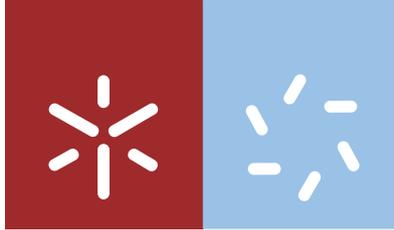


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Tânia Isabel Fernandes de Oliveira

**Efeitos tóxicos de amostras de própolis  
Portuguêses: potencial antioxidante e atividades  
biológicas de extratos e misturas**



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Tânia Isabel Fernandes de Oliveira

**Efeitos tóxicos de amostras de própolis  
Português: potencial antioxidante e atividades  
biológicas de extratos e misturas**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e  
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Ana Cristina Gomes da Cunha**  
da  
**Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar**  
e do  
**Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira**

abril de 2015

## Declaração

**Nome:** Tânia Isabel Fernandes de Oliveira

**Endereço eletrónico:** taniaoliveira\_5@hotmail.com

**Telefone:** 963649750

**Número do Bilhete de Identidade:** 13427480

**Título da dissertação:** Efeitos tóxicos de amostras de própolis Português: potencial antioxidante e atividades biológicas de extratos e misturas

**Orientadores:** Doutora Ana Cristina Gomes da Cunha, Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar e Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira

**Ano de conclusão:**

2015

**Dissertação de Mestrado em:**

Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas

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

Universidade do Minho, 30/04/2015

**Assinatura:**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à minha família, especialmente à minha mãe e a todos os amigos pelo amor, carinho, apoio e sobretudo paciência. Agradeço também ao meu namorado, António Melo, por toda a força e o apoio e por se mostrar sempre disponível nos bons e maus momentos.

Também quero agradecer do fundo do coração aos meus orientadores, Doutora Ana Cristina Gomes da Cunha, Doutora Cristina Alexandra de Almeida Aguiar e Doutor Rui Pedro Soares de Oliveira, por todo o conhecimento transmitido, pela confiança, por todo o apoio e pela amizade que me deram ao longo desta “caminhada”. Quero ainda agradecer às professoras do departamento de Química, Doutora Dulce Geraldo e Doutora Fátima Bento por todo o apoio e conhecimento transmitidos na área da química.

Também quero agradecer a todos os colegas do Laboratório de Genética e Ambiente, nomeadamente, Joana Guedes, Tiago Lourenço, Cláudio Oliveira, Ana Freitas, Rita Marques e todos os restantes pela ajuda e companhia no trabalho laboratorial. Para alguém destes, agradeço também às colegas de licenciatura, Ana Teixeira, Joana Lourenço e Carina Araújo que acompanharam o meu trabalho e me ajudaram na sua realização.

Finalmente, quero demonstrar a minha gratidão por todo pessoal técnico e auxiliar do Departamento de Biologia por toda prontidão e auxílio na realização deste trabalho, sem eles isto não seria possível. Em especial quero agradecer ao Luís Correia e à Cristina Ribeiro pela disponibilidade e paciência com todos os investigadores e projetistas.

Quero ainda agradecer a todos os apicultores que colaboram com a Universidade pois sem eles este trabalho não seria possível.

## Efeitos tóxicos de amostras de própolis Portugêses: potencial antioxidante e atividades biológicas de extratos e misturas

### Resumo

O própolis, também conhecido por “cola de abelha”, é uma mistura complexa produzida por abelhas, a partir de flores, rebentos foliares e exsudados de plantas. Tem sido usado pelo Homem desde a antiguidade (3000 a.C.), por diferentes civilizações, estando atualmente descritas várias propriedades biológicas e farmacológicas, nomeadamente, antimicrobiana, antioxidante, antitumoral entre outras. Sendo considerado uma das misturas mais heterogêneas produzidas por seres vivos, as características e a composição química do própolis variam de local para local, dependendo da raça das abelhas, da biodiversidade vegetal da região e da estação do ano, tornando a padronização da composição química e classificação quanto às suas propriedades um desafio quando se tem em vista a comercialização deste produto natural.

Com este trabalho pretendeu-se construir uma base de dados de extratos etanólicos e *n*-hexano de amostras de própolis portuguesas estudadas ao longo dos anos 2008 e 2013 pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, organizados por eficiências de atividades biológicas específicas e por eficiência de bioatividade global. Após seleção de alguns extratos etanólicos (EE) mais bioativos e menos bioativos e preparação de misturas binárias, estudou-se o seu potencial antioxidante por voltametria cíclica, propriedades antimicrobianas pelo método de diluição em placa e fitotóxicas por efeitos no crescimento de plantas *in vitro*. Um estudo preliminar de avaliação de eventuais efeitos sinérgicos/antagonísticos entre os EE e antibióticos comerciais foi também realizado. Relativamente à atividade antimicrobiana concluiu-se que os extratos/misturas de extratos etanólicos são mais ativos contra leveduras que contra bactérias e as Gram-positivas apresentam uma maior sensibilidade que as Gram-negativas. Vislumbrou-se ainda a possibilidade de combinação com antibióticos comerciais de modo a diminuir a sua dosagem. A voltametria mostrou que existem extratos com uma capacidade antioxidante elevada, e que, alguns extratos, embora com menor capacidade, possuem compostos que se oxidam mais facilmente. Relativamente aos efeitos fitotóxicos, alguns extratos/misturas exerceram uma dramática inibição do crescimento radicular sendo a raiz um órgão muito sensível. Este trabalho revelou que a combinação de amostras distintas é uma abordagem valiosa para a identificação de novas bioatividades, como também de potenciar atividades biológicas já reconhecidas, abrindo a possibilidade de criação de produtos de interesse comercial com propriedades específicas para utilização humana.

## Toxic effects of Portuguese propolis samples: antioxidant potential and biological activities of extracts and mixtures

### Abstract

Propolis, also known as "bee glue" is a complex mixture produced by bees from flowers, leaf buds and plant exudates. The word propolis comes from the Greek pro- defense and polys- city or community, which means "community defense". It has been used by humans since ancient times (3000 BC), for different civilizations, and various biological and pharmacological properties are currently described, in particular, antimicrobial, antioxidant, antitumor, among others. It is considered one of the most heterogeneous mixtures produced by living beings, the characteristics and the chemical composition of propolis vary from place to place, depending on the breed of bees, plant biodiversity of the region and the season of the year, making the standardization of chemical composition and the classification of its properties a challenge when marketing of this natural product is foreseen.

With this work a database of the ethanol and *n*-hexane extracts of Portuguese propolis samples studied over the years 2008 to 2013 by the research group on propolis of the Department of Biology UMinho was set and organized by specific biological activities and global bioactivity efficiency. After the selection of some ethanol extracts (EE) more bioactive and less bioactive and preparation of their binary mixtures, several biological properties were assessed: antioxidant capacity by cyclic voltammetry, antimicrobial by dilution assay method and phytotoxic by growth analysis of *in vitro* plants. A study assessing the possible synergistic/antagonistic effects between EE and commercial antibiotics was also performed. Concerning the antimicrobial activity it was found that the ethanolic extracts / mixtures were more active against yeasts than bacteria and Gram-positive bacteria exhibit greater susceptibility than Gram-negative. The combination with commercial antibiotics in order to reduce their dosage seems also to be possible. The voltammetry showed that there are extracts with a high antioxidant capacity, and that some extracts although of low antioxidant capacity present compounds that oxidize more easily. With regard to phytotoxic effects, some extracts exerted a dramatic inhibition in early root growth being the root the most sensitive organ. This work has revealed that the combinations of samples is a valuable approach allowing to identify new bioactivities and to potentiate the efficiency of other, opening the possibility for creating commercially interesting products for human use.

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. O que é o própolis?.....	1
1.2. Características e composição química do própolis.....	3
1.3. Propriedades biológicas do própolis.....	6
1.3.1. Atividade antimicrobiana.....	6
1.3.2. Atividade antioxidante.....	7
1.3.3. Atividade antitumoral.....	9
1.3.4. Atividade fitotóxica.....	10
1.3.5. Outras propriedades biológicas do própolis.....	11
1.4. Objetivos.....	12
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Construção de uma base de dados de extratos etanólicos e <i>n</i> -hexano de amostras de própolis.....	13
2.2. Origem das amostras.....	14
2.3. Seleção de extratos e de combinações de extratos.....	17
2.4. Preparação dos extratos etanólicos.....	18
2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	18
2.5.1. Microrganismos.....	18
2.5.2. Meios e condições de cultura.....	19
2.5.3. Determinação dos valores de MIC.....	19
2.6. Avaliação da interação de EE de própolis com antibióticos comerciais.....	20
2.6.1. Preparação do pré-inóculo.....	21
2.6.2. Ensaio de difusão em disco.....	22
2.7. Avaliação da atividade antioxidante por voltametria cíclica.....	22
2.8. Atividade fitotóxica.....	23
2.8.1. Extratos e combinações de extratos etanólicos de própolis.....	23
2.8.2. Modelo vegetal de suscetibilidade.....	23
2.8.3. Meio de germinação das sementes.....	23
2.8.4. Preparação de meios de cultura com EE de própolis.....	24
2.8.5. Desinfecção e inoculação de sementes e análise de crescimento das plântulas.....	24

2.8.6. Análise estatística.....	25
3. Resultados e discussão.....	26
3.1. Base de dados de extratos etanólicos e <i>n</i> -hexano de própolis português...26	
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e misturas de própolis.....	33
3.2.1. Determinação dos valores de Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	33
3.2.2. Caracterização da eficiência antimicrobiana.....	36
3.3. Interação entre própolis e antibióticos comerciais.....	42
3.4. Determinação da capacidade antioxidante dos diferentes extratos etanólicos e misturas de própolis por voltametria cíclica.....	44
3.4.1. Calibração com ácido gálico.....	44
3.4.2. Análise dos extratos etanólicos e misturas.....	47
3.4.2.1. Extratos Isolados.....	48
3.4.2.2. Misturas de extratos etanólicos.....	52
3.5. Efeito dos diferentes extratos etanólicos e misturas no desenvolvimento de plântulas de linho crescidas <i>in vitro</i> .....	55
3.6. Eficiência global dos EE e misturas de própolis.....	58
4. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	61
5. Bibliografia.....	64
Anexos.....	73
Anexo1 – Atividade antimicrobiana.....	73
Anexo 2 – Capacidade antioxidante.....	79
Anexo 3 – Atividade fitotóxica.....	90

## Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

A – Área

**ABTS** – 2,2'-azínbis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido-sulfónico

**ADN** - ácido desoxirribonucleico

**AH.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis colhido em Angra do Heroísmo (Açores), em 2009

**AH.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Angra do Heroísmo (Açores), em 2009

**AH.10.EE** - Extrato etanólico de própolis, colhido em Angra do Heroísmo (Açores), em 2009

**ATP** - Adenotrifostato

**B.09.FrE**- Fração residual do extrato etanólico de própolis colhido em Biscoitos (Açores), em 2009

**B.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Biscoitos (Açores), em 2009

**B.10.EE** - Extrato etanólico, colhido em Biscoitos (Açores), em 2010

**BrdU** – Bromodioxiridina

**C.10.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Cõa, em 2010

**C.10.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis, colhido em Cõa, em 2010

**C.10.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Cõa, em 2010

**C.10.HE** - Extrato de *n*-hexano de própolis colhido em Cõa, em 2010

**CAPE** – Fenil estér do ácido cafeico

**CFU** – Número de unidades formadoras de colónias

**DPPH** - 1,1-difenil-2-picrihidrazil

**EE** - Extrato etanólico

**Ep** – Potencial de pico anódico

**G.11.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido no Gerês, em 2011

**G.11.HE** - Extrato *n*-hexano de própolis colhido no Gerês, em 2011

**G.12.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido no Gerês, em 2012

**G.12.HE** - Extrato *n*-hexano de própolis colhido no Gerês, em 2012

**HE** - Extrato *n*-hexano

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**HSV** - Vírus herpes simplex

**Ip** - Intensidade de corrente

**L.08.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Leiria, em 2008

**L.08.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Leiria, em 2008

**L.09.FrC** - Fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico de própolis colhido em Leiria, em 2008

**L.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis colhido em Leiria, em 2009

**L.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Leiria, em 2009

**La.09.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Lages (Açores), em 2009

**La.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis colhido em Lages (Açores), em 2009

**La.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Lages (Açores), em 2010

**La.10.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Lages (Açores), em 2010

**LB** – Luria-Bertani  
**LBA** – Luria-Bertani Agar  
**MIC** - Concentração mínima inibitória  
**MS** – Murashige e Skoog  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – Oxigénio singlete  
**O.08.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Ourém, em 2008  
**O.08.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Ourém, em 2008  
**P.10.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Pereiro (Guarda), em 2010  
**P.10.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis colhido em Pereiro (Guarda), em 2010  
**P.10.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis colhido em Pereiro (Guarda), em 2010  
**P.10.HE** - Extrato *n*-hexano de própolis colhido em Pereiro (Guarda), em 2010  
**P.12.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em Pereiro (Guarda), em 2012  
**P.12.HE** - Extrato *n*-hexano colhido em Pereiro (Guarda), em 2012  
**PA** - Pluquetiona A  
**PSII** – Fotossistema II  
**PV.09.EE** - Extrato etanólico colhido em Póvoa do Varzim (Porto), em 2009  
**PV.09.HE** – Extrato *n*-hexano colhido em Póvoa do Varzim (Porto), em 2009  
**ROS** – Espécies reativas de oxigénio  
**SB.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico colhido em São Brás (Açores), em 2009  
**SB.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico colhido em São Brás (Açores), em 2009  
**SB.10.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em São Brás (Açores), em 2009  
**SM.09.EE** – Extrato etanólico de própolis colhido em São Mateus, (Açores), em 2009  
**SM.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico colhido em São Mateus (Açores), em 2009  
**SM.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico colhido em São Mateus (Açores) em 2009  
**SM.10.EE** - Extrato etanólico de própolis colhido em São Mateus (Açores) em 2009  
**UMinho** – Universidade do Minho  
**VNC.09.FrC** - Fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico, colhido em Vila Nova de Cerveira, em 2009  
**VNC.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis, colhido em Vila Nova de Cerveira, em 2009  
**VNC.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis, colhido em Vila Real, em 2009  
**VR.09.FrC** - Fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico de própolis de colhido em Vila Real, em 2009  
**VR.09.FrEr** - Fração residual do extrato etanólico de própolis de colhido em Vila Real, em 2009  
**VR.09.FrH** - Fração solúvel em *n*-hexano do extrato etanólico de própolis de colhido em Vila Real, em 2009  
**VSV** - Vírus da estomatite vesicular  
**YPD** – Yeast Peptone Dextrose  
**YPDA** – Yeast Peptone Dextrose Agár

## Lista de figuras

**Figura 1:** Abelha colhendo exsudados de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Autor: Michel Stórquio Belmiro. <http://revistaplaneta.terra.com.br/secao/saude/o-presente-das-abelhas-propolis>

**Figura 2:** Própolis a isolar fenda numa colmeia. Fonte <http://www.magievegetale.fr/precis/images/sante/abeille-propolis.jpg>.

**Figura 3:** Localização dos apiários de origem das amostras de própolis.

**Figura 4:** Esquema representativo da distribuição numa placa de petri das 4 diluições de 2 culturas microbianas (A e B), cada uma das quais testadas em triplicado (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>).

**Figura 5:** A) Potenciostato Autolab PGSTAT30. Fonte: <http://www.egr.msu.edu/~scb-group-web/blog/wp-content/uploads/2012/07/200746395941732.jpeg> B) Eléttodos serigrafados com eléttodos de trabalho e auxiliar de carbono e eléttodo de referência de prata da DropSens (C110). Fonte: <http://www.dropsens.com/en/img/productos/electrodos/110.jpg>

**Figura 6:** Esquema representativo da distribuição dos meios com diferentes extratos de própolis e respectivas combinações ou sem adição de EE (controle). Cada condição foi testada usando 4 replicados (#1 a #4).

**Figura 7:** Percentagem de inibição de *C. albicans* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem a um desvio-padrão.

**Figura 8:** Percentagem de inibição de *S. cerevisiae* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem a um desvio-padrão.

**Figura 9:** Percentagem de inibição de *E. coli* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem a um desvio-padrão.

**Figura 10:** Percentagem de inibição de *B. subtilis* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem a um desvio-padrão.

**Figura 11:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, do ácido gálico com concentrações: 0,0200; 0,0600; 0,100; 0,200; 0,400; 0,600; 0,800 e 1,000 mM em tampão fosfato pH 3,2. O potencial foi medido relativamente ao pseudo- eléttodo de referência de Ag incorporado no SPE.

**Figura 12:** Retas de calibração obtida a partir da intensidade de pico anódica (I<sub>pa</sub>) em função da concentração de ácido gálico.

**Figura 13:** Retas de calibração da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V (A) e integrada de 0 V a 0,800 V (B), em função da concentração de ácido gálico.

**Figura 14:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, do extrato C.10, com concentrações crescentes: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul). O potencial foi medido relativamente ao eléttodo de referência de Ag.

**Figura 15:** Retas de calibração obtida a partir da intensidade de pico anódica em função da concentração de extrato etanólico C.10.

**Figura 16:** Retas de calibração obtida a partir da área sob o voltamograma, integrada de 0 V a 0,45 (A) e de 0 V a 0,80 V (B), em função da concentração de extrato etanólico C.10.

**Figura 17:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, para os extratos etanólicos com concentrações 0,002 g/ml, PV.09 (vermelho), P.10 (azul), C.10 (verde), P.12 (azul ciano) e SB.10 (preto). O potencial foi medido relativamente ao eletrodo de referência de Ag.

**Figura 18:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, para as misturas de extratos com C.10, P.10xC.10 (vermelho), P.12xC.10 (azul), PV.09xC.10 (verde) e SB.10xC.10 (azul ciano).

**Figura 19:** Voltamograma experimental para a mistura P.12xC.10 (azul) e voltamograma resultante da soma dos voltamogramas dos extratos isolados normalizado para a concentração (verde).

**Figura 20:** Placas de 24 poços com diferentes extratos/misturas etanólicos de própolis a uma concentração 200 µg/ml no 3º dia (A), 8º dia (B) e 15º dia (C e D). Em cada uma das 6 colunas são inoculados os extratos, misturas ou o solvente (controlo negativo) havendo 4 replicados (4 linhas) por tratamento, cada um com 2 sementes.

**Figura 21:** Comprimento médio (n= 8) e respectivo desvio-padrão de raízes de plântulas de linho ao fim de 15 dias. As plântulas cresceram em meio MS com adição de extratos/misturas etanólicos de própolis numa concentração de 200 µg/ml.

**Figura 22:** Comprimento médio (n= 8) e respectivo desvio-padrão de hypocótilos de plântulas de linho ao fim de 15 dias. As plântulas cresceram em meio MS com adição de extratos/misturas etanólicos de própolis numa concentração de 200 µg/ml.

**Figura A1.1:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *C. albicans* e *S. cerevisiae* em placas com extratos etanólicos de própolis incorporados no meio YPD em diferentes concentrações.

**Figura A1.2:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *C. albicans* e *S. cerevisiae* em placas com misturas de extratos etanólicos de própolis incorporados no meio YPD em diferentes concentrações.

