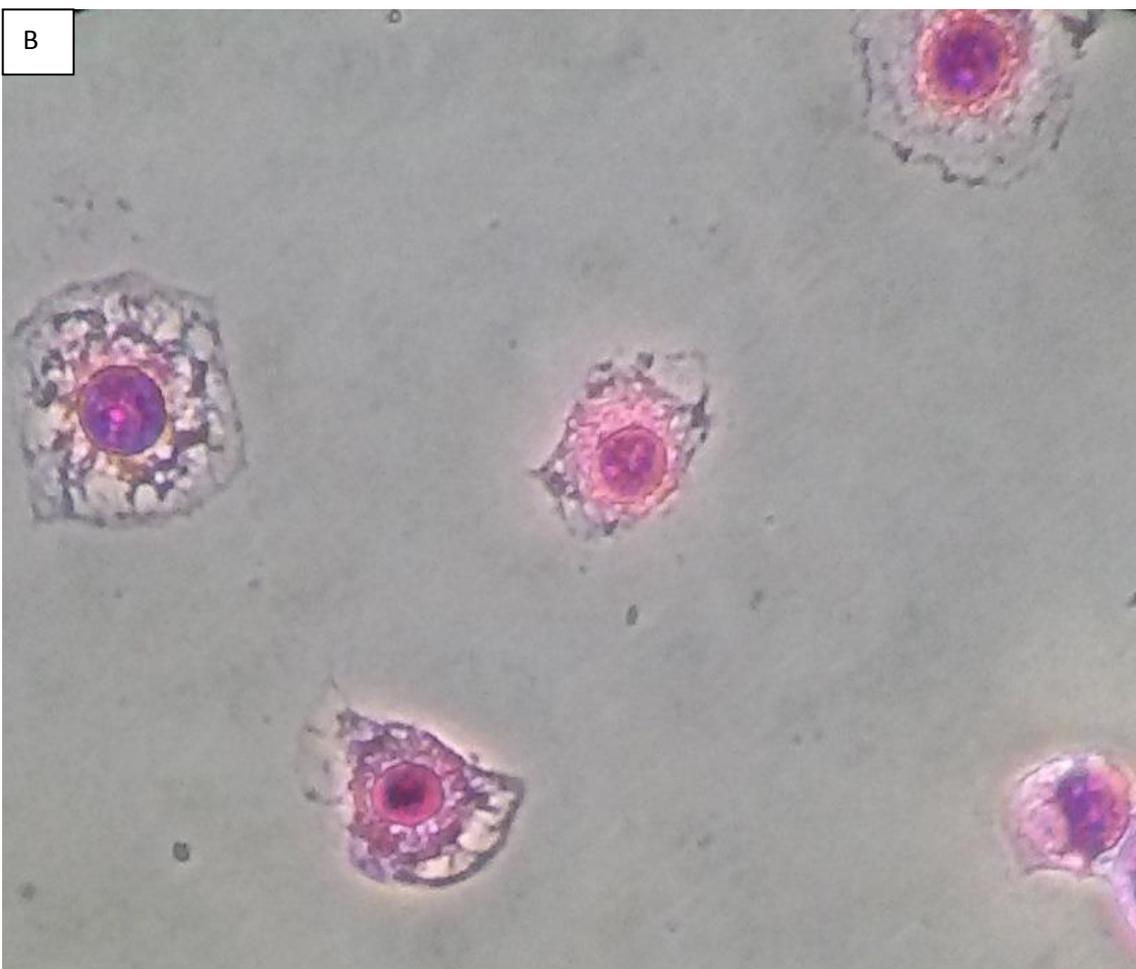
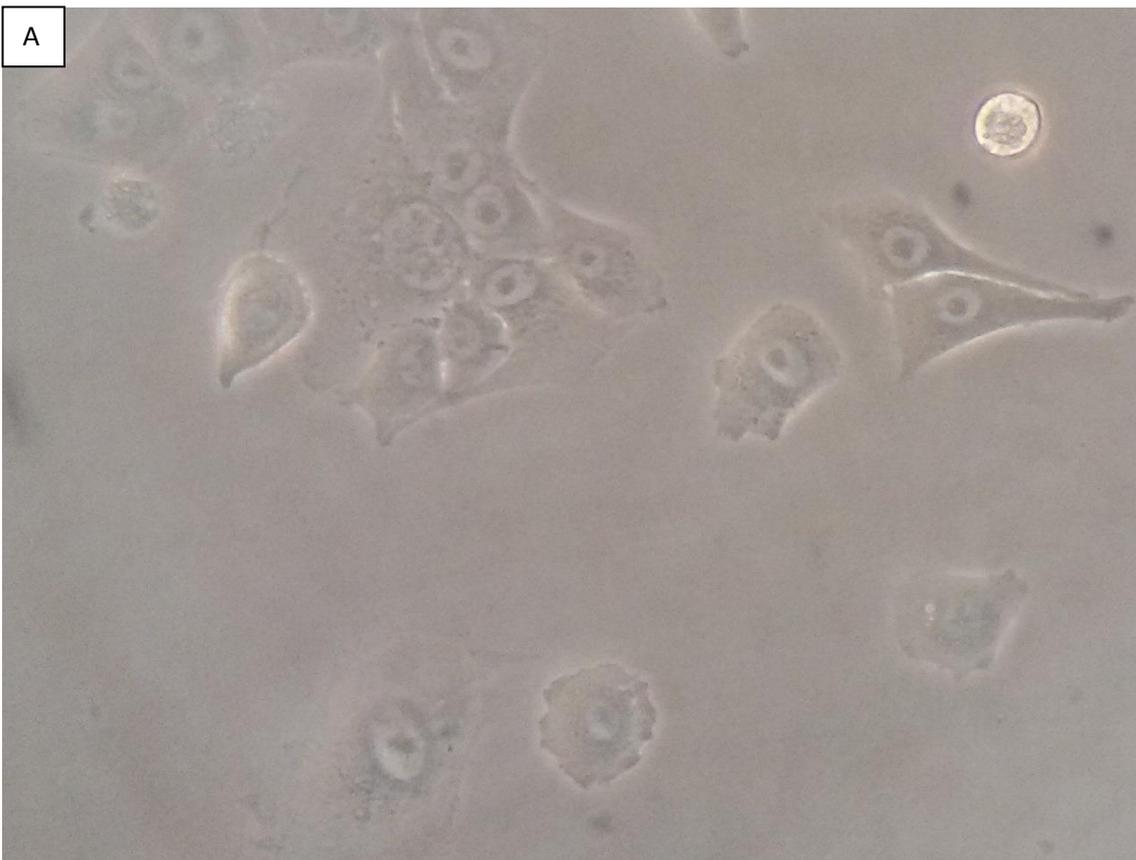


Figura 15: Análise morfológica das células K1735. A) Antes do tratamento com própolis (controle negativo). B) Após 48h de tratamento com extrato 3 de própolis. Condensação nuclear, alterações no citoesqueleto e presença de vacúolos citoplasmáticos. Avaliação através de microscópio de contraste de fase com aumento de 100x.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que os três tipos de extratos de própolis, um produto de origem natural, apresentam atividade antitumoral com potencial promissor. Foi evidenciada a atividade citotóxica destes extratos em células K1735 de melanoma murino.

Diferentes métodos analíticos são aplicados a estudos sobre a composição química de plantas e origens da própolis vermelha (LÓPEZ et al., 2014). Em um estudo anterior desta mesma equipe, com dados ainda não publicados, as amostras de própolis utilizadas neste estudo foram caracterizadas utilizando a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com espectrometria de massa e ionização por eletropulverização infusão direta (ESI (-)-MS) fingerprinting. Essa análise fornece caracterização de extratos de própolis através de perfis característicos de sua composição química identificando a maioria dos componentes polares, ácidos ou básicos (CARVALHO et al., 2011). Foi avaliado nas amostras de própolis a presença dos seguintes flavonóides: Formononetina, Biochanina A, Daidzeina e Pinocembrina. Esses compostos já haviam sido identificados originários da *Dalbergia ecastophyllum*, sendo assim serviram como referência para investigar a presença destes também nos extratos utilizados neste estudo (LÓPEZ et al., 2014). Na amostra 1 (João Pessoa) assim como na amostra 2 (Ilhéus) foi detectada a presença dos compostos Formononetina e Biochanina A, duas isoflavonas e Pinocembrina, uma flavanona. A própolis vermelha apresenta alta concentração de flavonóides, tais como Formononetina e Biochanina A (AWALE et al., 2008; LI et al., 2008) e ambos já haviam sido detectados em amostras de própolis de Sergipe (DA SILVA FROZZA et al., 2013). Segundo Li et al. (2008), a Formononetina e a Biochanina A apresentaram citotoxicidade seletiva contra células de câncer de colo 26-L5 humanos. A pinocembrina é um dos principais flavonóides presentes nos extratos de própolis e se caracteriza por possuir elevada atividade antioxidante (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2015). O composto Daidzeina não foi identificado em nenhuma dessas amostras. Diferentemente, na amostra 3, não foi observado a presença de nenhum dos quatro compostos testados, permanecendo alguns íons neste extrato desconhecidos. Sendo assim, como neste estudo a amostra 3 foi mais citotóxica que a

amostra 1 e que a amostra 2, respectivamente, podemos inferir que a atividade citotóxica elevada do extrato etanólico da amostra 3 deve-se a outros compostos que não é nenhum dos quatro testados, indicando a necessidade de proceder novos estudos sobre a composição química deste extrato de própolis promissor.