**Figura A1.3:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *E. coli* e *B. subtilis* em placas com extratos etanólicos de própolis incorporados no meio LB em diferentes concentrações.

**Figura A1.4:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *E. coli* e *B. subtilis* em placas com misturas de extratos etanólicos de própolis incorporados no meio LB em diferentes concentrações.

**Figura A2.1:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato SB.10, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).

**Figura A2.2:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato PV.09, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).

**Figura A2.3:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato P.10, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).

**Figura A2.4:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato C.10, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).

**Figura A2.5:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xPV.09, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).

**Figura A2.6:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xP.10, com concentrações: 0,001 g/ml (azul), 0,002 g/ml (roxo), 0,005 g/ml (preto), 0,01 g/ml (azul ciano) e 0,02 g/ml (verde).

**Figura A2.7:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xP.12, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).

**Figura A2.8:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xSB.10, com concentrações: 0,001 g/ml (azul ciano), 0,002 g/ml (verde), 0,005 g/ml (azul) e 0,01 g/ml (vermelho).

**Figura A2.9:** Representação gráfica da intensidade de pico anódica ( $I_{pa}$ ) em função da concentração do extrato P.10 e a sua mistura com C.10.

**Figura A2.10:** Representação gráfica da intensidade de pico anódica ( $I_{pa}$ ) em função da concentração do extrato SB.10 e a sua mistura com C.10.

**Figura A2.11:** Representação gráfica da intensidade de pico anódica ( $I_{pa}$ ) em função da concentração do extrato PV.09 e a sua mistura com C.10.

**Figura A2.12:** Representação gráfica da intensidade de pico anódica ( $I_{pa}$ ) em função da concentração do extrato P.12 e a sua mistura com C.10.

**Figura A2.13:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato P.10 e respetiva mistura com C.10.

**Figura A2.14:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato SB.10 e respetiva mistura com C.10.

**Figura A2.15:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato PV.09 e respetiva mistura com C.10.

**Figura A2.16:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato P.12 e respetiva mistura com C.10.

**Figura A2.17:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato P.10 e mistura com C.10.

**Figura A2.18:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato SB.10 e mistura com C.10.

**Figura A2.19:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato PV.09 e mistura com C.10.

**Figura A2.20:** Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato P.12 e mistura com C.10.

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Código de amostras estudadas ao longo dos anos 2008 e 2013 pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, localização do apiário, ano de colheita, tipo de extrato e autor.

**Tabela 2:** Código das amostras de própolis estudadas no presente trabalho, localizações geográficas dos respectivos apiários e ano de colheita.

**Tabela 3:** Extratos etanólicos selecionados e misturas utilizadas no presente trabalho (a cinza escuro indicam-se as amostra consideradas mais bioativas e a cinza claro as menos bioativas).

**Tabela 4:** Percentagens de eficiências antimicrobianas obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo de 6 anos (2008-2013), por diferentes metodologias, ordenada por ordem decrescente de eficiência antimicrobiana global. Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

**Tabela 5:** Percentagens de eficiências fitotóxicas obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo de 6 anos (2008-2013), onde se avaliou o comprimento (mm) da raiz, hipocótilo e epicótilo, bem como o a eficiência do fotossistema II (PSII) em culturas *in vitro* de plântulas de linho (*Linum usitatissimum* L.). Esta lista está organizada por ordem decrescente de eficiência fitotóxica global. Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

**Tabela 6:** Percentagens de eficiências antioxidantes obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo dos anos 2008-2013, por diferentes metodologias, ordenada por ordem decrescente de eficiência antioxidante global. Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

**Tabela 7:** Percentagens de eficiências antitumorais e genotóxicas obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo de 6 anos (2008-2013). Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

**Tabela 8:** Lista ordenada dos diferentes extratos etanólicos e hexânicos de própolis estudados relativamente à eficiência biológica global (%).

**Tabela 9:** Concentração mínima inibitória [MIC] ( $\mu\text{g/ml}$ ) das misturas de própolis contra as duas leveduras estudadas.

**Tabela 10:** Concentração mínima inibitória [MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )] das misturas de EE de própolis contra as duas bactérias estudadas.

**Tabela 11:** Eficiência relativa através da razão entre o valor médio do diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano produzido por um antibiótico comercial incubado simultaneamente com um extrato/mistura de própolis e o valor médio obtido apenas na presença do antibiótico (ampicilina (amarelo); tetraciclina (cinza); cloranfenicol (roxo); ciprofloxacina (cor-de-laranja) e eritromicina (bordô)). A negrito encontram-se os valores acima de um e a vermelho igual a um.

**Tabela 12:** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 11 do ácido gálico.

**Tabela 13:** Equações das retas de calibração representadas nas figuras 12 e 13 e respetivos coeficientes de correlação (*r*).

**Tabela 14:** Limites de deteção e de quantificação estimados a partir dos dados apresentados nas figuras 12 e 13.

**Tabela 15:** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas relativos ao extrato C.10.

**Tabela 16:** Equações das retas de calibração representadas nas figuras 15 e 16 e respectivos coeficientes de correlação ( $r$ ).

**Tabela 17:** Valores médios obtidos para a capacidade antioxidante dos diferentes extratos, expressa em equivalente de ácido gálico, estimados a partir das intensidades de corrente do primeiro pico de oxidação ( $I_{pa}$ ) e das áreas sob os voltamogramas integradas entre 0 V e 0,425 V (A1) e entre 0 V e 0,800 V (AT).

**Tabela 18:** Percentagens equivalentes expressas em ácido gálico por 0,1 g/ml de EE isolados avaliadas a partir de diferentes parâmetros eletroquímicos.

**Tabela 19:** Resultados obtidos em equivalente de ácido gálico presente nas misturas dos extratos com C.10, considerando a quantificação por cada parâmetro eletroquímico.

**Tabela 20:** Percentagens de ácido gálico por 0,1 g/ml de própolis avaliado considerando cada parâmetro eletroquímico nas misturas de extratos.

**Tabela 21:** Bioatividades avaliadas nos vários EE e misturas de própolis.

**Tabela 22:** Eficiência biológica global dos EE e misturas de própolis analisados.

**Tabela A2.1:** Capacidade antioxidante dos extratos e de misturas de extratos, expressa em equivalente de ácido gálico, determinada a partir da intensidade de pico anódica, [AG]; da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V, [AG]<sub>A1</sub>, e da área do voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V ([AG,AT]<sub>eq</sub>) e equivalente de ácido gálico para o extrato, determinado nas mesmas condições em ensaio com concentração 0,002 g/ml.

**Tabela A2.2:** Capacidade antioxidante dos extratos e de misturas de extratos, expressa em equivalente de ácido gálico, determinada a partir da intensidade de pico anódica, [AG]; da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V, [AG]<sub>A1</sub>, e da área do voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V ([AG,AT]<sub>eq</sub>) e equivalente de ácido gálico para o extrato, determinado nas mesmas condições em ensaio com concentração 0,001 g/ml.

**Tabela A2.3:** Capacidade antioxidante das amostras C.10 e SB.10 em equivalente de ácido gálico, determinada através da intensidade de pico anódica ([AG, $I_{pa}$ ]<sub>eq</sub>), da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V ([AG,A1]<sub>eq</sub>) e equivalente de ácido gálico para o extrato, determinado nas mesmas condições em ensaio com concentração 0,005 g/ml.

**Tabela A3.1:** Nível de significância das comparações múltiplas realizadas por 1-way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey. Ns - diferenças não significativas; \* - significativas (0,01 < p ≤ 0,5), \*\* - muito significativas (0,001 < p ≤ 0,01), \*\*\* - altamente significativas (p ≤ 0,001).

**Tabela A3.2:** Nível de significância das comparações múltiplas realizadas por 1-way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey. Ns - diferenças não significativas; \* - significativas (0,01 < p ≤ 0,5), \*\* - muito significativas (0,001 < p ≤ 0,01), \*\*\* - altamente significativas (p ≤ 0,001).

## 1. Introdução

### 1.1. O que é o própolis?

O própolis, também conhecido por “cola de abelha” é uma mistura natural, resinosa, balsâmica e geralmente viscosa, produzida pelas abelhas (especialmente por *Apis mellifera*, L.) a partir de flores, rebentos foliares e exsudados de algumas árvores, como por exemplo choupo (*Populus* spp.), bétula (*Betula* sp.), faia (*Fagus sylvatica*), castanheiro-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), amieiro (*Alnus glutinosa*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (Silici *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007) ou de plantas como o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) (Figura 1) e araucária (*Araucaria angustifolia*) (Sforcin *et al.*, 2005).

O voo de uma abelha abrange normalmente um raio de cerca de 4 a 5 km em torno da colmeia (Biri *et al.*, 1979), onde recolhem pólen e néctar para alimentação, bem como resina para o fabrico de própolis. Não são ainda conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas para uma dada fonte vegetal, mas sabe-se que elas são seletivas nesta recolha (Menezes, 2005; Salatino *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Abelha colhendo exsudados de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*); Autor: Michel Stórquio Belmiro. <http://revistaplaneta.terra.com.br/secao/saude/o-presente-das-abelhas-propolis>

Para a produção de própolis a abelha recolhe os exsudados com as mandíbulas, aos quais acrescenta saliva, ocorrendo a hidrólise de alguns compostos glicosilados pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase (Marcucci, 1995; Pereira *et al.*, 2002; Funari *et al.*, 2000; Baltazar, 2010; Silva, 2012). A recolha da matéria-prima é realizada a temperaturas superiores a 20 °C em virtude das resinas estarem mais maleáveis, facilitando a recolha (Silva, 2012). Assim os períodos mais quentes são mais propícios à produção de própolis. A abelha coletora armazena a matéria-prima nas patas traseiras para o transportar até à colmeia (Sforcin, 2007). Aqui, outra abelha recebe o própolis e comprime-o no local desejado. Posteriormente adiciona-lhe cera, com o auxílio da coletora, a mistura vai sendo moldada, produzindo-se assim a já referida “cola de abelha” ou própolis (Burdock, 1998; Castro *et al.*, 2007; Silva, 2012).

Etimologicamente, a palavra própolis, deriva do grego *pro- em defesa* e *polis- cidade ou comunidade*, o que significa “em defesa da comunidade” (Marcucci, 1996). Na colmeia as abelhas utilizam o própolis para selar fissuras (Figura 2), de modo a tentar manter a temperatura ideal dentro da colmeia (Garcia-Vigueira, 1992; Moreira *et al.*, 2008), criar locais assépticos para os ovos da abelha rainha e fortificar os alvéolos (Sahinler *et al.*, 2005); embalsamar animais invasores mortos pelas abelhas, evitando eventuais doenças derivadas da putrefação dos cadáveres (Brumfitt *et al.*, 1990; Simões *et al.*, 2004); e impedir a proliferação de infeções microbianas (Laskar *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Própolis a isolar fenda numa colmeia;  
Fonte:<http://www.magievegetale.fr/precis/images/sante/a-beille-propolis.jpg>.

O própolis tem sido usado pelo Homem desde tempos ancestrais (3000 a.C.) (Isla *et al.*, 2001). Diferentes civilizações, nomeadamente a egípcia, já utilizavam o própolis, também designado “cera negra”, na mumificação devido às suas propriedades antissépticas (Castaldo, 2002). Os gregos, onde se destaca Hipócrates, utilizavam própolis, como cicatrizante externo e interno (e.g. no tratamento de chagas e úlceras), pelas suas propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias. Também o romano Plínio (23-79 d.C.) se refere ao própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores (Pereira *et al.*, 2002). Na era moderna, durante a guerra de Bôeres (1899-1902), os médicos misturavam vaselina e própolis para criar uma pomada antisséptica para tratar as feridas (Ghisalberti, 1979). Nos invernos gelados russos, mongóis e siberianos, diluíam o própolis em aguarrás para tratar a madeira contra rachaduras e podridão (Woolleweber *et al.*, 1990). Em Itália, famosos fabricantes de violinos, incluindo Antonio Stradivari, usavam o própolis como ingrediente na composição de vernizes, tornando a coloração do violino Stradivarius tão especial (Monti *et al.*, 1983, Oldoni, 2007). Atualmente é utilizado com fins medicinais e cosméticos em várias partes do mundo, encontrando-se disponível sob forma de extratos, cápsulas, soluções bucais, em pó, dentífricos, cremes de rosto, óleos, champôs, entre outros (Burdock, 1998; Bankova, 2005a, b; Baltazar, 2010).

Estudos revelam que vários compostos presentes no própolis também se encontram de forma natural nos alimentos ou são utilizados como aditivos seguros (Ozkul *et al.*, 2004),

podendo ser utilizado como conservante natural na indústria alimentar (Han *et al.*, 1995; Chaillou *et al.*, 2009; Oldini *et al.*, 2011). O consumo de própolis no mundo foi estimado em cerca de 700-800 toneladas por ano (Silva, 2012; Lustosa *et al.*, 2008). No entanto o conhecimento sobre as suas propriedades é maioritariamente empírico, pois só nas últimas décadas (a partir dos anos 60 do séc. XX), é que os cientistas se interessaram pelo própolis surgindo inúmeras publicações relativas aos seus constituintes e às suas propriedades biológicas. Várias publicações demonstraram também que a administração de própolis, tanto em humanos como em ratos, não evidencia efeitos secundários (Kaneeda *et al.*, 1994; Sforcin *et al.*, 2005; Jasprica *et al.*, 2007), tendo-se registado apenas alguns casos esporádicos de alergias ou dermatites de contacto (Silvani *et al.*, 1997; Callejo *et al.*, 2001).

## 1.2. Características e composição química do própolis

O própolis é um produto natural complexo, as suas características e a sua composição química variam de local para local, dependendo da raça das abelhas, da biodiversidade vegetal da região onde a colmeia está instalada e da estação do ano em que se efetua a recolha (Marcucci, 1995; Kumazawa *et al.*, 2004; Cabral *et al.*, 2009; Cruz, 2011; Silva *et al.*, 2013), sendo considerado uma das misturas mais heterogêneas produzidas por seres vivos.

De um modo geral, o própolis é composto por cerca de 50% de resinas, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólenes e 5% de detritos de madeira e terra (Monti *et al.*, 1983; Cirasino *et al.*, 1987), além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, e pequenas quantidades de vitaminas (Burdock, 1998; Volpi *et al.*, 2006). A sua coloração pode variar entre verde, amarelo, vermelho e vários tons de castanho até preto (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Castaldo, 2002). A sua consistência à temperatura ambiente pode ir de maleável a ligeiramente rígida, tornando-se muito rígida a -20 °C e fundindo entre os 60 °C e os 100 °C, embora este comportamento seja também variável (Baltazar, 2010) Possui um sabor suave, mas que pode ser forte, amargo e picante e tem odor balsâmico característico, que se deve aos compostos voláteis que o constituem (Anon, 1927).

Sendo um produto muito resinoso e adesivo, tem uma baixa solubilidade em água. Para a maior parte das aplicações não pode ser utilizado diretamente na forma bruta, sendo necessário proceder a uma extração com solventes orgânicos (éter etílico, acetona, *n*-hexano, metanol, etanol, clorofórmio, etc.). O rendimento da extração varia com o tipo de solvente usado mas, geralmente, o etanol permite a dissolução da maioria dos seus compostos. A extração de

substâncias pode ser realizada de diferentes maneiras, a qual envolve normalmente uma extração simples, quando a amostra é deixada em contacto com o solvente, a frio, por um tempo determinado, com ou sem agitação, ou por uma extração exaustiva, que utiliza um aparelho com solvente aquecido, passando continuamente através da amostra. Têm sido desenvolvidas patentes com novos métodos ou solventes para extrair os compostos presentes no própolis, utilizando óleos vegetais, triglicéridos e ácidos gordos (Kasuma *et al.*, 2001a, b; Namiki *et al.*, 2005). Os solventes utilizados para extração do própolis podem influenciar a bioatividade do extrato (Malaspina *et al.*, 1996; Silva, 2009) devido ao fato de diferentes solventes solubilizarem e extraírem diferentes componentes, mas também os métodos podem influenciar a bioatividade uma vez que têm ação sobre compostos diferentes. Para se extrair substâncias orgânicas ou líquidas (poucos voláteis), o método mais comumente usado é o da extração por solvente, que se baseia simplesmente na maior solubilidade de certos compostos orgânicos em determinados solventes. Assim, os compostos pouco polares (hidrocarbonetos) são mais solúveis em solventes apolares (hexano) ou pouco polares, os compostos de polaridade média (alcoóis, aldeídos, cetonas) são solúveis em solventes mais polares (acetona e clorofórmio), já os compostos muito polares (ácidos, amidas) são mais solúveis em solventes também muito polares (metanol, etanol e água) (Silva *et al.*, 2009). O extrato mais utilizado e estudado a nível mundial é o extrato etanólico, utiliza-se como solvente o etanol que extrai do própolis a maioria dos seus compostos polares, nomeadamente, polifenóis que apresentam propriedades bioativas (Volpi *et al.*, 2006; Silva, 2012)

O própolis apresenta uma composição química muito variada, tendo sido já identificados mais de 300 compostos, entre os quais flavonóides, ácidos fenólicos e respetivos ésteres, ácidos aromáticos, ácidos gordos, sesquiterpenos, quininas, esteróis, vitaminas (B1, B2, B6, C e E), aminoácidos, açúcares e proteínas (Marcucci, 1996; Burdock, 1998; Cuesta - Rubio *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2008; Trusheva *et al.*, 2006; Baltazar, 2010).

Tendo em conta a região geográfica onde é produzido o própolis, tem-se dois grandes grupos: o própolis de regiões de clima temperado e o de climas tropical e subtropical. O choupo (*Populus* sp.) é a principal fonte de resinas para o fabrico de própolis na Europa e América do Norte (Baltazar, 2010). Como alternativa, em regiões onde não são nativas espécies deste género são usadas outras espécies como *Clusia* sp. em Cuba (própolis vermelho) (Trusheva *et al.*, 2006; Lustosa *et al.*, 2008), e *Baccharis* sp. no Brasil (própolis verde), aumentando a diversidade deste produto. Outras espécies vegetais usadas como matéria-prima em várias

partes do mundo são pinheiros, carvalhos, salgueiros, acácias, entre outras (Markham *et al.*, 1996; Lustosa *et al.*, 2008). Dos dois tipos de própolis referidos, é de destacar o própolis de choupo, por ser o mais estudado e o tipo de própolis com maior potencial de aplicação sob o ponto de vista químico e farmacológico (Bankova, 2005a, b). As primeiras publicações sobre composição química do própolis surgiram na década de 70 (Lavie, 1975; Popravka, 1978) tendo-se comparado os flavonóides presentes em exsudados vegetais de choupo e de bétula em própolis francês e russo. O primeiro flavonóide isolado do propolis, em 1927, foi a crisina (5,7-dihidroxiflavona), cuja fonte vegetal era *Populus nigra* var. *pyramidalis* (Burdock, 1998). Nas regiões temperadas destacam-se os flavonóides pinocembrina e galangina, presentes no choupo (*Populus* sp.), no caso de própolis da Europa, Ásia e América do Norte, e os compostos acacetina e apigenina presentes na bétula (*Betula* sp.) para o caso do própolis do nordeste da Rússia. No que diz respeito ao própolis com origem em climas tropicais ou subtropicais destacam-se compostos como di- e triterpenos e derivados de ácidos *p*-cumáricos prenilados que se encontram presentes em exsudados de alecrim do campo (*Baccharis* sp.), *Dalgergia* spp. e *Clusia* spp. (Bankova, 2005a).

A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal do própolis, é muito importante para o controlo de qualidade e para a padronização de amostras para uma efetiva aplicação terapêutica (Park *et al.*, 2002; Lustosa *et al.*, 2008). Para se conseguir uma verdadeira padronização ao nível da composição e das atividades biológicas das amostras de própolis, necessária para se conseguir rotular este produto natural como medicinal, existe ainda um longo trabalho a fazer (Bankova, 2005a, b). Apesar da sua aceitação como produto com finalidade terapêutica por parte das entidades reguladoras, o própolis necessita ser padronizado quimicamente para garantir a sua qualidade, eficácia e segurança. Tal padronização não se afigura fácil, pois vários fatores podem interferir na sua composição química. Também são necessários estudos que relacionem a composição química dos diferentes tipos de própolis com a atividade biológica, pois só assim será possível identificar as suas aplicações terapêuticas (Lustosa *et al.*, 2008). Atualmente, os produtos contendo própolis, cortornam o problema da padronização colocando no rótulo apenas informação relativa à percentagem de flavonóides e polifenóis, bem como o tipo do solvente utilizado na extração, não havendo qualquer referência ao tipo de propriedades biológicas do produto nem informação mais detalhada a nível de composição. Este tipo de produto está disponível apenas ervanárias, não sendo necessária qualquer tipo de prescrição.

### 1.3. Propriedades biológicas do própolis

Estão descritas várias propriedades biológicas e farmacológicas de própolis entre as quais: antimicrobiana (Ohsugi *et al.*, 1997; Sforcin *et al.*, 2000; Murad *et al.*, 2002; Boyanova *et al.*, 2005), antiviral (Kujumgiet *et al.*, 1999; Simões *et al.*, 2004) antioxidante, (Basnet, 1997; Claus, 2000; Moreno *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2004), antitumoral (Bazo *et al.*, 2002; Awale *et al.*, 2008; Demestre *et al.*, 2009; Szliszk *et al.*, 2009; Farooqui, 2012; Valença *et al.*, 2013; Novak, *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2014) e fitotóxicas (Oliveira, 2011; Pereira, 2013).

#### 1.3.1. Atividade antimicrobiana

De todas as bioatividades do própolis, a atividade antimicrobiana é a mais conhecida e comprovada cientificamente (Menezes, 2005), tendo sido a primeira a despertar o interesse na comunidade científica. Das várias atividades antimicrobianas reportadas, destacam-se a ação sobre *Staphylococcus aureus* (Junior *et al.*, 1995, 1997, 2001, 2003; Pinto *et al.*, 2001), *Streptococcus pyogenes* (Bosio *et al.*, 2000), *Candida* sp. (Sforcin *et al.*, 2000; Stepanovic *et al.*, 2003), especialmente *C. albicans* (Wollenweber *et al.*, 1990; Sosa *et al.*, 1997; Hegazi *et al.*, 2000) e sobre outros inúmeros microrganismos (Banksota *et al.*, 2001). A atividade antibacteriana parece dever-se à presença de flavonóides e de ácidos aromáticos e ésteres (Marcucci, 1995).

Segundo alguns autores (Cushnie *et al.*, 2005; Uzel *et al.*, 2005), os flavonóides pinocembrina e galangina e o éster do ácido cafeico são particularmente ativos. Outros estudos revelam que os ácidos cafeico, benzóico e cinâmico causam danos funcionais e estruturais na parede e membrana celular (Scazzochio *et al.*, 2006). A quercetina aumenta a permeabilidade da membrana celular, fazendo com que a célula perca a sua mobilidade, a capacidade de produção de ATP e o transporte transmembranar (Mirzoeva *et al.*, 1997). A nível antimicrobiano o espectro de ação do própolis é amplo, conseguindo inibir o crescimento quer de bactérias quer de leveduras, contudo, a sua eficácia depende não só da amostra mas também do microrganismo em causa. Estudos demonstram uma maior eficácia contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (Lu *et al.*, 2005, Lustosa *et al.*, 2008, Marcucci *et al.*, 2001), podendo isto ser explicado pela maior complexidade da parede celular destas últimas (Campos *et al.*, 2004, Cushnie *et al.*, 2005).

Sendo o própolis uma mistura complexa de compostos essencialmente provenientes do metabolismo secundário de plantas é expectável que alguns compostos possam interagir entre si, contribuindo para alterar o perfil e eficiência das suas atividades biológicas. Pode haver

sinergismo de compostos e ocorrer um ganho de atividade biológica ou, por outro lado, pode ocorrer antagonismo e esta interação resultar numa redução ou até numa anulação de determinada bioatividade. Kujumgiev e colaboradores (1999) afirmam que, em diferentes amostras, diferentes combinações de compostos são essenciais para a atividade biológica do própolis. Estes autores defendem que o própolis tem de ser visto, a nível farmacológico, como uma mistura natural e não apenas como uma fonte poderosa de compostos antimicrobianos e antivirais. De facto, a atividade antimicrobiana resulta mais do sinergismo entre compostos presentes no própolis, do que muitos investigadores consideravam. Estudos efetuados com frações de própolis revelaram que não possuíam qualquer efeito antimicrobiano isoladamente, mas que quando se voltavam a juntar o efeito da amostra era recuperado (Villanova *et al.*, 1984; Marcucci, 1996; Bosio *et al.*, 2000). Outros autores mostram que diferentes combinações de compostos são essenciais para se verificar determinada atividade biológica do própolis (Krol *et al.*, 1993; Kujumgiev *et al.*, 1999).

Alguns estudos que utilizaram antibióticos comerciais (biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina e estreptomicina) contra *S. aureus* e *Escherichia coli* evidenciam que o efeito dos antibióticos na presença de própolis pode se potenciado entre 10 e 100 vezes (Marcucci, 1996). No que diz respeito ao sinergismo com compostos antifúngicos, o própolis demonstrou-se igualmente potenciador, embora em menor escala. (Lustosa, 2008). Estes resultados sugerem que a aplicação simultânea de antibióticos e própolis poderá não só aumentar a eficácia do tratamento como contribuir para diminuir a aquisição de resistências dos microrganismos aos fármacos comerciais, um dos problemas atuais mais preocupantes a nível de saúde pública (Levy *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2007; Onln *et al.*, 2007).

### **1.3.2. Atividade antioxidante**

Outra importante propriedade do própolis é a antioxidante (Alves *et al.*, 2010), isto é, a capacidade de retardar reações de oxidação por inibição de espécies reativas de oxigénio (ROS). Estas são responsáveis por danos e envelhecimento celular e por diversas patologias, como doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, artrite, doença de Parkinson e Alzheimer (Devasagavan *et al.*, 2004; Mohammadzadeh *et al.*, 2007; Lustosa *et al.*, 2008).

Espécies reativas são formadas, por exemplo, durante a redução de oxigénio molecular a água, que ocorre em organismos aeróbios e que está associada à produção de energia na cadeia transportadora de eletrões. ROS como o anião superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo (OH) são produzidos quer durante o funcionamento da cadeia de

eletrões da mitocôndria quer do cloroplasto, mas também por radiação ionizante, por componentes exógenos do metabolismo e como resposta a infeções e inflamações. Estas espécies reativas interferem com macromoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, provocando danos celulares se não forem neutralizadas (Valko *et al.*, 2007; Cruz, 2011). Os radicais livres derivados do oxigénio representam a classe mais importante de ROS geradas em sistemas vivos (Valko *et al.*, 2007).

Vários agentes antioxidantes celulares controlam os níveis de ROS mas, se esta homeostasia for quebrada, por excesso de produção de ROS ou por défice de defesas antioxidantes, as células sofrem stresse oxidativo e, eventualmente, danos irreversíveis. Embora o nosso organismo possua defesas químicas e enzimáticas contra ROS (vitaminas, superóxido dismutase, catalase, glutathione oxidase), estas podem ser insuficientes face à intensidade das agressões sofridas pelo organismo no dia-a-dia. Assim, o consumo equilibrado de produtos com capacidade antioxidante torna-se um fator importante na defesa contra o stresse oxidativo (Mohammadzadeh *et al.*, 2007). Uma possibilidade no controlo e prevenção das patologias acima citadas é a utilização de plantas ricas em polifenóis com propriedades antioxidantes (Urquiaga *et al.*, 2000). Para além de polifenóis, o própolis, contém uma extensa gama de outros compostos com capacidade de remover radicais livres em excesso (Marquele *et al.*, 2006).

Diversas investigações realizadas revelam que o própolis é um poderoso antioxidante, com capacidade análoga à da vitamina C (Basnet *et al.*, 1997; Bankova *et al.*, 2000; Mohammadzadeh *et al.*, 2007; Lustosa *et al.*, 2008), relacionando esta capacidade com o seu elevado teor de polifenóis, que bloqueiam os radicais livres. A atividade antioxidante do própolis deve-se principalmente aos seus compostos fenólicos, que possuem propriedades redox que lhes permitem atuar como agentes redutores, dadores de hidrogénio, quelantes de metais e supressores de oxigénio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) (Moure *et al.*, 2001).

Outra área de aplicação dos antioxidantes é na conservação de alimentos. Os alimentos diminuem o seu tempo de vida útil devido a reações de oxidação, originando odores, sabores e alterações de cor (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Aqui o própolis pode surgir como alternativa natural aos conservantes químicos. De facto, tem-se verificado um aumento de procura de produtos com agentes antioxidantes e antimicrobianos naturais por parte dos consumidores em geral e, particularmente, por parte daqueles que consomem alimentos pouco processados (Han *et al.*, 1995; Tosi *et al.*, 2007). Os compostos antioxidantes presentes no própolis podem

aumentar o tempo de prateleira dos produtos alimentares, retardando o processo de peroxidação lipídica, uma das principais razões para a deterioração destes produtos durante o processo de armazenamento (Halliwell, 1997; Halliwell, 1999).

Existem diferentes metodologias para avaliar a capacidade antioxidante, como por exemplo a citometria de fluxo, que permite fazer avaliações *in vivo*, métodos colorimétricos como o ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido-sulfónico)] e o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e a voltametria cíclica. Através da voltametria cíclica é possível caracterizar um processo de oxidação a partir do potencial de pico anódico ( $E_p$ ) e da magnitude de intensidade de corrente ( $I_p$ ) que é gerada numa célula eletroquímica quando se aplica uma diferença de potencial entre os elétrodos de trabalho e referência. Este método *in vitro* baseia-se na caracterização da reatividade de espécies químicas através da transferência eletrónica. Através da relação entre potencial de pico de oxidação ( $E_p$ ) e a energia associada à transferência eletrónica, é possível fazer um paralelismo entre esta quantidade e o potencial antioxidante de uma espécie química. A intensidade de corrente de pico ( $I_p$ ) relaciona-se com a carga elétrica que a espécie tem capacidade de transferir, permitindo estimar a capacidade antioxidante. A intensidade de corrente medida depende da concentração das espécies que se oxidam e também do número de eletrões transferidos por molécula. Por outro lado, a atividade antioxidante pode ser avaliada a partir da área (A), obtida por integração do voltamograma entre potenciais definidos, e que se relaciona com a concentração das espécies químicas que se oxidam nesse intervalo de potenciais (Chevion *et al.*, 2000).

### 1.3.3. Atividade antitumoral

Pela sua capacidade anti-proliferativa de células tumorais, tanto *in vitro* com *in vivo*, o própolis também está descrito como agente antitumoral (Rao *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996; Banskota *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009; Buriol *et al.*, 2008)

Já foram identificados e caracterizados compostos presentes no própolis, como por exemplo o diterpeno clerodânico (PMS-1) e a perforina (PRF-1), capazes inibir a proliferação de células tumorais do fígado (Matsuno, 1995; Matsuno *et al.*, 1997) e artepillina C e éster fenetil do ácido caféico (CAPE) capazes de desencadear fragmentação do ADN e consequente apoptose (Matsuno *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001). Para além destes, a pluquetiona A (PA) presente em própolis cubano e caribenho provou ser eficaz contra várias linhas tumorais (Díaz-Carballo *et al.*, 2008a, b). Segundo este estudo, os alvos são a topoisomerase I e a DNA polimerase, alterando desta forma o ciclo celular. Em 1999, Kimoto e colaboradores, utilizaram própolis na dieta de

fêmeas de rato com carcinogênese induzida por drogas, tendo verificado uma diminuição na proliferação dos carcinomas mamários. Em 2004, Chia-Nana e colaboradores, isolaram e caracterizaram 2 flavonóides prenilados, a propolina A e a propolina B, a partir de própolis tailandês e comprovaram que induzem apoptose em células de melanoma humano. Este efeito antitumoral deve-se a compostos presentes no própolis, nomeadamente flavonóides e CAPE.

Orsolíc e colaboradores (2005), isolaram compostos hidrossolúveis do própolis que, atuando sinergisticamente, potenciaram a atividade de drogas antitumorais. Mais recentemente, Valença e colaboradores (2013), assim como Carvalho e colaboradores (2014), demonstraram a atividade antitumoral de extratos de própolis português em várias linhas tumorais, nomeadamente em células tumorais do adenocarcinoma colon-rectal humano.

#### **1.3.4. Atividade fitotóxica**

Os estudos relativos a esta atividade são muito escassos, no entanto, alguns investigadores portugueses demonstraram já alguns efeitos alelopáticos ao nível do desenvolvimento de raízes, hipocótilos e epicótilos bem como da eficiência fotoquímica em plântulas de linho (*Linum usitatissimum* L.) crescidas *in vitro* na presença de própolis (Pereira, 2008; Amorim, 2011; Carvalho, 2012; Oliveira, 2011; Pereira, 2013). Estas investigações podem ser importantes para utilização do própolis como bioherbicida, evitando os efeitos nefastos do uso de herbicidas de síntese persistentes nos agrossistemas.

A agricultura intensiva causa grande impacto nos ecossistemas, em particular por estar geralmente associada ao uso excessivo de pesticidas, herbicidas, fungicidas e fertilizantes. Apesar de resultar em produtividades vegetais mais elevadas do que os sistemas tradicionais, este tipo de práticas pode resultar na contaminação do solo com substâncias químicas recalcitrantes indesejáveis, tendo como consequência o decréscimo progressivo das produções (Walker *et al.*, 2004). Por outro lado, a adição excessiva de fertilizantes causa também problemas de qualidade da água nas linhas de água e albufeiras, sendo o uso exagerado de pesticidas uma ameaça à biodiversidade. Além disso, o carácter de monocultura, geralmente associada a este tipo de agricultura, afeta de forma drástica a diversidade biológica dos agrossistemas, uma vez que a eliminação de espécies animais, vegetais ou microbianas que diretamente competem e/ou afetam as culturas de interesse, pode resultar indieractamente na eliminação ou desequilíbrio populacional de muitas outras (Foley *et al.*, 2005).

As plantas competem por luz, água e nutrientes, concorrendo com as outras espécies da comunidade. Essa concorrência contribui para a sobrevivência das espécies no ecossistema.

Nesta interação algumas desenvolvem mecanismos de defesa que se baseiam na síntese de determinados metabolitos secundários, libertados no ambiente e que irão interferir em alguma etapa do ciclo de vida de uma outra planta (Sampietro, 2001). A alelopatia, em sentido estrito, pode ser definida como um processo através do qual produtos do metabolismo secundário de plantas libertados para o ambiente, impedem ou interferem com a germinação e o desenvolvimento de outras plantas relativamente próximas (Molisch, 1937). Os efeitos alelopáticos são mediados por substâncias químicas – aleloquímicos - que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários, tais como ácidos fenólicos e flavonóides (Duke, 2010). Nas amostras de própolis podemos encontrar este tipo de compostos, como por exemplo, flavonóides, entre os quais a quercetina, e compostos fenólicos, como o ácido *p*-cumárico, compostos estes responsáveis por atividades fitotóxicas já descritas (Mairesse, 2005; Li *et al.*, 2010).

### 1.3.5. Outras propriedades biológicas do própolis

Muitas outras propriedades biológicas e farmacológicas atribuídas ao própolis têm sido descritas, incluindo a regeneração de tecido cartilágneo (Scheller *et al.*, 1977), de tecido ósseo (Stojko *et al.*, 1978) e da polpa dentária (Scheller *et al.*, 1978; Magro Filho *et al.*, 1994; Marcucci, 1995). Há relatos de que o própolis baixa a pressão arterial e os níveis de colesterol no sangue (Capasso *et al.*, 2002; Lustosa *et al.*, 2008), mas que também possui efeitos genotóxicos (Cruz, 2011) e oxidantes, semelhantes aos provocados pelo peróxido de hidrogénio, em *Saccharomyces cerevisiae* (Freitas, 2013). O própolis tem ainda efeito sobre a viabilidade de protozoários como *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia* (Marcucci, 1996) e *Trypanosoma cruzi* (De Castro *et al.*, 1995). Efeitos anti-inflamatórios (Bankova *et al.*, 2000) e cicatrizantes foram também reportados estando associados à presença de flavonóides e ácidos fenólicos (Arvouet-Grand *et al.*, 1992; Mani *et al.*, 2006; Vicentino *et al.*, 2007; Lustosa *et al.*, 2008).

Para além destas propriedades, existem ainda estudos escassos relativamente à atividade antiviral do própolis. Verifica-se que o vírus herpes simplex (HSV) e o vírus da estomatite vesicular (VSV), na presença dos flavonóides quercetina e campferol (isolados do própolis), sofrem uma redução na taxa de replicação intracelular diretamente proporcional à concentração de própolis (Marcucci, 1996; Lustosa *et al.*, 2008). No estudo de Marcucci (1996), este verificou que o própolis apresentou efeito contra poliovírus, reduzindo a sua taxa de replicação. Estudos *in vitro* sugerem que o própolis tem uma potente atividade antiviral contra as variantes do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Atividade similar foi observada com

linfócitos CD4+ atuando o própolis, pelo menos em parte, como inibidor da entrada das partículas virais (Gekker *et al.*, 2005; Lustosa *et al.*, 2008).

Pelas suas propriedades o própolis apresenta ainda potencialidades noutras áreas terapêuticas como a dermatologia, as patologias otorrinolaringológicas, as doenças ginecológicas, a odontologia e a estomatologia (Marcucci, 1995) e ainda propriedades hepatoprotetoras (Madrigal-Santillán *et al.*, 2013).

#### **1.4. Objetivos**

Com este trabalho pretendeu-se, numa primeira fase, construir uma base de dados com todos os extratos etanólicos e *n*-hexano de amostras de própolis portuguesas estudadas ao longo dos anos (2008-2013) pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ordenados por eficiência de bioatividades para as diferentes atividades biológicas avaliadas, concretamente, as propriedades antimicrobianas, fitotóxicas, antitumoral e antioxidante. Para isso procedeu-se a uma pesquisa e sistematização de resultados a partir dos documentos e teses publicados e à construção de escalas normalizadas de bioatividades específicas e global.