A origem provável das isoflavonas é a *Dalbergia ecastophyllum*. A amostra 3 apresentou compostos que não eram originários da *Dalbergia ecastophyllum* e isso é muito interessante, pois já haviam encontrado compostos da própolis do nordeste que não eram originados da *D. ecastophyllum* e não se sabe ainda qual a planta estaria sendo a origem vegetal destas própolis. Descobriram então a presença de benzofenonas preniladas, que devem ser provenientes de uma planta da família Clusiaceae, pois as leguminosas como a *D. ecastophyllum* não sintetizam esses compostos. Inclusive, é a primeira vez que se descobre no nordeste uma própolis marrom proveniente exclusivamente de outra planta que não seja a *Dalbergia ecastophyllum*. Sendo assim, essa amostra de própolis 3, considerada pelo nosso estudo bastante citotóxica, coletada em Ilhéus-BA, pode nos levar a uma descoberta muito importante em estudos futuros.

Outros colaboradores associados a esse grupo de pesquisa sob coordenação da professora Alexandra Sawaya continuam desenvolvendo estudos para poder identificar quem seriam os outros compostos identificados. Esse trabalho foi feito em paralelo ao presente estudo (dados não publicados).

6. CONCLUSÃO

Esse trabalho investigou a citotoxicidade induzida pelo extrato etanólico de três tipos de própolis produzidas em dois estados do nordeste brasileiro, Bahia e Paraíba, em células nunca antes estudadas sob tratamento com própolis, as células de melanoma K1735 de murinos. Buscou-se, com esta análise, fornecer informações a respeito do comportamento das células, em contato com os extratos para que estes possam, posteriormente, serem utilizados em estudos *in vivo*.

Os resultados permitem concluir que o veículo DMSO promove uma melhor dissolução dos extratos de própolis do que o veículo etanol, ambos testados nas mesmas proporções. Os extratos de própolis reduzem a viabilidade celular da linhagem K1735 de melanoma de murino de modo dose e tempo-dependente, utilizando-se o ensaio MTT próximos dos valores descritos na literatura. E também observado de modo dose-dependente através do teste de exclusão do corante Azul de tripan. Os valores de IC50 dos extratos de própolis diminuem de forma tempo-dependente.

A análise morfológica das células K1735 demonstrou através do microscópio de contraste de fase e através do microscópio óptico, com e sem coloração,, alterações como presença de grânulos em volta do núcleo e no centro dele, formação de vacúolos citoplasmáticos, formação de *blebbings* de membrana, alterações no citoesqueleto, prolongamentos dendríticos acentuados, arredondamento celular e fragmentação nuclear. As alterações ocorreram de forma proporcional ao aumento das concentrações utilizadas, sugerindo um efeito citotóxico dose-dependente.

Os extratos de própolis do nordeste brasileiro induziram morte por apoptose tardia e necrose nas células tumorais K1735, sendo promissores candidatos no tratamento de neoplasias e estes resultados são pioneiros para este tipo celular.

REFERÊNCIAS

- ABO-ZEID, M. A. M. et al. Molecular cytogenetic evaluation of the efficacy of photodynamic therapy by indocyanine green in breast adenocarcinoma MCF-7 cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 2, p. 194-202, 2013. ISSN 1572-1000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100012001111> >.
- ABU BAKAR, M. F. et al. Cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cell lines exposed to an extract of the seed kernel of *Mangifera pajang* (bambangan). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1688-1697, 2010. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151000195X> >.
- AHN, M. R. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 235-243, 2007. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34249339750&partnerID=40&md5=177ebb07b0c4019d077781c963f765b9> >.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410700284X> >.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: CRUZ, F. O. (Ed.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro, v.2, 2010. p.290.
- AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-189, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-38049034385&partnerID=40&md5=958f7a088b33849f600744e4a4f4776c> >.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1432-1438, 2014. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711314002104> >.
- BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033976532&partnerID=40&md5=fe6adb03eb7b79164559f904d38db037> >.

BANSKOTA, A. H. et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2001. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304700033> >.

BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410000252X> >.

BARBARIĆ, M. et al. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 772-778, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79957501869&partnerID=40&md5=3f4086cb22e316f044667da7ce083099> >.

BATISTA, R. O. F. **Caracterização química, atividade antioxidante e citotóxica de três amostras de própolis da região Nordeste do Brasil**. 2013. 49p Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.2013.

BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036273674&partnerID=40&md5=14634a2d1a5932eb3e494a03eac4bd45> >.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374-380, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84893427595&partnerID=40&md5=7f3e0a2377f97996f27dbfd9ea5bd0ac> >.

CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610016444> >.

CARVALHO, A. J. S.; ISHIKAWA, T.; GOUVÊA, C. M. C. P. Aqueous extract of *Plinia edulis* leaves: Antioxidant activity and cytotoxicity to human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**, v. 81, n. 0, p. 1-7, 2012. ISSN 0254-6299. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629912000415> >.

CENIĆ-MILOŠEVIĆ, D. et al. Antiproliferative effects of *Tanacetum parthenium*, *Hypericum perforatum* and propolis on HeLa cells. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 2, p. 705-712, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84903955416&partnerID=40&md5=8892059e0d3676f4fc810bb9904c0faf> >.

CHAN, G. C. F.; CHEUNG, K. W.; SZE, D. M. Y. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 44, n. 3, p. 262-273, 2013. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84877876080&partnerID=40&md5=3b7876a2389e11cefa0771aec00b4beb> >.

CHARRAS, G. T. et al. Life and Times of a Cellular Bleb. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 5, p. 1836-1853, 2008. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349508706222> >.

CHEN, C.-R. et al. Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay in vitro. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 38, n. 3-4, p. 191-196, 2007. ISSN 0368-1653. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0368165307000688> >. Acesso em: 2007/7//.

CHOI, Y. D. et al. Amelanotic acral melanomas: Clinicopathological, BRAF mutation, and KIT aberration analyses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 5, p. 700-707, 2013. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962213006701> >.

CLARK, ANDREW G.; DIERKES, K.; PALUCH, EWA K. Monitoring Actin Cortex Thickness in Live Cells. **Biophysical Journal**, v. 105, n. 3, p. 570-580, 2013. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349513006450> >.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106001851> >.

DA SILVA FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, n. 0, p. 137-142, 2013. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512008204> >.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-

441, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-56749158177&partnerID=40&md5=f73b49c4a76df4df2b1de502c770b4b6> >.

DE MELO, G. C. et al. Effect of Brazilian Red Propolis on the Development and Immunohistochemical Expression of Ki-67 and p16INK4A in DMBA-Induced Oral Squamous Cell Carcinomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 119, n. 3, p. e213, 2015. ISSN 2212-4403. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212440314011924> >.

DE MESQUITA, M. L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109001688> >.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175986903686> >.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4246-4253, 2012. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512006400> >.

DÍAZ-CARBALLO, D. et al. The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9635-9643, 2008. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089608009711> >.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427405001967> >.

FRANCHI JR, G. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-81555217952&partnerID=40&md5=078fd6e039623232fad37f1a814a2be9> >.

GARDANA, C. et al. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 390-399, 2007. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-3534888888&partnerID=40&md5=52ef18cdb73c1c0233518f1b031eefa8> >.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220-1234, 2006. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33646845278&partnerID=40&md5=140f6bbd90a13c35e7567bfc895ac37d> >.

GONZALEZ, R. J.; TARLOFF, J. B. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 3, p. 257-259, 2001. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233301000145> >.

GU, Y. et al. Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 468-476, 2012. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84864149974&partnerID=40&md5=ed5eae16e631c0e8437f786571d9f2ec> >.

GUNDUZ, C. et al. Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity. **Leukemia Research**, v. 29, n. 11, p. 1343-1346, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-24744458805&partnerID=40&md5=873d8f1f4dd51acfc8607140a1a66bc6> >.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 5, p. 703-710, 2004. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233304000633> >.

JORGE, R. et al. Brazilian propolis: Seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 12, p. 889-893, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349806648&partnerID=40&md5=acb796fe74d90807ffcbb698b78fadd7> >.

KAI, H. et al. In vitro and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 0, p. 214-223, 2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001170> >.

KASOTE, D. et al. Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, n. 0, p. 156-163, 2014. ISSN 0305-1978. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197814000982> >.

KIM, H. et al. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**, v. 184, n. 1, p. 13-17, 2009. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427408012927> >.

KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF, A. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. **Anaerobe**, v. 16, n. 6, p. 566-571, 2010. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78650534678&partnerID=40&md5=6d8fd395599cd69017fabcd0d11d79da> >.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603002164> >.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-5440, 2008. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089608003295> >.

LINK, A.; BALAGUER, F.; GOEL, A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1771-1792, 2010. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295210004703> >.