Numa segunda fase, e de modo a avaliar o potencial sinérgico/antagónico de misturas de própolis com eficiências e bioatividades distintas, foram selecionadas e preparadas combinações binárias de extratos etanólicos de própolis, designadas por misturas, tendo-se testado atividades antimicrobiana, fitotóxica e determinado o seu potencial ou capacidade antioxidante por voltametria cíclica. Foi ainda efetuado um estudo preliminar de avaliação de eventuais efeitos sinérgicos/antagónicos entre os extratos etanólicos selecionados e antibióticos comerciais.

Não existem trabalhos publicados com este tipo de abordagem em que se misturam extratos de amostras de própolis de locais e/ou anos diferentes e se avaliam o seu perfil bioativo e antioxidante, o que torna este trabalho pioneiro e inovador.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Construção de uma base de dados de extratos etanólicos e *n*-hexano de amostras de própolis

Um objetivo inicial deste trabalho consistiu na construção de uma base de dados onde figurassem todos os extratos etanólicos e *n*-hexano de amostras de própolis estudadas ao longo dos anos (2008-2013) pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia, como referido anteriormente. Ao longo do período indicado, várias amostras de própolis português, recolhidas em diversos locais do país (continente e ilhas), foram sendo analisadas nomeadamente no que diz respeito à sua composição química e algumas atividades biológicas.

Concretamente, foram estudadas a atividade antimicrobiana (Guimarães, 2009; Paulo, 2009; Silva 2010; Amorim, 2011; Oliveira, 2011; Valença, 2011; Carvalho, 2012; Ferreira, 2012; Lourenço, 2013; Marques, 2013), fitotóxica (Pereira, 2008; Paulo, 2009; Amorim, 2011; Oliveira, 2011; Carvalho, 2012; Ferreira, 2012; Pereira, 2013), antitumoral (Oliveira, 2010; Valença, 2011; Valença *et al.*, 2013; Carvalho, 2013; Pereira, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2014), genotóxica e antigenotóxica (Cruz, 2011; Freitas, 2013; Pereira, 2013) e a capacidade antioxidante (Guimarães, 2008; Cruz, 2011; Freitas, 2013; Lourenço, 2013; Marques, 2013) no âmbito de trabalhos de projetos de licenciatura e de teses de mestrado. A composição de várias amostras foi também determinada no que diz respeito ao teor em polifenóis e em flavonóides totais (Guimarães, 2008; Cruz, 2011; Carvalho, 2012; Ferreira, 2012) e, nalguns casos, caracterizadas através da técnica de HPLC-DAD-ESI-MS.

Com base nestes dados construíram-se tabelas para cada uma das atividades biológicas, tendo-se começado por normalizar as respostas biológicas (originalmente em diferentes unidades e escalas) pelas respostas dos controlos, expressando assim em % e, posteriormente, ordenado numa escala de eficiência de atividade biológica (ver Tabelas 4, 5, 6 e 7 em Resultados e Discussão). Cada tabela permite assim analisar a eficiência relativa de cada extrato no que diz respeito a uma bioatividade específica, de acordo com uma escala arbitrária mas que permite identificar rapidamente os mais ativos e os menos ativos.

Posteriormente, e através do cálculo da média aritmética, integraram-se as eficiências relativas respeitantes às atividades específicas numa eficiência relativa global, o que permitiu seriar todos os extratos etanólicos e *n*-hexano das diferentes amostras de própolis português estudadas através de um parâmetro único que traduzisse o seu potencial bioativo global, (ver

Tabela 8 em Resultados e Discussão). Embora esta seriação tenha limitações devido ao facto de não se terem avaliado todas as atividades em todos os extratos, ela permite ter uma ideia da atividade global relativa dos diferentes extratos, bem como avaliar o efeito do local e ano de recolha das amostras.

## 2.2. Origem das amostras

Na tabela 1 encontram-se identificadas todas as amostras estudadas, indicando o ano e local de colheita, o tipo de extração/solvente usado e o(s) autor(es) da investigação.

**Tabela 1:** Código de amostras estudadas ao longo dos anos 2008 e 2013 pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, localização do apiário, ano de colheita, tipo de extrato e autor.

Amostra	Localização	Ano de colheita	Tipo de extrato	Autor(es)
L.08.EE	Leiria	2008	Etanólico	Pereira, 2008
L.08.FrH	Leiria	2008	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Pereira, 2008
O.08.EE	Ourém, Santarém	2008	Etanólico	Pereira, 2008
O.08.FrH	Ourém, Santarém	2008	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Pereira, 2008
L.09.FrH	Leiria	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Guimarães, 2009
L.09.FrC	Leiria	2009	Fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico	Guimarães, 2009
L.09.FrEr	Leiria	2009	Fração residual do extrato etanólico	Guimarães, 2009
VNC.09.FrH	Vila Nova de Cerveira, Viana do Castelo	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Guimarães, 2009
VNC.09.FrC	Vila Nova de Cerveira, Viana do Castelo	2009	Fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico	Guimarães, 2009
VNC.09.FrEr	Vila Nova de Cerveira, Viana do Castelo	2009	Fração residual do extrato etanólico	Guimarães, 2009
VR.09.FrH	Vila Real	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Guimarães, 2009
VR.09.FrC	Vila Real	2009	Fração solúvel em clorofórmio do extrato etanólico	Guimarães, 2009
VR.09.FrEr	Vila Real	2009	Fração residual do extrato etanólico	Guimarães, 2009
La.09.EE	Lages, Açores	2009	Etanólico	Paulo, 2009
La.09.FrEr	Lages, Açores	2009	Fração residual do extrato etanólico	Paulo, 2009
La.09.FrH	Lages, Açores	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Paulo, 2009

<b>SM.09.EE</b>	São Mateus, Açores	2009	Etanólico	Paulo, 2009
<b>SM.09.FrEr</b>	São Mateus, Açores	2009	Fração residual do extrato etanólico	Paulo, 2009
<b>SM.09.FrH</b>	São Mateus, Açores	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Paulo, 2009
<b>AH.09.FrEr</b>	Angra do Heroísmo, Açores	2009	Fração residual do extrato etanólico	Silva, 2010; Oliveira, 2010 Valença, 2011
<b>AH.09.FrH</b>	Angra do Heroísmo, Açores	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Silva, 2010; Oliveira, 2010; Valença, 2011
<b>B.09.FrE</b>	Biscoitos, Açores	2009	Fração residual do extrato etanólico	Silva, 2010
<b>B.09.FrH</b>	Biscoitos, Açores	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Silva, 2010
<b>SB.09.FrEr</b>	São Brás, Açores	2009	Fração residual do extrato etanólico	Silva, 2010
<b>SB.09.FrH</b>	São Brás, Açores	2009	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Silva, 2010
<b>C.10.EE</b>	Côa, Guarda	2010	Etanólico	Cruz, 2011; Amorim, 2011; Pereira, 2013
<b>C.10.FrEr</b>	Côa, Guarda	2010	Fração residual do extrato etanólico	Amorim, 2011
<b>C.10.HE</b>	Côa, Guarda	2010	<i>n</i> -hexano	Amorim, 2011
<b>C.10.FrH</b>	Côa, Guarda	2010	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Amorim, 2011
<b>P.10.EE</b>	Pereiro, Guarda	2010	Etanólico	Oliveira, 2011; Valença, 2011; Carvalho, 2013; Marques, 2013; Pereira, 2013
<b>P.10.FrEr</b>	Pereiro, Guarda	2010	Fração residual do extrato etanólico	Oliveira, 2011
<b>P.10.HE</b>	Pereiro, Guarda	2010	<i>n</i> -hexano	Oliveira, 2011
<b>P.10.FrH</b>	Pereiro, Guarda	2010	Fração solúvel em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico	Oliveira, 2011
<b>G.11.EE</b>	Gerês, Braga	2011	Etanólico	Carvalho, 2012; Pereira, 2013
<b>G.11.HE</b>	Gerês, Braga	2011	<i>n</i> -hexano	Carvalho, 2012; Pereira, 2013
<b>PV.09.EE</b>	Póvoa do Varzim, Porto	2009	Etanólico	Ferreira, 2012; Pereira, 2013
<b>PV.09.HE</b>	Póvoa do Varzim, Porto	2009	<i>n</i> -hexano	Ferreira, 2012; Pereira, 2013
<b>AH.10.EE</b>	Angra do Heroísmo, Açores	2010	Etanólico	Lourenço, 2013
<b>B.10.EE</b>	Biscoitos, Açores	2010	Etanólico	Lourenço, 2013
<b>La.10.EE</b>	Lages, Açores	2010	Etanólico	Lourenço, 2013

<b>SB.10.EE</b>	São Brás, Açores	2010	Etanólico	Lourenço, 2013
<b>SM.10.EE</b>	São Mateus, Açores	2010	Etanólico	Lourenço, 2013
<b>G.12.EE</b>	Gerês, Braga	2012	Etanólico	Pereira, 2013; Freitas, 2013
<b>G.12.HE</b>	Gerês, Braga	2012	<i>n</i> -hexano	Pereira, 2013
<b>P.12.EE</b>	Pereiro, Guarda	2012	Etanólico	Pereira, 2013
<b>P.12.HE</b>	Pereiro, Guarda	2012	<i>n</i> -hexano	Pereira, 2013

A avaliação das atividades biológicas foi realizada recorrendo a diferentes metodologias. Para a atividade antimicrobiana utilizou-se a difusão em disco, a diluição em meio líquido e a diluição em meio sólido. Os efeitos fitotóxicos foram avaliados utilizando como modelo plântulas de linho (*Linum usitatissimum* L.) germinadas *in vitro* tendo-se medido o crescimento das raízes, hipocótilos e epicótilos, bem como a eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ) por fluorimetria de pulso de amplitude modulada (PAM). A atividade antitumoral foi estudada em várias linhas tumorais de células humanas avaliando a viabilidade celular pelo método colorimétrico de sulforrodamina B, a proliferação celular pelo ensaio de incorporação de bromodioxiuridina (BrdU), e ainda o ciclo celular, o metabolismo glicolítico, a atividade antiangiogénica e a migração celular. No entanto, uma vez que só estavam disponíveis os dados para todas as linhas tumorais no que diz respeito à viabilidade celular, optou-se por considerar apenas este parâmetro. O ensaio cometa serviu como método para avaliar danos no DNA em células de levedura tratadas com própolis (atividade genotóxica) e peróxido de hidrogénio (atividade antigenotóxica). Para determinar a capacidade antioxidante dos extratos de própolis foram utilizados métodos colorimétricos, como os ensaios ABTS e DPPH, a citometria de fluxo e a voltametria cíclica. A composição química dos extratos de própolis, no que diz respeito ao teor em flavonóides e polifenóis foi avaliada por espectrometria UV -  $AlCl_3$  e pelo método de Folin - Ciocalteu, respetivamente.

As amostras estudadas neste trabalho são provenientes de colmeias de diferentes apiários das zonas Norte e Centro de Portugal e da ilha Terceira dos Açores (Figura 3 e Tabela 2).



**Figura 3:** Localização dos apiários de origem das amostras de própolis.

**Tabela 2:** Código das amostras de própolis estudadas no presente trabalho, localizações geográficas dos respectivos apiários e ano de colheita.

Amostra	Localização	Ano de colheita
PV.09	Póvoa do Varzim	2009
C.10	Côa (Guarda)	2010
P.10	Pereiro (Guarda)	2010
P.12	Pereiro (Guarda)	2012
SB.10	São Brás (Terceira, Açores)	2010

### 2.3. Seleção de extratos e de combinações de extratos

Uma vez que com o presente trabalho se pretendeu avaliar o perfil bioativo de misturas de amostras de própolis, perceber se estas apresentam algum antagonismo ou sinergismo entre compostos, resultando em potenciais perdas ou ganhos de atividade(s) biológica(s), aumentos ou reduções de eficiência de atividades já presentes nos extratos individuais, selecionaram-se, através da análise da base de dados construída e tendo em conta a disponibilidade de amostras/extratos, três extratos considerados mais bioativos e dois menos bioativos tendo-se procedido a todas as combinações binárias possíveis - e que se passaram a designar de misturas (Tabela 3). Todos os extratos selecionados consistiram em extratos etanólicos.

**Tabela 3:** Extratos etanólicos selecionados e misturas utilizadas no presente trabalho (a cinza escuro indicam-se as amostras mais bioativas e a cinza claro as menos bioativas)

	Póvoa do Varzim, 2009	Pereiro, 2010	Pereiro.2012	Côa, 2010	São Brás, 2010
Póvoa do Varzim, 2009		PV.09xP10	PV.09xP.12	PV.09xC.10	PV.09xSB.10
Pereiro, 2010	-		P.10xP.12	P.10xC.10	P.10xSB.10
Pereiro.2012	-	-		P.12xC.10	P.12xSB.10
Côa, 2010	-	-	-		C.10xSB.10
São Brás, 2010	-	-	-	-	

Estes cinco extratos etanólicos foram misturados na razão de 1:1 perfazendo um total de 10 misturas que, em conjunto com os 5 extratos etanólicos individuais, totalizaram 15 amostras.

## 2.4. Preparação dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos utilizados foram previamente obtidos em trabalhos anteriores (Cruz, 2011; Valença, 2011; Ferreira, 2012; Lourenço 2013; Pereira, 2013). Para o efeito, as amostras de própolis foram extraídas com etanol absoluto (15-20 g : 100 ml) sob agitação orbital (100 r.p.m), durante 24 h, a 24 °C, ao abrigo da luz. As soluções foram depois filtradas através de papel de filtro (tipo Whatman nº 1) em funil de Buchner acoplado a sistema de vácuo e o solvente posteriormente removido em evaporador rotativo (Rotavapor RE 121, Buchil; 42 °C, 50 r.p.m) obtendo-se assim os extratos etanólicos. Os resíduos obtidos após filtração foram extraídos novamente em metade do volume do solvente, nas condições acima descritas, e os filtrados foram evaporados conjuntamente. Os extratos etanólicos (EE) foram armazenados a 4 °C, no escuro, até posterior utilização nos ensaios de avaliação das atividades biológicas e capacidade antioxidante.

Antes de cada ensaio de avaliação das atividades antimicrobiana, fitotóxica e antioxidante foram preparadas soluções de trabalho dissolvendo os EE secos em etanol nas concentrações apropriadas.

## 2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

### 2.5.1. Microrganismos

Para avaliação da atividade antimicrobiana das amostras utilizou-se o método de diluição em placa (Kenny *et al.*, 1986) e selecionaram-se quatro microrganismos de interesse clínico e/ou industrial (leveduras e bactérias), para caracterizar a sua suscetibilidade a este produto natural. Os microrganismos utilizados foram descongelados da coleção do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. Leveduras e bactérias foram repicadas periodicamente em meio de cultura adequado (ver 2. 5. 2.), sendo conservadas a 4 °C.

As leveduras utilizadas foram *Candida albicans* IGC 3436T, genótipo selvagem e *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741), genótipo *MATa; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0*. A espécie *S. cerevisiae* foi escolhida pelo seu interesse comercial e também por ser um modelo simples muito útil, de fácil manipulação, um microrganismo eucariota e com o genoma completamente sequenciado, excelente para a compreensão dos processos biológicos que são relevantes para eucariotas superiores, incluindo o Homem.

Relativamente às bactérias, foram testadas como indicadores de sensibilidade uma bactéria Gram-negativa - *Escherichia coli* CECT423 - e uma Gram-positiva - *Bacillus subtilis* 48886, ambas estirpes selvagens.

### **2.5.2. Meios e condições de cultura**

Ao longo deste trabalho foram utilizados dois meios de cultura, de acordo com o tipo de microrganismo a cultivar. Para crescimento de culturas e manutenção de leveduras foi utilizado meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) (Difco™), preparado segundo as instruções do fabricante e constituído por extrato de levedura 1% (p/v), glucose 2% (p/v) e peptona 1% (p/v). Para preparar meio sólido (YPDA) procedeu-se à adição de 2% (p/v) de agar.

Na manutenção e crescimento de culturas de bactérias foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani) comercial (Difco™), preparado seguindo as instruções do fabricante, e composto por triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 1 % (p/v). A preparação de meio LB sólido (LBA) requereu igualmente a adição de 2% (p/v) de agar.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave durante 20 min., a 120 °C e 1 atm. Posteriormente foram adicionados aos meios os extratos de própolis para as concentrações finais de 100, 200, 500, 750 e 1000 µg/ml. Verteram-se em placas de Petri de modo a obter meios suplementados com as diferentes concentrações de extrato de própolis de cada amostra de própolis testada ou das misturas de extratos realizadas. Prepararam-se também, para efeitos de controlo, meios não suplementados com própolis.

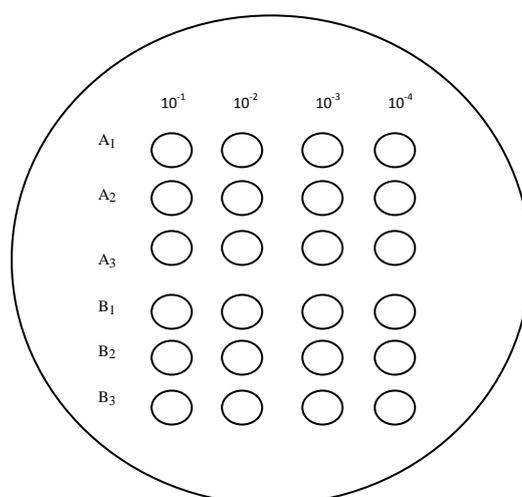
Os microrganismos foram cultivados sob agitação orbital (200 r.p.m ) a 30 °C no caso das leveduras e 37 °C no caso das bactérias.

### **2.5.3. Determinação dos valores de MIC**

A suscetibilidade dos microrganismos ao própolis foi definida pela concentração mínima inibitória (MIC), isto é, a menor concentração testada de extrato/mistura para a qual se observou inibição completa do crescimento microbiano. Todos os testes foram feitos em triplicado e os resultados foram expressos em µg/ml.

Inicialmente retirou-se, com a ajuda de uma ansa, uma colónia de cada uma das leveduras cultivadas em meio YPDA, para inocular 5 ml de meio YPD sendo a suspensão incubada nas condições acima descritas durante a noite (pré-inóculo). No caso das bactérias adotou-se um procedimento idêntico mas em meio LB. No dia seguinte mediu-se a densidade ótica das culturas a 600 nm ( $D.O_{600}$ ) diluiu-se a cultura para uma  $D.O_{600}$  de 0,1 em 5 ml de meio e reincubou-se à temperatura ótima de crescimento de cada tipo de microrganismo até atingir

uma D.O<sub>600</sub> de 0,4 (período correspondente a dois tempos de duplicação), correspondente à fase exponencial de crescimento microbiano. As células foram então recolhidas por centrifugação a 5000 r.p.m., durante 2 min e a 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento lavado duas vezes em igual volume de água desionizada esterilizada. Após a terceira centrifugação, retiraram-se 100 µl da cultura para fazer uma série de diluições decimais sequenciais até à diluição de 10<sup>-4</sup>. Colocaram-se 5 µl de cada diluição nas placas correspondentes ao ensaio de atividade antimicrobiana a realizar, segundo o esquema que se segue (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema representativo da distribuição numa placa de petri das 4 diluições de 2 culturas microbianas (A e B), cada uma das quais testadas em triplicado (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>).

Após 24 h de incubação, registou-se a ausência/presença de crescimento. Sempre que possível procedeu-se à contagem do número de colónias presente em cada diluição. Através da expressão 1 calculou-se o número de unidades formadoras de colónias (CFU) para cada estirpe analisada e os resultados foram expressos em CFU/ml.

$$\text{CFU/ml} = (1000 \times n^{\circ} \text{ colónias/Volume da gota}) \times \text{Fator de diluição} \quad (1)$$

A % de inibição em cada concentração pode ser avaliada a partir da diferença entre os CFU/ml de cada ensaio e os CFU do controlo, o resultado obtido é dividido pelos CFU/ml do controlo e multiplicado por 100%.

## 2.6. Avaliação da interação de EE de própolis com antibióticos comerciais

Depois de analisados os resultados da atividade antimicrobiana selecionaram-se duas misturas com base nos valores de MIC mais promissores, C.10xP12 no caso de *E. coli* e

C10xP.12 e SB.10xP.12 para *B. subtilis*. Os extratos etanólicos foram utilizados numa concentração de 200 µg/ml, concentração imediatamente inferior ao valor calculado para a MIC, que no caso destas amostras correspondeu a 500 µg/ml.

### 2.6.1. Preparação do pré-inóculo

Os pré-inóculos foram preparados no dia anterior, como atrás descrito. Prepararam-se os inóculos em tampão fosfato salino (PBS) esterilizado, preparado com NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 9,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM em água, de pH 7,2, com uma turbidez equivalente à de uma solução padrão McFarland 0,5 (McFarland, 1907). Para preparar a solução padrão McFarland 0,5 adicionaram-se 0,5 ml de BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,175% (p/v) a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (v/v) com agitação constante. Um volume de 4 a 6 ml da suspensão obtida foi transferida para tubos Falcon de 15 ml, que foram conservados ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Para este teste de atividade utilizaram-se as mesmas estirpes bacterianas isto é, *B. subtilis* 48886 e *E. coli* (CEGT 423). Preparou-se o meio Mueller-Hinton Agar 2 (Fluka) conforme as instruções do fabricante. O meio foi esterilizado em autoclave durante 20 min, a 120 °C, sob pressão de 1 atm.

### 2.6.2. Ensaio de difusão em disco

Através do ensaio de difusão em disco (Bauer, 1966) complementado com o ensaio de sinergismo descrito por Mirzoeva e colaboradores (1997), pode testar-se o sinergismo entre as amostras de própolis e antibióticos comerciais. Seguindo este método 50 µl de extrato de própolis foram colocados num disco de papel com diâmetro de 6 mm. Paralelamente, são usados discos contendo soluções de antibióticos comerciais, em concentrações conhecidas sendo que neste trabalho se utilizaram discos de ampicilina 10 µg, eritromicina 15 µg, cloranfenicol 30 µg, tetraciclina 30 µg e ciprofloxacina 10 µg (BBL™ – Becton Dickinson). Os discos comerciais com soluções de antibióticos, os discos virgens onde se adicionaram os extratos de própolis e os discos com antibióticos aos quais se adicionaram ainda 50 µl de extrato foram colocados sobre o meio sólido previamente inoculado com as suspensões salinas das culturas bacterianas utilizadas como indicadoras de suscetibilidade. Durante o período de incubação o agente antimicrobiano difunde-se para o meio sólido formando-se ou não um halo de inibição (zona com ausência de crescimento bacteriano). A presença ou ausência de crescimento em torno dos discos é uma medida indireta da capacidade desse composto inibir o

crescimento microbiano e a sua medição permite avaliar a sensibilidade/resistência do microrganismo estudado.

Cada um dos ensaios foi realizado em duplicado tendo em cada um sido efetuadas 2 réplicas. As placas foram incubadas durante 16 h, a 37 °C e posteriormente medidos os diâmetros (em mm) dos halos de inibição de crescimento. Os resultados foram analisados e foi calculada uma eficiência relativa, obtida através da razão entre o valor médio do diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano produzido por um antibiótico comercial incubado simultaneamente com extrato ou misturas etanólicas de própolis e o valor médio obtido apenas na presença do antibiótico.

## **2.7. Avaliação da atividade antioxidante por voltametria cíclica**

A atividade antioxidante dos extratos e de mistura de extratos foi avaliada por voltametria cíclica a partir de curvas de calibração da intensidade de pico de corrente anódico ( $I_{pa}$ ) e das áreas sob os voltamogramas integradas até 0,425 V (A1) e 0,800 V (AT) em função da concentração de ácido gálico. Assim, a atividade antioxidante dos extratos expressa em concentração equivalente de ácido gálico a partir dos diversos parâmetros eletroquímicos.

As medições voltamétricas foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab type PGSTAT30 (Figura 5A) controlado pelo software GPES 4.9 e uma célula eletroquímica constituída por elétrodos serigrafados (SPE) da DropSens (C110) (Figura 5B) contendo três elétrodos: um eletrodo de trabalho de carbono, um eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo de referência de prata. Foram realizadas três réplicas para cada uma dos extractos/misturas.

As retas de calibração foram traçadas a partir de uma solução de ácido gálico *stock* 1,00 mM em tampão em tampão fosfato (150 mM, pH 3,2), sendo as outras soluções obtidas por diluição. As medições foram efetuadas colocando 50  $\mu$ l de cada solução sobre o conjunto de elétrodos (formando uma gota e estabelecendo o contato entre estes).

Para as análises voltamétricas prepararam-se soluções de trabalho de 0,10 g/ml dos diferentes extractos etanólicos e misturas. A partir destas prepararam-se 5 soluções diluídas em tampão fosfato (150 mM, pH 3,2) nas concentrações 0,020; 0,010; 0,005; 0,002 e 0,001 g/ml.



**Figura 5:** A) Potenciostato Autolab PGSTAT30. Fonte: <http://www.egr.msu.edu/~scb-group-web/blog/wp-content/uploads/2012/07/200746395941732.jpeg> B) Eléctrodos serigrafados com eléctrodos de trabalho e auxiliar de carbono e eléctrodo de referência de prata da DropSens (C110). Fonte: <http://www.dropsens.com/en/img/products/electrodos/110.jpg>

## 2.8. Atividade fitotóxica

### 2.8.1. Extratos e combinações de extratos etanólicos de própolis

Depois de analisados os resultados do efeito das combinações de extratos de própolis sobre microrganismos (atividade antimicrobiana) selecionaram-se apenas alguns dos mais ativos, concretamente aqueles em que os valores de MIC (Tabela 5) foram mais baixos: PV.09xP.10, PV.09xP.12, PV.09xC.10, P.10xP.12 e P.10xSB.10. Tal como anteriormente, testaram-se em paralelo os EE individuais.

### 2.8.2. Modelo vegetal de suscetibilidade

De modo a avaliar as propriedades fitotóxicas dos extratos de própolis, nomeadamente efeitos ao nível do desenvolvimento de plântulas, utilizaram-se culturas *in vitro* de linho (*Linum usitatissimum* L.), variedade regional galego (sementes, gentilmente, cedidas pelo Banco Português de Germoplasma - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária). Esta escolha baseou-se no facto das condições para cultura *in vitro* desta espécie estarem bem estabelecidas por estudos previamente realizados e pelo facto desta planta ter crescimento rápido e possuir características adequadas à observação de efeitos no desenvolvimento precoce dos diferentes órgãos do corpo primário da planta (Cunha, 2001). Este modelo surgiu então como um modelo versátil onde se poderia testar o efeito dos extratos de própolis ao nível da germinação, desenvolvimento e fisiologia de plântulas em condições controladas.

### 2.8.3. Meio de germinação das sementes

Preparou-se meio basal de Murashige e Skoog (1962) com adição de sacarose 2% (p/v) (Panreac), a pH 5,7 e solidificado com Plant agar 0,8% (p/v) (Duchefa). A esterilização foi efetuada por autoclavagem nas condições acima descritas.

#### 2.8.4. Preparação de meios de cultura com EE de própolis

Para avaliação de atividade fitotóxica utilizaram-se placas de 24 poços, tendo usado as colunas de 4 poços para os replicados (#) e as linhas de 6 poços para os diferentes extratos (EE) e respectivas combinações (EEixEEj) (Figura 6).

Com o meio de cultura ainda liquefeito ( $\approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) prepararam-se os meios necessários para cada tratamento adicionando-se EE na concentração final de  $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ , tendo-se posteriormente dispensado  $2,75\text{ ml}$  por poço. Para controlo foi usado meio MS sem adição de EE (ocupando duas das colunas (Figura 6).

Controlo (s/EE)	Controlo (s/EE)	EE1	EE2	EE3	EE1xEE2
--------------------	--------------------	-----	-----	-----	---------



**Figura 6:** Esquema representativo da distribuição dos meios com diferentes extratos de própolis e respectivas combinações ou sem adição de EE (controlo). Cada condição foi testada usando 4 replicados (#1 a #4).

#### 2.8.5. Desinfecção e inoculação de sementes e análise das plântulas

As sementes foram sujeitas a um tratamento emoliente por imersão em etanol 70% (v/v) durante 2 min, em seguida foram imersas em hipoclorito de sódio com 1,5 % de cloro ativo (p/v), durante 10 min. Em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada por UV (20 min.) e após lavagens sucessivas em água desionizada estéril inocularam-se 2 sementes por poço (Figura 6). Seguidamente as placas multipoços foram tapadas usando outras placas vazias invertidas sobre as primeiras, tendo-se fixado a união com parafilme. As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de cultura a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com um fotoperíodo de 16 h e uma intensidade luminosa

de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As placas foram mudadas periodicamente de posição para evitar efeitos devidos a possíveis gradientes térmicos ou luminosos na prateleira.

Ao fim de 15 dias de cultura avaliaram-se os efeitos no desenvolvimento das plântulas, medindo o comprimento da raiz e do hipocótilo.

#### **2.8.6. Análise estatística**

Os resultados foram analisados através de Análise de Variâncias (ANOVA) para um factor, 1-way ANOVA, seguida do pós-teste Tukey para comparações múltiplas entre tratamentos (extractos/misturas). Estas análises foram efectuadas com o programa Prism vs 4.0 (GraphPad Software. Inc.). A nomenclatura para designar o nível de significância utilizada foi a standard: não significativo (ns) se  $p > 0,05$ ; significativo (\*) se  $0,01 < p \leq 0,05$ , muito significativo (\*\*) se  $0,001 < p \leq 0,01$  e altamente significativo (\*\*\*) se  $p \leq 0,001$ .

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Base de dados de extratos etanólicos e *n*-hexano de própolis português

Tendo em conta que este é um trabalho de compilação e organização de resultados obtidos por diferentes investigadores ao longo do tempo, em que diferentes atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, genotóxica, fitotóxica) foram avaliadas em diferentes amostras, por vezes através de métodos distintos, houve necessidade de encontrar um parâmetro uniformizador que traduzisse uma eficiência biológica global para efeitos de comparabilidade. Assim, e para cada uma das atividades biológicas avaliadas, antimicrobianas, fitotóxicas, antioxidantes, antitumorais + (anti)genotóxicas, fez-se corresponder uma escala de 0 a 100 % de eficiência, tendo em conta os vários controlos e/ou limites observados, preparando-se as tabelas 4, 5, 6 e 7, respectivamente. A eficiência global de cada bioactividade é calculada através da média as eficiências parciais. Na tabela 4, no caso da difusão em disco, em que se mede o diâmetro do halo de inibição, ao valor correspondente a 6 mm foi atribuído 0% enquanto a valores > 33 mm foi atribuído 100%. No caso da diluição em meio, em que se obtém uma MIC, 0% corresponde a > 50000 µg/ml e 100% é equivalente a uma concentração < 25 µg/ml. No caso da diluição em placa, onde também se obtém um valor de MIC, 0% equivale a > 750 µg/ml e 100% corresponde a < 100 µg/ml. Na tabela 5, as eficiências foram calculadas como percentagem de inibição do controlo. Para a construção da tabela 6, relativamente à citometria, atribuíram-se percentagens tendo em conta a gama de resultados obtidos para todas as amostras (0% para amostras pouco ativas e 100% às amostras mais ativas). Nos ensaios de DPPH e ABTS atribuiu-se 0% às amostras com valores < 3,125 mg GAE/g de amostra e 100% às amostras com valores > 415 mg GAE/g de amostra. Relativamente à voltametria considerou-se a área total e atribuíram-se percentagens equivalentes, por exemplo, no caso de La.10.EE em que o resultado corresponde a 0,089% de ácido gálico atribuiu-se 89% de atividade. Para construção da tabela 7 atribuiu-se uma escala de 0 a 100, em que 0 corresponde a > 0,01 mg/ml de IC<sub>50</sub> e 100 a < que 0,005 mg/ml, para eficiência antitumoral testada pelo método colorimétrico de sulforrodamina B. Relativamente à atividade antigentóxica ela foi avaliada pelos comprimentos das caudas do ensaio cometa, em que 0 corresponde a 6 µm e 100% corresponde a caudas maiores que 33 µm.

**Tabela 4:** Percentagens de eficiências antimicrobianas obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo de 6 anos (2008-2013), por diferentes metodologias, ordenada por ordem decrescente de eficiência antimicrobiana global. Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

	Amostras	Metodologia			% de eficiência antimicrobiana global
		Difusão em disco (%)	Diluição em meio líquido (%)	Diluição em placa (%)	
1°	PV.09.EE	-	79,31	75,00	77
2°	C.10.HE	-	24,42	100,00	62
3°	P.12.EE	-	-	60,00	60
4°	G.11.HE	-	68,00	40,00	54
5°	G.11.FE	-	67,56	40,00	54
6°	PV.09.HE	-	53,00	40,00	47
7°	P.10.EE	-	34,97	54,48	45
8°	C.10.EE	-	44,24	45,00	45
9°	P.12.HE	-	-	40,00	40
10°	G.12.HE	-	-	40,00	40
11°	P.10.FrE	-	34,97	-	35
12°	C.10.FrE	-	33,30	-	33
13°	La.10.EE	-	-	30,38	30
14°	VR.09.FrE	27,50	-	-	28
15°	AH.10.EE	-	-	26,18	26
16°	G.12.EE	-	-	25,00	25
17°	P.10.HE	-	24,98	-	25
18°	L.08.FE	22,50	-	-	23
19°	La.09.FrH	22,50	-	-	23
20°	O.08.EE	22,10	-	-	22
21°	B.10.FE	-	-	20,15	20
22°	P.10.FrH	-	19,57	-	20
23°	C.10.FrH	-	17,76	-	18
24°	SB.10.EE	-	-	16,18	16
25°	L.?.FrE	15,00	-	-	15
26°	SM.09.FrE	15,00	-	-	15
27°	L.08FrH	14,78	-	-	15
28°	L.09.FrH	12,5	-	-	13
29°	AH.09.FrE	10,90	-	-	11
30°	VNC.09.FrH	10,00	-	-	10
31°	VR.09.FrH	10,00	-	-	10
32°	SB.09.FrE	8,60	-	-	9
33°	B.09.FrE	8,20	-	-	8
34°	VNC.09.FrE	7,50	-	-	8
35°	SB.09.FrH	7,50	-	-	8
36°	AH.09.FrH	5,00	-	-	5

37°	B.09.FrH	5,00	-	-	5
38°	SM.09.FrH	5,00	-	-	5
39°	O.08.FrH	3,33	-	-	3
40°	La.09.FrE	0,00	-	-	0

Através da análise da tabela 4 pode observar-se uma gama alargada de eficiências antimicrobianas, desde amostras mais ativas com quase 80% (PV.09.EE) até amostras aparentemente sem qualquer atividade (La.09.FrE). Ambas as frações (residual do extrato etanólico e do extrato solúvel em *n*-hexano) apresentam eficiências antimicrobianas relativamente baixas (35 - 0%), o que seria de esperar uma vez que, a maioria dos seus compostos já tinham sido extraídos.

**Tabela 5:** Percentagens de eficiências fitotóxicas obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo de 6 anos (2008-2013), onde se avaliou o comprimento (mm) da raiz, hipocótilo e epicótilo, bem como o a eficiência do fotossistema II (PSII) em culturas *in vitro* de plântulas de linho (*Linum usitatissimum* L.). Esta lista está organizada por ordem decrescente de eficiência fitotóxica global. Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

	Amostras	% Eficiência fitotóxica				% de eficiência fitotóxica global
		Raiz	Epicótilo	Hipocótilo	Fotossíntese	
1°	P.10.FrE	71,43	-	48,00	2,44	41
2°	P.10.HE	74,29	-	36,00	6,10	39
3°	PV.09.EE	86,16	26,32	26,29	3,74	36
4°	P.10.EE	72,56	18,18	36,29	5,54	33
5°	O.08.FrH	81,82	50,00	0,00	0,00	33
6°	C.10.EE	47,22	-	28,00	6,25	27
7°	C.10.HE	44,44	-	28,00	6,25	26
8°	La.09.EE	43,48	9,52	50,00	-4,23	25
9°	P.12.EE	52,63	9,09	14,29	1,23	19
10°	SM.10.EE	21,74	-7,14	50,00	5,63	18
11°	SM.09.EE	21,74	-7,14	50,00	5,63	18
12°	P.12.HE	47,37	-5,45	17,86	-1,23	15
13°	G.11.EE	33,77	5,52	15,36	1,22	14
14°	G.12.EE	34,21	-9,09	17,86	6,17	12
15°	PV.09.HE	36,78	-12,24	18,93	4,94	12
16°	G.11.HE	15,29	1,67	13,93	7,82	10
17°	G.12.HE	26,32	-14,55	17,86	3,70	8
18°	L.08.FrH	26,32	-14,55	17,86	3,70	8

Pode contar-se da tabela 5 que a raiz se revelou o órgão mais sensível ao efeito do própolis, verificando-se efeito fitotóxico com todas as amostras, incluindo as frações e também aquele com maior capacidade de discriminação, tendo-se obtido eficiências de quase 90% (PV.09.EE) de inibição até 15% (G.11.HE). O epicótilo teve um comportamento mais inconsistente, por vezes aumentando o seu comprimento em resposta à presença de extracto outra diminuindo. A amostra PV.09.EE mostrou-se uma das globalmente mais fitotóxicas (36 %). A amostra proveniente de Pereiro e recolhida em 2010, mostrou ser aquela com eficiência fitotóxica global mais elevada (41% para P.10.FrE, 39% P.10.HE e 33% para P.10.EE). As amostras de Leiria e Gerês apresentaram menores eficiências (15 – 8 %).