LIU, Q. Y. et al. Decitabine, independent of apoptosis, exerts its cytotoxic effects on cell growth in melanoma cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 423-429, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80054091266&partnerID=40&md5=c8d20e01b4f294de615f462c7fcc0963> >.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174-180, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84884970806&partnerID=40&md5=5d5b1ab65b7b29c1553770fd906e7a3f> >.

MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R.; PEREIRA, R. M. S. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 211-215, 2006.

MENEGHELLI, C. et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. **Microvascular Research**, v. 88, n. 0, p. 1-11, 2013. ISSN 0026-2862. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026286213000320> >.

MISHIMA, S. et al. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 20, p. 5814-5818, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-24344487377&partnerID=40&md5=5cd08312122ad371dc765dd49dcabc08> >.

MOTOMURA, M. et al. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 61-67, 2008. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668908000203> >.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 6, p. 433-437, 2014. ISSN 2222-1808. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180814606010> >.

NOVAK, E. M. et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. 0, p. 91-102, 2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614002928> >.

PALUCH, E. K.; RAZ, E. The role and regulation of blebs in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 582-590, 2013. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067413000793> >.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. D. CLASSIFICAÇÃO DAS PRÓPOLIS BRASILEIRA A PARTIR DE SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS. **Mensagem Doce**, v. 58, p. 03-11, 2000.

PERES, C. M.; CURI, R. **COMO CULTIVAR CÉLULAS**. GUANABARA KOOGAN, 2005. 283p.

PINHEIRO, K. S. et al. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 111-117,

2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84895106663&partnerID=40&md5=ff2aa48627c9f025118c2046b939c4c4> >.

POZZOLINI, M. et al. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. **Analytical Biochemistry**, v. 313, n. 2, p. 338-341, 2003. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269702006310> >.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: IN: SITTAMPALAM, G. S. G.-E., N. ET AL. (Ed.). **Assay Guidance Manual**: Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

ROLLINO, C. et al. False positive results with MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 1, p. 141-143, 1995. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175995001716> >.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-24344444003&partnerID=40&md5=10aad883e326dc6dd23d89b33dec3d09> >.

SEDA VATANSEVER, H. et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 6, p. 546-556, 2010. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957148889&partnerID=40&md5=a7d27dad7903a444dcfc793f42739f98> >.

SEKYROVA, P.; ÖSTBLOM, J.; ANDÄNG, M. Blebbing as a physical force in cancer EMT – Parallels with mitosis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 5–6, p. 369-373, 2012. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X12000831> >.

SERAFIM, T. L. et al. Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells-Nuclear vs. mitochondrial effects. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1459-1475, 2008. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-55949119796&partnerID=40&md5=d2027f3f31059aa5a60cd5bfb6da294d> >.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411000735X> >.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796,

2012. ISSN 0065-1281. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128112000190>>.

SULAIMAN, G. M. et al. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2415-2421, 2011. ISSN 0278-6915. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511003048>>.

SULAIMAN, G. M. et al. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1632-1641, 2012. ISSN 0278-6915. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151200049X>>.

TAGLIACOLLO, V. A.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Quality of propolis commercialized in the informal market. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 752-757, 2011. Disponível em: <
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80055023384&partnerID=40&md5=5867acad8077908ff8079aa409fedb09>>.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

TYNGA, I. M.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. The primary subcellular localization of Zinc phthalocyanine and its cellular impact on viability, proliferation and structure of breast cancer cells (MCF-7). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, n. 0, p. 171-176, 2013. ISSN 1011-1344. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134412002552>>.

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 86-92, 2011. ISSN 0278-6915. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510006113>>.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D. et al. Study of the molecular structure and chemical reactivity of pinocembrin by DFT calculations. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1058, n. 0, p. 21-27, 2015. ISSN 2210-271X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210271X15000419>>.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2147-2151, 2011. ISSN 0887-2333. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233311001974>>.

WATANABE, M. A. E. et al. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: A review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378-1386, 2011. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80054106552&partnerID=40&md5=b730413be050cc45515bd8a2ddb9d9d5> >.

WU, J. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. **Cancer Letters**, v. 308, n. 1, p. 43-53, 2011. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383511002254> >.

XUAN, H. et al. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 78-85, 2011. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510006101> >.

YEŞİL, S. et al. Amelanotic melanoma misdiagnosed as a diabetic foot ulcer. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 21, n. 5, p. 335-337, 2007. ISSN 1056-8727. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872706000547> >. Acesso em: 2007/10//.

ZUCCO, F. et al. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 2, p. 153-163, 2004. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233303001474> >.