**Tabela 6:** Percentagens de eficiências antioxidantes obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo dos anos 2008-2013, por diferentes metodologias, ordenada por ordem decrescente de eficiência antioxidante global Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

	Amostras	Metodologia			% de eficiência antioxidante global
		Citometria de fluxo (%)	DPPH-ABTS (%)	Voltamétrica cíclica (%)	
1º	L.09.FrE		99,52		100
2º	La.10.EE			89,00	89
3º	P.12.EE	75,00			75
4º	VNC.09.FrH		64,83		65
5º	VNC.09.FrE		50,96		51
6º	G.12.EE	50,00			50
7º	P.10.EE	75,00	19,61		47
8º	VR.09.FrE		36,15		36
9º	P.10.FrE		32,97		33
10º	C.10.FrE		29,13		29
11º	B.10.EE			28,00	28
12º	PV.09.EE	25,00			25
13º	SB.10.EE			25,00	25
14º	L.09.FrH		19,81		20
15º	AH.10.EE			18,00	18
16º	VR.09.FrH		15,22		15
17º	C.10.EE		13,15		13
18º	C.10.HE		4,41		4
19º	P.10.HE		3,52		4
20º	P.10.FrH		0,91		1

Analisando a tabela 6, e apesar de não haver amostras analisadas pelos 3 métodos, verifica-se que todos têm boa capacidade de discriminação revelando uma diversidade de capacidades antioxidantes: desde amostras com elevada eficiência (100% para L.09.FrE; 89% para La.10.EE) a outras com bastante baixa (1% - P.10.FrH; 4% - C.10.HE). É interessante notar que algumas das amostras com menores capacidades antioxidantes (P.10, PV.09.EE) foram das que tiveram maior eficiência antimicrobiana e fitotóxica (Tabelas 4, 5 e 6).

**Tabela 7:** Percentagens de eficiências antitumorais e genotóxicas obtidas através da análise dos resultados de trabalhos feitos pelo grupo de investigação em própolis do Departamento de Biologia da UMinho, ao longo de 6 anos (2008-2013). Extratos etanólicos (azul-claro) e *n*-hexano (laranja); fração residual do extrato etanólico (azul) e fração do extrato solúvel em *n*-hexano (laranja escuro).

		Eficiência antitumoral (%)	Eficiência genotóxica (%)
1	P.10.EE	45	75
2	AH.09.FrE	71	
3	C.10.EE		50
4	AH.09.FrH	45,83	
5	G.12.EE		25

A partir das eficiências globais das bioactividades, calculou-se o parâmetro “eficiência biológica global”, uma medida do potencial biológico dos extratos de própolis. Na tabela 8 encontram-se hierarquizados os vários extratos de amostras de própolis português estudadas ao longo dos anos (2008-2013), com base na sua eficiência biológica global calculada, como referido anteriormente, através da média aritmética das eficiências das bioatividades específicas.

**Tabela 8:** Lista ordenada dos diferentes extratos etanólicos e *n*-hexano de própolis estudados relativamente à eficiência biológica global (%).

	Amostras Local/Ano/Extrato	Eficiência biológica global (%)		Amostras Local/Ano/Extrato	Eficiência biológica global (%)
1°	La.10.EE	60	23°	O.08.EE	22
2°	L.09.FrEr	50	24°	AH.10.EE	22
3°	PV.09.EE	46	25°	G.12.EE	21
4°	P.10.EE	43	26°	P.10.FrH	21
5°	C.10.FrEr	42	27°	SB.10.EE	21
6°	VNC.09.FrH	41	28°	PV.09.HE	20
7°	SM.10.EE	36	29°	P.12.HE	20
8°	VR.09.FrEr	36	30°	G.11.HE	19
9°	P.12.EE	35	31°	SM.09.EE	18
10°	AH.09.FrEr	35	32°	SM.09.FrEr	15
11°	P.10.FrEr	33	33°	G.12.HE	15
12°	C.10.EE	31	34°	L.09.FrH	14
13°	VNC.09.FrEr	29	35°	C.10.FrH	13
14°	C.10.HE	29	36°	VR.09.FrH	10
15°	O.08.FrH	27	37°	SB.09.FrEr	9
16°	AH.09.FrH	25	38°	B.09.FrEr	8
17°	La.09.EE	25	39°	SB.09.FrH	8
18°	P.10.HE	25	40°	B.09.FrH	5
19°	G.11.EE	24	41°	SM.09.FrH	5
20°	B.10.EE	24	42°	L.08FrH	3
21°	L.08.EE	23	43°	La.09.FrEr	0
22°	La.09.FrH	23			

Através da análise da tabela 8 é possível verificar que existe uma grande variabilidade nas eficiências biológicas obtidas, identificando-se extratos com eficiências de cerca de 60 % e outros virtualmente sem atividade biológica mensurável nas concentrações testadas (La.09.FrEr). Embora a representação dos diferentes tipos de extração usados (solventes) não seja equilibrada, dum modo geral os extratos etanólicos (EE) são mais ativos que os de *n*-hexano (HE). Contudo, verifica-se também que em alguns locais, em determinados anos, se pode produzir própolis cujo extratos *n*-hexano apresentam elevada atividade (VNC.09.FrH em 6° lugar). Pode ainda observar-se que embora a proveniência da amostra seja geralmente um fator determinante, havendo locais com amostras muito bioativas (ex: Pereiro em 4° e 9° lugares) ou relativamente pouco bioativas (ex: Gerês em 30° e 33°), o ano de recolha da amostra pode também exercer uma grande influência na eficiência biológica dos extratos. Assim, enquanto a eficiência do EE da amostra Pereiro cai de 4° para 9° lugar, quando a amostra é recolhida em

2010 e 2012, respetivamente, a eficiência do EE de amostra de Lages cai de 1° para 43°, quando se compara o ano 2010 com 2009 e com a amostra de Leiria que também se verifica um decréscimo de 2° para 21°, comparando o ano 2009 com 2008.

Com base nestes resultados, considerou-se então os extratos etanólicos, também os mais utilizados a nível mundial, tanto na investigação como a nível da comercialização, e analisou-se o seu potencial ao nível da atividades antimicrobiana, antioxidante e fitotóxica. Pelo facto de só estudar extratos etanólicos, de agora em diante omitir-se-á o termo EE da designação do extratos.

Através da análise das tabelas construídas das eficiências específicas (Tabela 4, 5, 6 e 7) e da lista ordenada da eficiência relativa global (Tabela 8), concluiu-se que o extrato etanólico (EE) da amostra da Póvoa de Varzim colhida em 2009 (**PV.09**) apresentou uma grande atividade fitotóxica (35,63% - tabela 5) e grande atividade antimicrobiana (77,16% - tabela 4) (Ferreira, 2012; Pereira, 2013). O EE da amostra de Côa (**C.10**) apresentou uma atividade antioxidante baixa (13,15% - tabela 6) e uma atividade antimicrobiana média (44,62% - tabela 4) (Amorim, 2011; Cruz, 2011; Oliveira, 2011; Valença, 2011). Relativamente aos EE das amostras de própolis provenientes de Pereiro (**P.10** e **P.12**), as propriedades biológicas foram avaliadas por diferentes metodologias, por diluição em meio de cultura sólido (Marques, 2013; Pereira, 2013) e em meio de cultura líquido (Valença, 2011) no caso da determinação da sua atividade antimicrobiana, e através da medição do crescimento de raízes, epicótilo e hipocótilo em plântulas de linho (Pereira, 2013) de forma a determinar a sua capacidade fitotóxica. O EE da amostra colhida em 2010 (**P.10**) também foi avaliado no que diz respeito a propriedades antitumorais (Valença, 2011; Carvalho, 2012) e antioxidantes (Marques, 2013). Analisados estes resultados chegou-se à conclusão que esta amostra seria uma boa escolha pela sua capacidade antimicrobiana, fitotóxica e antitumoral (45,79% - tabela 8). Em contraste, o EE da amostra colhida em 2012 (**P.12**) apresentou resultados menos expressivos, sendo uma amostra considerada menos bioativa (35,85% - tabela 4). No que diz respeito ao EE da amostra de São Brás (**SB.10**) duas atividades biológicas foram testadas, a antimicrobiana através do método da diluição em placa e antioxidante por voltametria cíclica (Lourenço, 2013). Apresentou uma baixa atividade antimicrobiana, ou seja, o valor obtido para a concentração mínima inibitória foi superior a 750 µg/ml para a quase totalidade dos 34 microrganismos testados (16,18% - tabela 5) e a sua capacidade antioxidante apresentou resultados inferiores aos exibidos por outras amostras (25% - tabela 6).

### 3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos e misturas de própolis

#### 3.2.1. Determinação dos valores de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Através do método da diluição em placa para avaliação da atividade antimicrobiana, registou-se a presença/ausência de crescimento microbiano em todas as diluições ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ) e replicados, tendo sido determinados os valores de MIC para cada uma das misturas testadas e respetivos EE. Os valores obtidos, indicadores de sensibilidade de leveduras e bactérias, estão apresentados nas tabelas 9 e 10, respetivamente.

**Tabela 9:** Concentração mínima inibitória [MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )] das misturas de própolis contra as duas leveduras estudadas.

Amostras	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
C.10	>1000	>1000
P.10	1000	750
P.12	750	>1000
PV.09	500	500
SB.10	>1000	>1000
PV.09xC.10	500	500
PV.09xP.10	500	500
PV.09xSB.10	500	500
PV.09xP.12	500	500
C.10xP.10	>1000	>1000
C.10xSB.10	1000	750
C.10xP.12	>1000	>1000
P.10xSB.10	500	500
P.10xP.12	750	750
SB.10xP.12	>1000	>1000

Verifica-se que das amostras estudadas, o extrato etanólico proveniente da Póvoa do Varzim, colhido em 2009 (PV.09), foi o extrato mais ativo com valores de MIC de 500  $\mu\text{g/ml}$  para as duas estirpes de leveduras analisadas. Para além disso constata-se que qualquer das misturas preparadas com este extrato exibiu o mesmo valor de MIC (Tabela 9). Daqui pode-se concluir que a capacidade antimicrobiana deste extrato não é alterada quando na presença de compostos de outros extratos, isto é, não existe sinergismo nem antagonismo entre compostos,

nem efeitos aditivos aparentes. Globalmente, os resultados obtidos com os EE isolados estão de acordo com a eficiência global calculada (Tabela 8 e 9).

No que diz respeito aos restantes extratos etanólicos conclui-se que a atividade antifúngica foi menos expressiva, apresentando valores de MIC superiores a 1000 µg/ml (SB.10, C.10 e também P.12). Valores elevados de MIC para atividade antifúngica de própolis português, estão de acordo com o previamente reportado (Quiroga *et al.*, 2005, Moreira *et al.*, 2011).

As duas amostras de Pereiro (P.10 e P.12) apresentaram resultados curiosos que parecem traduzir alterações no perfil fitoquímico e ilustram o impacto que o ano de recolha pode ter na atividade biológica. Assim, enquanto P.10 apresentou uma MIC de 750 µg/ml para *S. cerevisiae* e 1000 µg/ml contra *C. albicans*, P.12 exibiu o comportamento oposto (Tabela 9). Embora já tenha sido descrito que a data de recolha pode alterar a eficiência antimicrobiana (Cabral *et al.*, 2009; Silva, 2014), esta inversão no perfil de especificidade não tinha sido reportada. Quando estes extratos são, e à semelhança do que aconteceu com as combinações feitas com PV.09, manteve-se o valor de MIC mais baixo (750 µg/ml) contra ambas as espécies de leveduras (Tabela 9). Estas duas amostras de Pereiro têm também um comportamento distinto quando combinadas com SB.10, uma amostra com MIC >1000 µg/ml. Assim, enquanto a combinação P.12xSB.10 perde atividade antifúngica relativamente a P.10 ficando com MIC >1000 µg/ml contra ambas as leveduras, a mistura P.10xSB.10 ganhou eficiência relativamente a P.10 tendo exibido uma MIC de 500 µg/ml contra as leveduras testadas (Tabela 9).

Através da análise destes resultados constata-se que EE das amostras de própolis possuem efeito antifúngico de eficiência variada contra as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, que amostras colhidas no mesmo apiário em anos distintos podem ter eficiências diferentes contra leveduras diferentes, e que, combinações de EE podem resultar em misturas mais ou menos ativas relativamente aos EE individuais sugerindo a presença de interações entre compostos tal como já avançado por Krol e colaboradores (1993).

Relativamente à suscetibilidade de bactérias aos extratos etanólicos de própolis, os valores de MIC foram genericamente mais elevados, indicando uma menor atividade antibacteriana comparativamente à ação contra leveduras (Tabelas 9 e 10), embora segundo a literatura seja mais ativo em bactérias do que em leveduras (Menezes, 2005), também existem estudos que demonstram o contrário (Hegazy *et al.*, 2000). Quando se comparam os resultados obtidos contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* e a Gram-negativa *E. coli* verificou-se que genericamente a primeira é mais sensível, tal como descrito na literatura (Bankova *et al.*, 2000;

Sforcin *et al.*, 2000; Marcucci *et al.*, 2001). De facto, apesar da atividade antibacteriana dos EE de própolis não ter sido muito notória, esta evidenciou-se principalmente sobre bactérias Gram-positivas tal como já reportado (Lu *et al.*, 2005; Lustosa *et al.*, 2008). Esta maior suscetibilidade sugere uma ação dos compostos presentes no própolis sobre a parede celular das bactérias Gram-positivas, podendo o própolis ter compostos diferentes com alvos diferentes e efeito antimicrobiano idêntico em termos de MIC, ou então o(s) composto(s) ativo(s) tem ação comum e não atua na parede. (Vargas *et al.*, 2004; Cushnie *et al.*, 2005).

Quando se fazem misturas de extratos etanólicos de amostras distintas observou-se contudo, nalguns casos, uma considerável diminuição dos valores de MIC, embora apenas relativamente a *B. subtilis*. Este é o caso das combinações P.10xSB.10, SB.10xP.12 e PV.09xC.10, cujos MIC reduziram para 500 µg/ml, quando individualmente os EE apresentaram valores de 750 µg/ml (C.10) ou superiores a 1000 µg/ml (Tabela 10).

**Tabela 10:** Concentração mínima inibitória [MIC (µg/ml)] das misturas de EE de própolis contra as duas espécies bacterianas estudadas.

Amostras	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
C.10	>1000	750
P.10	>1000	>1000
P.12	>1000	>1000
PV.09	>1000	>1000
SB.10	>1000	>1000
PV.09xC.10	>1000	500
PV.09xP.10	>1000	>1000
PV.09xSB.10	>1000	>1000
PV.09xP.12	>1000	>1000
C.10xP.10	>1000	>1000
C.10xSB.10	>1000	>1000
C.10xP.12	100	100
P.10xSB.10	>1000	500
P.10xP.12	>1000	>1000
SB.10xP.12	>1000	500

A exceção a este cenário geral, e sem dúvida o resultado mais interessante, foi obtido com a combinação C.10xP.12 que resultou num decréscimo do valor de MIC para 100 µg/ml e para ambas as estirpes bacterianas (Tabela 10). De salientar ainda que esta alteração não se verificou combinando C.10 com P.10, nem ambos os EE de Pereiro entre si. Duas amostras de

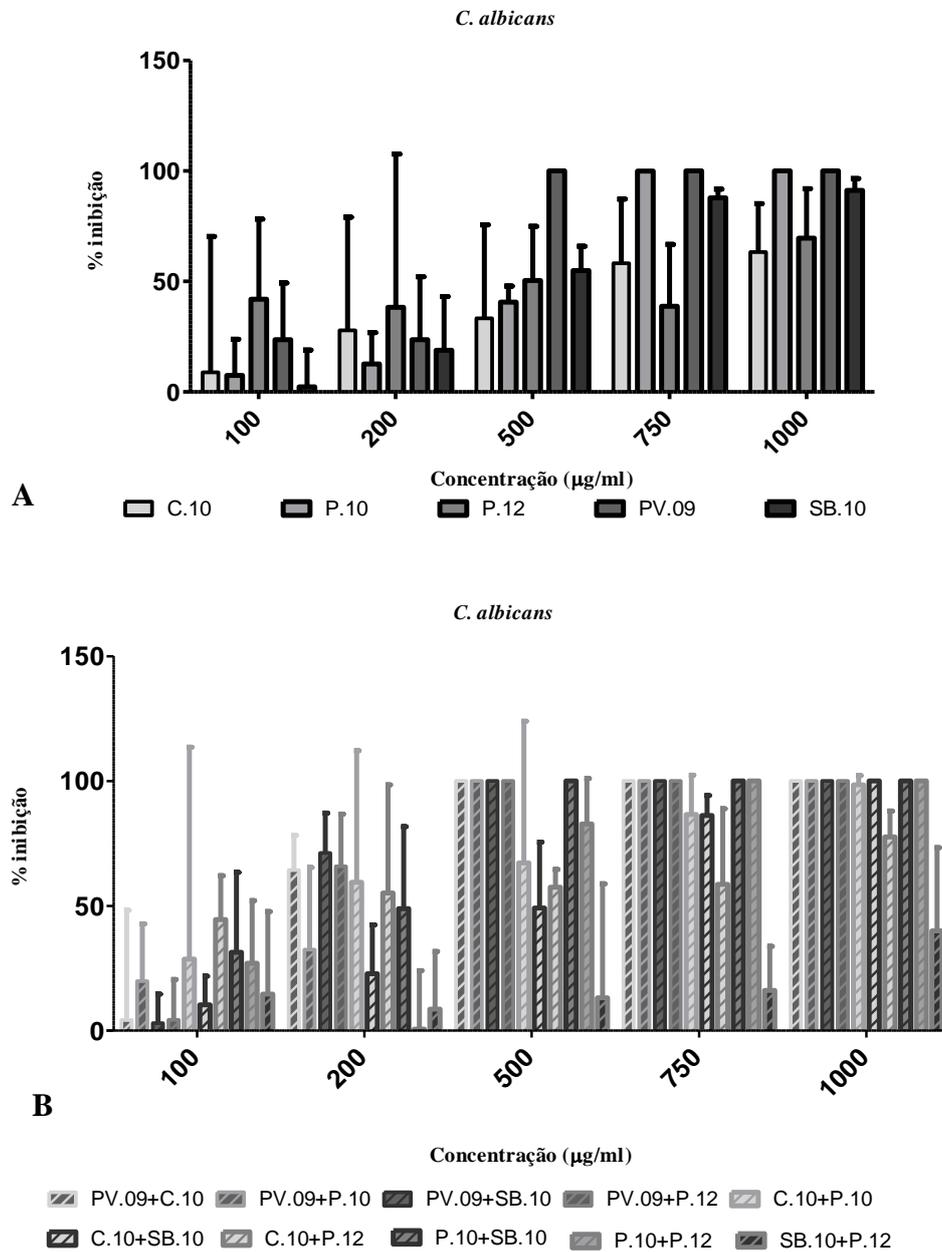
própolis de baixa atividade antibacteriana (C.10 e P.12) resultaram numa mistura cerca de 10 vezes mais ativa e com igual eficácia contra bactérias Gram-negativas (Tabela 10). Este resultado revela bem o potencial de se fazerem combinações entre produtos bioativos, improváveis na natureza provavelmente por serem tóxicas demais, e porque os outputs são muitas vezes inesperados, combinações aleatórias de amostras de própolis poderão ter um enorme valor.

Em nenhuma das misturas ocorreu perda do efeito antimicrobiano, possível no caso de existir antagonismo entre compostos, uma vez que não se verificou aumento do valor de MIC tanto contra leveduras como contra bactérias. Verificou-se apenas ou a manutenção ou diminuição do valor de MIC, o que poderá significar que a composição química dos extratos é diferente e que alguns compostos possam interagir sinergisticamente tornando a mistura mais ativa (Krol *et al.*, 1993). É importante sublinhar que este efeito sinérgico pode resultar de causas distintas: por um lado, compostos diferentes podem ter ações em alvos/funções celulares distintas e a sua ação combinada se traduzir em mais dano, por outro, não se pode colocar de parte a possibilidade de haver interação direta entre compostos levando à produção de espécies mais tóxicas. Um dos objetivos de se testarem misturas foi precisamente perceber se a combinação de amostras de própolis colhidas em diferentes locais e anos poderia alterar ou potenciar o seu perfil bioativo, uma vez que a composição química de própolis depende das condições fitogeográficas, bem como das condições climáticas (Kumazawa *et al.*, 2004) e ainda da raça da abelha que processa o própolis (Silici *et al.*, 2005). Outros autores já tinham demonstrado que a concentração mínima inibitória de algumas amostras de própolis, nomeadamente para estirpes do género *Candida*, em que se verificam valores de MIC muito promissores, na ordem dos 10 mg/ml (Sawaya *et al.*, 2002). O resultado obtido com a mistura C.10xP.12 é o caso mais emblemático de que foi uma boa aposta.

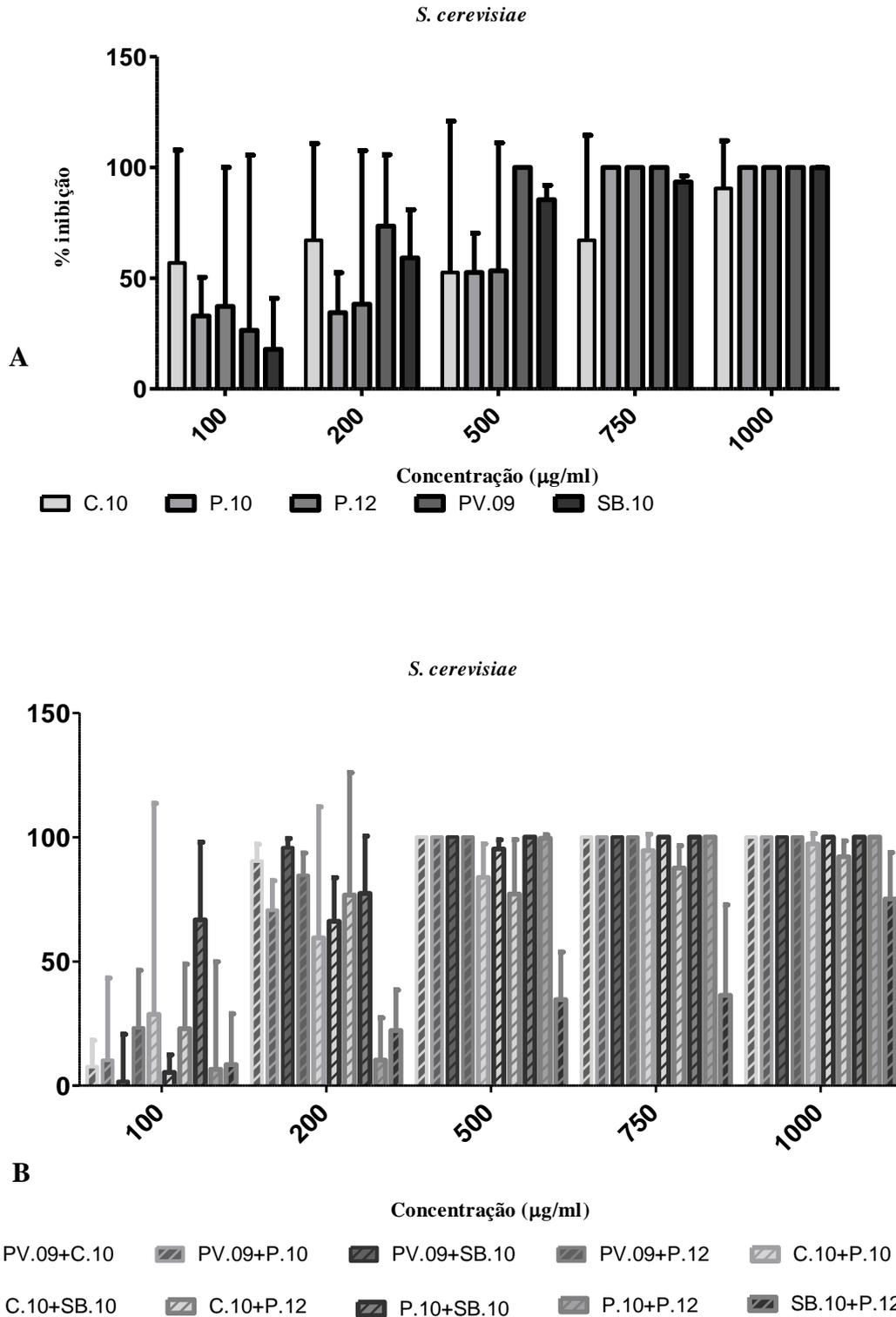
### **3.2.2. Caracterização da eficiência antimicrobiana**

O cálculo do valor de MIC é uma abordagem incontornável e extremamente importante para caracterizar e seriar amostras em termos do seu potencial antimicrobiano. Contudo, uma vez que este parâmetro traduz a concentração mínima do produto estudado para a qual se não regista qualquer crescimento do(s) microrganismo(s) indicador(es) de sensibilidade, a determinação exclusiva deste parâmetro não permite obter qualquer indicação sobre a eficácia antimicrobiana a concentrações inferiores ou caracterizar amostras com o mesmo MIC por exemplo em função de um eventual comportamento antimicrobiano diferente. Neste sentido, contabilizou-se o número de colónias presentes em cada uma das diluições de modo a obter o

número de unidades formadoras de colónias (CFUs). Nas figuras seguintes (Figuras 7, 8, 9 e 10) é possível observar a percentagem de inibição do crescimento de culturas de cada estirpe na presença de extratos e de misturas de extratos etanólicos de própolis a várias concentrações.



**Figura 7:** Percentagem de inibição de *C. albicans* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem ao desvio-padrão.



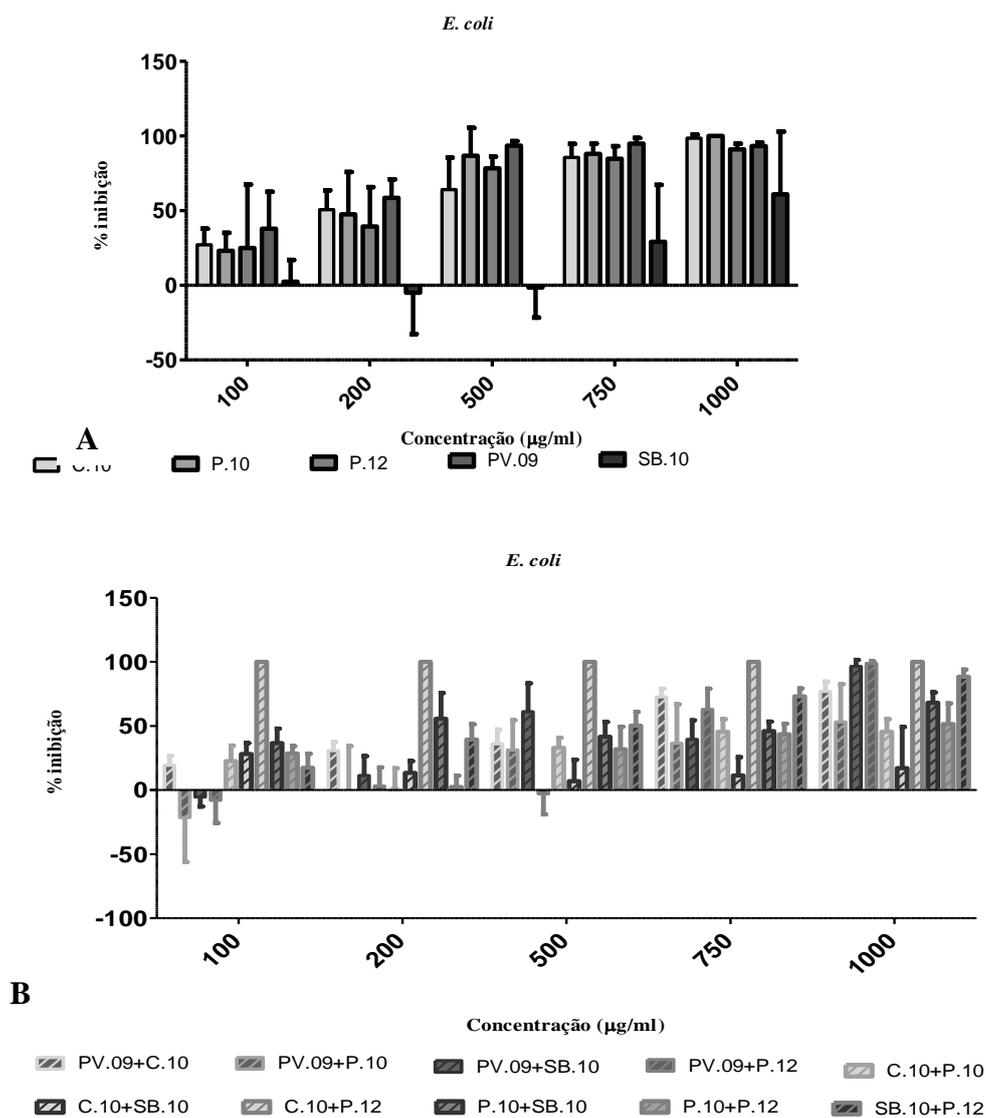
**Figura 8:** Percentagem de inibição de *S. cerevisiae* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem ao desvio-padrão.

Através destes resultados é possível caracterizar melhor a atividade antimicrobiana de cada extrato ou mistura avaliando o seu comportamento em função da concentração.

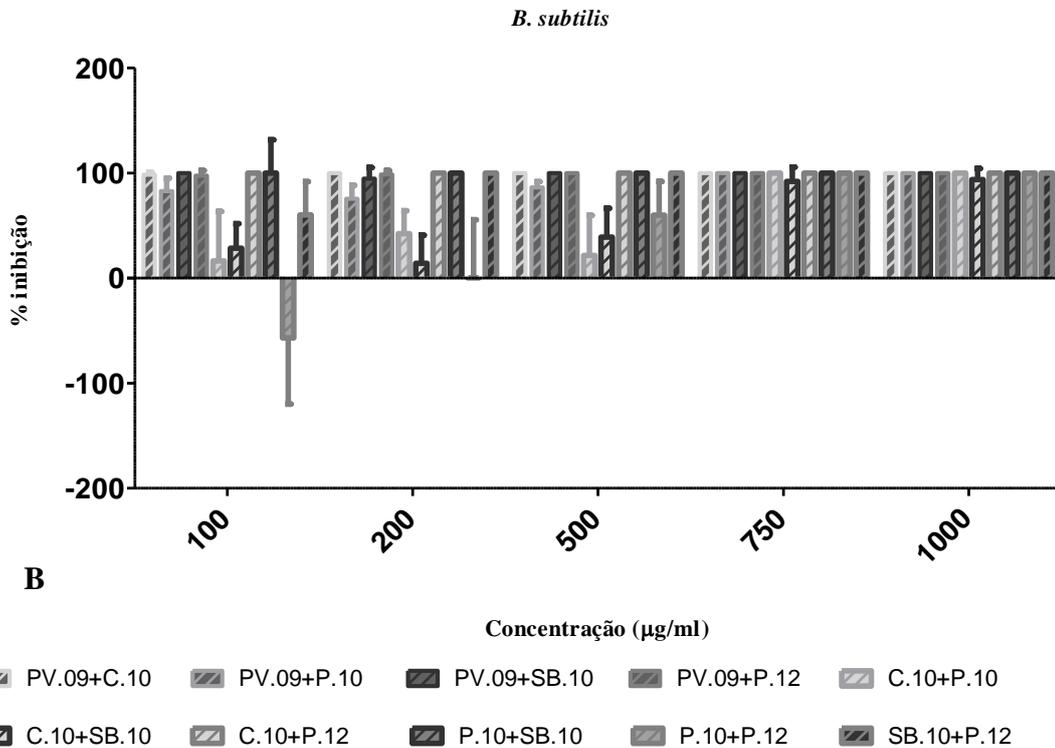
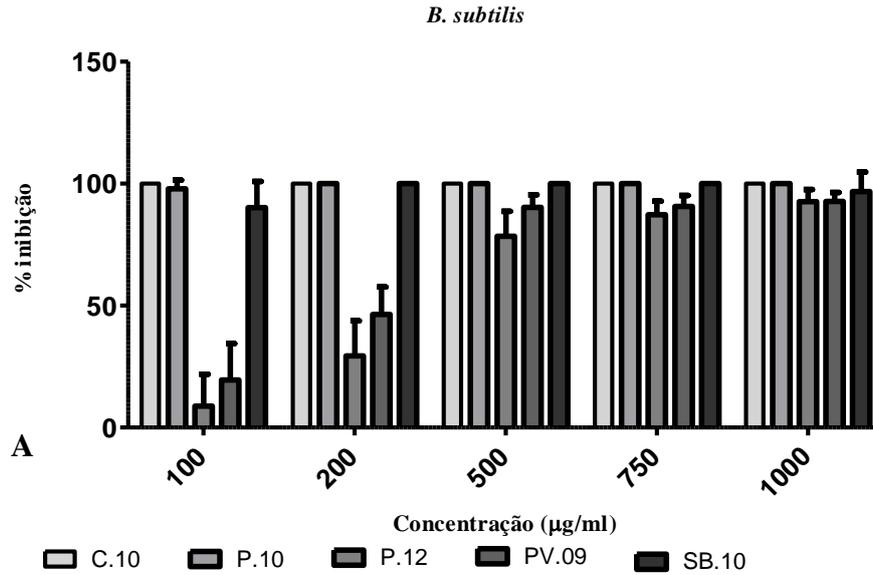
Globalmente e começando por analisar a eficiência antifúngica pode concluir-se que *S. cerevisiae* é mais sensível que *C. albicans*, uma vez que apresenta percentagens de inibição mais elevadas nas concentrações mais baixas de extratos/misturas e a inibição total ou quase total nas concentrações mais altas, tanto para os extratos etanólicos isoladamente como para as combinações testadas (Figuras 7 e 8). Apenas nas misturas C.10xP.10, C.10xP.12 e SB.10xP.12 não existe inibição total, pelo que o seu valor de MIC foi superior a 1000 µg/ml no caso de *C. albicans* e na mistura SB.10xP.12 no caso de *S. cerevisiae* (Tabela 5). Este tipo de abordagem, contrariamente à abordagem através do cálculo da MIC, permite ordenar as misturas por % de inibição, pois verifica-se que as misturas C.10xP.10 e C.10xP.12 quase que atingem a inibição total e a mistura SB.10xP.12 ronda os 50% de inibição em *C. albicans* e 70% de inibição em *S. cerevisiae* (Figuras 7B e 8B).

Relativamente às estirpes bacterianas, e tal como se tinha observado com a estimativa dos MIC, *B. subtilis* mostrou-se mais sensível que *E. coli* (Figuras 9 e 10). Neste caso também se verifica uma percentagem de inibição perto dos 100% para três extratos etanólicos (C.10; P.10 e SB.10) e inferior a 50% para os outros dois (PV.09; P.12) nas concentrações mais baixas para *B. subtilis*. Já para *E. coli* a inibição ronda os 50%, à exceção de SB.10 que apresentou valores de inibição muito baixos e até negativos para as concentrações 200 e 500 µg/ml. Relativamente às misturas é de destacar C.10xP.12 em que na concentração de 100 µg/ml a inibição é já de 100% para as duas estirpes estudadas (Figuras 9 e 10), o que está de acordo com os valores de MIC (100 µg/ml) determinados (Tabela 10). No que diz respeito a *E. coli*, todas as restantes misturas não apresentaram uma inibição de 100% em qualquer das concentrações testadas, inclusive 3 delas apresentam inibição negativa na concentração mais baixa (100 µg/ml): PV.09xP.10, PV.09xSB.10 e PV.09xP.12 (Figura 9B). Olhando agora para as percentagens de inibição das misturas em *B. subtilis* (Figura 10B) verificou-se uma inibição quase total logo na concentração mais baixa em 5 misturas, sendo elas PV.09xP.10, PV.09xC.10, PV.09xSB.10, PV.09xP.12 e P.10xSB.10. Curiosamente, são todas as misturas em que PV.09 está presente, pelo que se pode concluir que a capacidade antibacteriana deste extrato não é alterada quando na presença de compostos de outros extratos, isto é, não existe sinergismo nem antagonismo entre compostos, nem efeitos aditivos aparentes. Podemos ainda observar que a mistura C.10xSB.10 é a mistura menos ativa, pois a sua inibição vai aumentando em função da concentração mas nunca chega a ser total. C.10xP.12 e P.10xP.12 também se mostraram menos ativas para baixas concentrações, no entanto a inibição total do crescimento

de *B.subtilis* ocorreu na concentração 750 µg/ml (Figura 10B) Também aqui se verifica um valor negativo para o caso de P.10xP.12 na menor concentração. Os valores negativos parecem sugerir a presença de compostos que estimulam o crescimento (vitaminas, sais minerais essenciais) e cujo efeito se sobrepõe eventual efeito tóxico de compostos bioativos do própolis visível em concentração mais elevadas. Para além disso também se verificam barras de erro bastante elevadas nas concentrações mais baixas, corroborando a sugestão anterior.



**Figura 9:** Percentagem de inibição de *E. coli* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem ao desvio-padrão.



**Figura 10:** Percentagem de inibição de *B. subtilis* nas diversas concentrações testadas de cada um dos extratos etanólicos (A) e pares de combinações de extratos (B). Os valores médios resultam de 3 replicados de 3 experiências independentes e as barras correspondem ao desvio-padrão.

No anexo 1 encontram-se as fotografias das culturas microbianas em placa, tanto de leveduras (Figuras A1.1 e A1.2) como de bactérias (Figuras A1.3 e A1.4), com EE de própolis incorporados no meio em diferentes concentrações.

### 3.3. Interação entre própolis e antibióticos comerciais

Atualmente, um dos problemas mais prementes a nível de saúde pública e de difícil resolução é, por um lado, a dependência de fármacos sintéticos (antibióticos e antifúngicos) e, por outro, o aumento da resistência de vários microrganismos a estes agentes antimicrobianos (Levy, 2002).

Está demonstrado que os compostos naturais têm toda a potencialidade para substituir drogas sintéticas (Holderna, 1987) na verdade, a maioria dos fármacos atuais foram obtidos ou derivados de produtos naturais. O própolis possui uma atividade antimicrobiana amplamente reconhecida (Park *et al.*, 1998; Bosio, 2000; Drago, 2000; Hegazy *et al.*, 2000, 2001; Paulo, 2009; Guimarães, 2009; Oliveira, 2010; Amorim, 2011; Valença, 2011) e já se verificaram efeitos sinérgicos entre própolis e antibióticos comerciais (Mirzoeva *et al.*, 1997; Stepanovic *et al.*, 2003; Orsi *et al.*, 2005; Oksuz *et al.*, 2005).

Numa tentativa de avaliar a existência de possíveis efeitos sinérgicos entre antibióticos comerciais e os extratos etanólicos de própolis estudados, utilizou-se o método de difusão em disco (Bauer, 1966) e mediram-se os diâmetros (em mm), dos halos de inibição de crescimento microbiano (Tabela 11).

**Tabela 11:** Eficiência relativa avaliada através da razão entre o valor médio do diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano produzido por um antibiótico comercial incubado simultaneamente com um extrato/mistura de própolis e o valor médio obtido apenas na presença do antibiótico (ampicilina (amarelo); tetraciclina (cinza); cloranfenicol (roxo); ciprofloxacina (cor-de-laranja) e eritromicina (bordô). A negrito encontram-se os valores acima de um e a vermelho igual a um.

Antibióticos + amostras	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>
C.10+Ampicilina	0,97	0,92
C.10+Tetraciclina	0,99	0,98
C.10+Cloranfenicol	<b>1,01</b>	0,88
C.10+Ciprofloxacina	<b>1,02</b>	<b>1,01</b>
C.10+Eritromicina	<b>1,22</b>	1,00
P.12+Ampicilina	<b>1,05</b>	0,86
P.12+Tetraciclina	<b>1,07</b>	0,88
P.12+Cloranfenicol	<b>1,09</b>	0,88
P.12+Ciprofloxacina	<b>1,02</b>	<b>1,03</b>
P.12+Eritromicina	1,00	0,95
SB.10+Ampicilina	-	0,97
SB.10+Tetraciclina	-	0,98
SB.10+Cloranfenicol	-	0,90
SB.10+Ciprofloxacina	-	<b>1,01</b>
SB.10+Eritromicina	-	0,98

C.10xP.12+Ampicilina	1,06	0,78
C.10xP.12+Tetraciclina	1,02	0,93
C.10xP.12+Cloranfenicol	1,06	0,85
C.10xP.12+Ciprofloxacina	1,01	1,00
C.10xP.12+Eritromicina	0,97	0,99
SB.10xP.12+Ampicilina	-	0,95
SB.10xP.12+Tetraciclina	-	0,90
SB.10xP.12+Cloranfenicol	-	0,85
SB.10xP.12+Ciprofloxacina	-	1,02
SB.10xP.12+Eritromicina	-	1,00

Analisando estes resultados verifica-se que várias combinações extrato/antibiótico conduziram a valores superiores a 1,05, indicando que provavelmente haverá um efeito sinérgico entre extratos etanólicos/misturas de EE de própolis e antibióticos comerciais. Este aumento de eficiência dos extratos+antibiótico relativamente aos antibióticos, embora pouco expressiva, é particularmente evidente contra *E. coli* sendo observada em 6 das 15 combinações testadas (Tabela 11). Em concreto, verificou-se que a combinação do extrato etanólico C.10 com o antibiótico eritromicina induziu um maior halo de inibição do que quando este é fornecido isoladamente (aumento superior a 20%). No caso de P.12 alguns efeitos sinérgicos parecem ocorrer com os antibióticos cloranfenicol, ampicilina e tetraciclina. Curiosamente, quando se analisou a combinação C.10xP.12 os efeitos sinérgicos mantiveram-se para 2 dos antibióticos testados, esta combinação C.10xP.12, que se tinha revelado muito ativa contra bactérias (Tabela 10), mostrou neste ensaio não potenciar o efeito dos antibióticos testados, o que pode sugerir interação direta entre compostos do própolis e o antibiótico.

No que diz respeito a *B. subtilis*, nenhuma das combinações apresentou valores superiores a 1,05, um comportamento muito distinto do observado com *E. coli* (Tabela 11) e de certo modo paradoxal visto se ter verificado que *B. subtilis* foi a espécie mais suscetível a extratos/misturas de própolis (Figuras 9 e 10). Um facto interessante é que apenas com o antibiótico ciprofloxacina se observaram efeitos potencialmente sinérgicos em todos os extratos/misturas de própolis, à exceção novamente de C.10xP.12. Este antibiótico tem atividade *in vitro* contra uma ampla gama de microrganismos e tem uma ação de inibição a nível da topoisomerase bacteriana de tipo II (DNA girase) e da topoisomerase IV necessárias para a replicação, transcrição, reparação e recombinação do ADN bacteriano.

O facto de haver maior suscetibilidade aparente em *E. coli* que em *B. subtilis*, ao contrário do que seria de esperar visto as bactérias Gram-positivas serem mais sensíveis que as

Gram-negativas (Mirzoeva *et al.*, 1997, Stepanovic *et al.*, 2003), pode dever-se ao facto dos antibióticos comerciais já serem mais eficientes contra as Gram-positivas e, por essa razão, haver menor margem para potenciar o seu efeito. Contudo, seria necessário repetir o ensaio de modo a esclarecer este resultado, idealmente mais estirpes bacterianas.

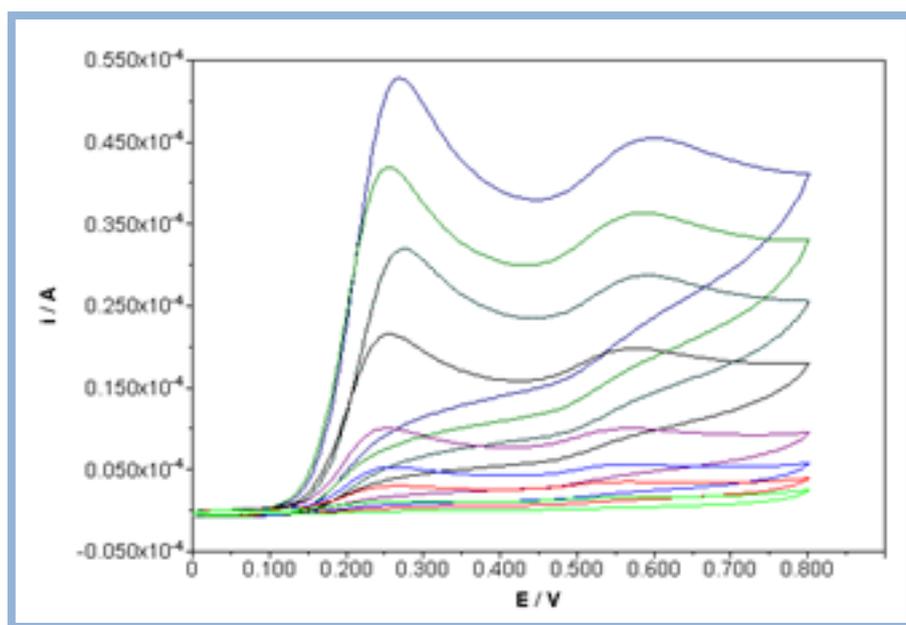
O resultado mais interessante foi o da mistura C.10xP.12, uma vez que apresentou sinergismo com todos os antibióticos à exceção da eritromicina no caso de *E. coli*, contrariamente ao que acontece no caso de *B. subtilis*, podendo concluir-se que esta mistura pode potenciar os mecanismos de ação dos antibióticos contra bactérias Gram-negativas.

### **3.4. Determinação da capacidade antioxidante de extratos etanólicos e misturas de própolis por voltametria cíclica**

#### **3.4.1. Calibração com ácido gálico**

De forma a avaliar a capacidade antioxidante de extratos etanólicos (EE) ou de misturas de EE de amostras selecionadas, traçaram-se retas de calibração com soluções de ácido gálico como padrão, em tampão fosfato pH 3,2.

Na figura 11 estão representados os voltamogramas cíclicos de soluções de ácido gálico de diferentes concentrações obtidos à velocidade de 100 mV/s em elétrodos impressos de carbono (SPE, Screen-Printed Electrodes). Podem observar-se nos voltamogramas dois picos no varrimento anódico correspondentes à oxidação do ácido gálico. A partir destes voltamogramas foi possível determinar os parâmetros eletroquímicos de interesse, nomeadamente a intensidade de pico anódico do primeiro pico ( $I_{pa}$ ), o potencial do primeiro pico ( $E_{p1}$ ), a área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V correspondente ao primeiro processo anódico (A1) e a área total sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V (AT).



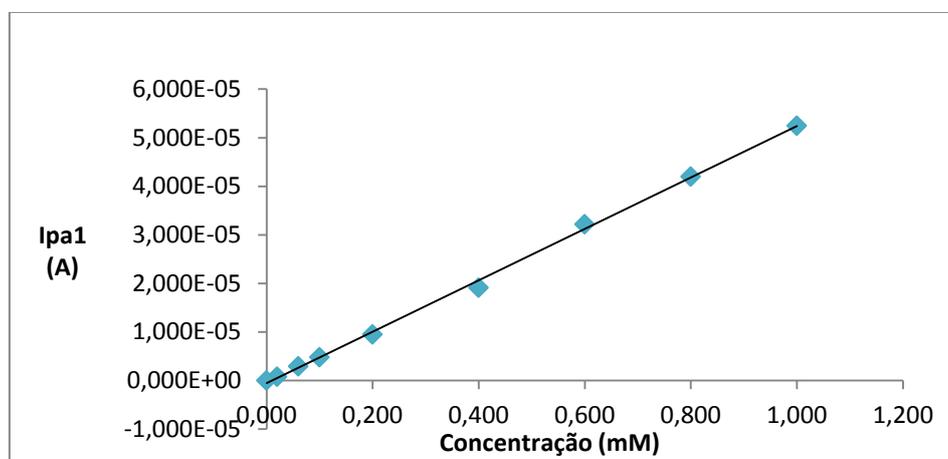
**Figura 11:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, do ácido gálico com concentrações: 0,0200; 0,0600; 0,100; 0,200; 0,400; 0,600; 0,800 e 1,000 mM em tampão fosfato pH 3,2. O potencial foi medido relativamente o pseudo- elétrodo de referência de Ag incorporado no SPE.

Verifica-se ainda um aumento gradual das respostas voltamétricas com a concentração, não havendo variação significativa do potencial do primeiro pico ( $E_{p1}$ ) com o aumento da concentração, como se pode conferir na análise da Figura 11 e nos valores de  $E_{p1}$  que se encontram na Tabela 12.

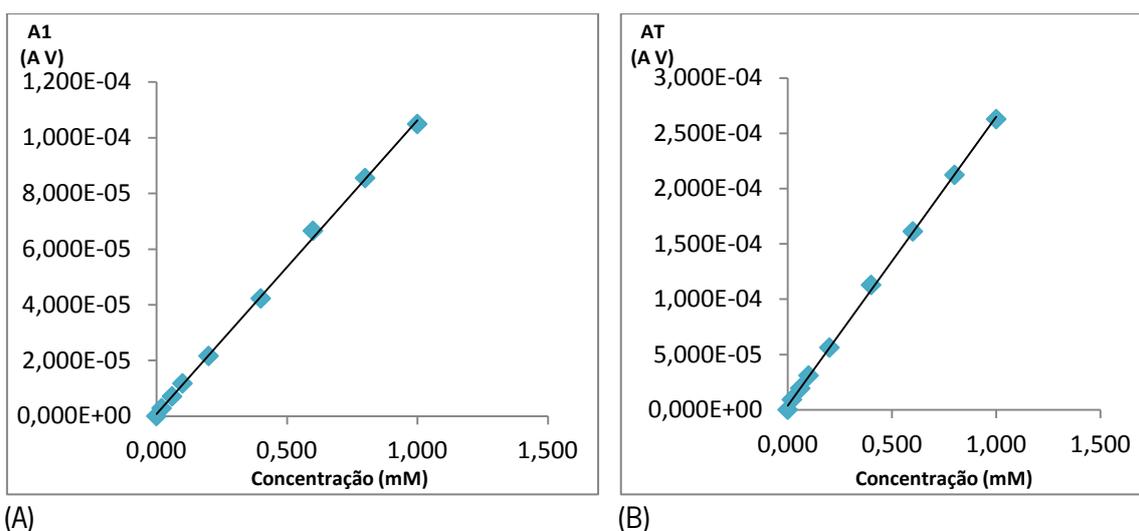
**Tabela 12:** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 11 do ácido gálico.

Concentração (mM)	$I_{pa}$ ( $\mu A$ )	$E_p 1$ (V)	$A1$ ( $\mu AV$ )	$AT$ ( $\mu AV$ )
1,000	52,5	0,269	104,9	262,7
0,800	42,0	0,259	85,5	212,3
0,600	32,2	0,254	66,6	161,2
0,400	19,1	0,249	42,3	112,8
0,200	9,5	0,244	21,6	56,2
0,100	4,8	0,249	11,7	30,9
0,060	2,9	0,264	7,1	19,4
0,020	0,77	0,273	2,8	9,1
0,000	0	0	0	0

Com estes valores representaram-se graficamente as retas de calibração relativamente à intensidade de pico do primeiro processo (Figura 12) e à área sob o voltamograma integrada até 0,425 V e à área sob o voltamograma integrada até 0,800 V (Figura 13A e 14B).



**Figura 12:** Retas de calibração obtida a partir da intensidade de pico anódica (Ipa) em função da concentração de ácido gálico.



**Figura 13:** Retas de calibração da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V (A) e integrada de 0 V a 0,800 V (B), em função da concentração de ácido gálico.

Analisando as Figuras 12 e 13 verifica-se linearidade no intervalo estudado para as três retas de calibração. Na tabela 13 encontram-se representadas as equações das retas de calibração referentes ao ácido gálico bem como os valores relativos aos coeficientes de correlação e incertezas da ordenada na origem e do declive (para uma probabilidade de 95% e para n-2 graus de liberdade).

Pode inferir-se sobre a sensibilidade dos métodos de avaliação da capacidade antioxidante comparando os declives das retas. O método mais sensível é baseado na avaliação

da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V, enquanto o menos sensível corresponde ao método baseado na intensidade de pico anódico I<sub>pa</sub>.

**Tabela 13:** Equações das retas de calibração representadas nas figuras 12 e 13 e respectivos coeficientes de correlação (r).

	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
I <sub>p</sub> (A) vs C (mM)	$y = (53,0 \pm 1,6) \times 10^{-6}x - (5,2 \pm 8,2) \times 10^{-7}$	0,999
A1 (A V) vs C (mM)	$y = (105,6 \pm 1,6) \times 10^{-6}x - (0,8 \pm 1,3) \times 10^{-6}$	0,9992
AT(A V) vs C (mM)	$y = (261,0 \pm 5,3) \times 10^{-6}x - (2,9 \pm 2,6) \times 10^{-6}$	0,9994

A partir das expressões anteriores foram estimados os limiares analíticos representados na Tabela 14.

**Tabela 14** Limites de detecção e de quantificação estimados a partir dos dados apresentados nas figuras 12 e 13.

	Limite de detecção (mM)	Limite de quantificação (mM)
I <sub>p</sub> (A) vs C (mM)	0,04	0,14
A1 (A V) vs C (mM)	0,04	0,11
AT (A V) vs C (mM)	0,03	0,09

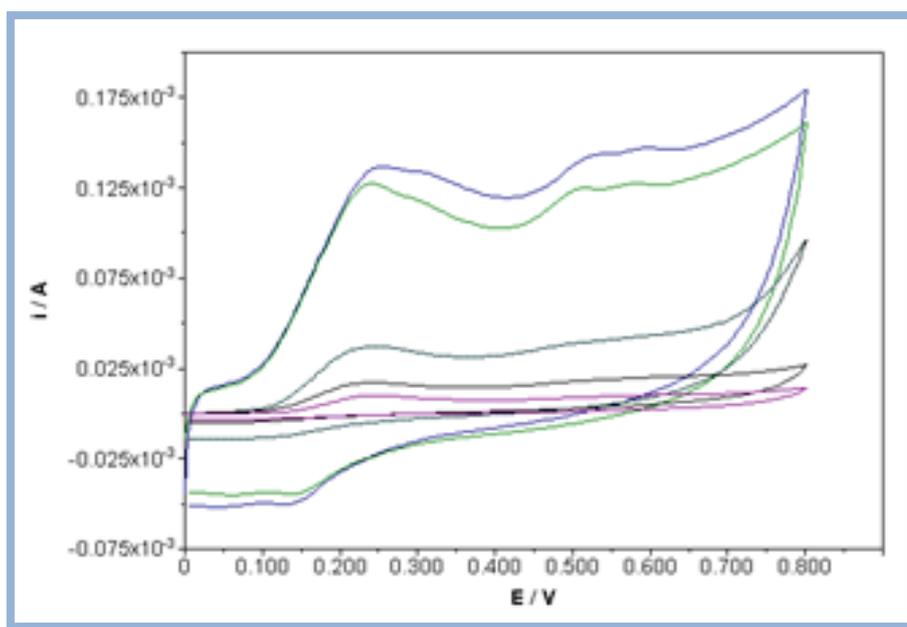
A partir da análise dos resultados presente na tabela 14, pode concluir-se que o método baseado na quantificação da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V tem um limite de detecção mais baixo, apesar de não ser significativamente diferente do obtido pela integração da área até 0,425 V.

### 3.4.2. Análise dos extratos etanólicos e misturas

A capacidade antioxidante dos vários extratos etanólicos/misturas foi analisada por voltametria cíclica e foi avaliada a partir dos voltamogramas cíclicos referentes às soluções obtidas por diluição de cada EE isolado ou de cada mistura de EE, com uma solução tampão fosfato pH 3,2. O registo dos voltamogramas foi efetuado em condições experimentais idênticas às utilizadas na análise das soluções de ácido gálico.

### 3.4.2.1. Extratos isolados

Na figura 14 encontram-se representados os voltamogramas cíclicos obtidos num SPE a partir das diferentes soluções preparadas por diluição do extrato C.10 à velocidade de 100 mV/s. A partir destes voltamogramas foram determinados os mesmos parâmetros eletroquímicos, determinados para as soluções de ácido gálico, nomeadamente a intensidade de corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ), o potencial de pico de oxidação ( $E_{p1}$ ), a área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V (A1) e a área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V (AT) (Tabela 15).

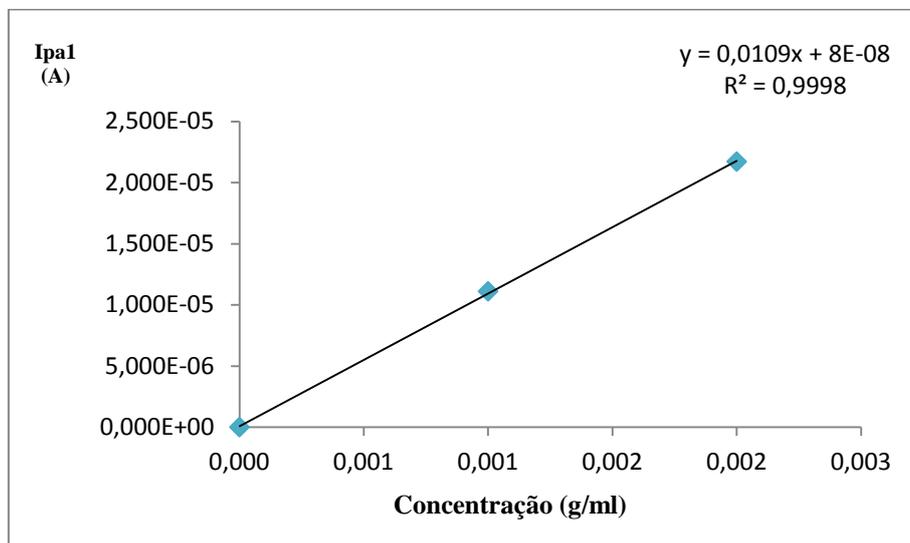


**Figura 14:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, do extrato C.10, com concentrações crescentes: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul). O potencial foi medido relativamente ao eletrodo de referência de Ag.

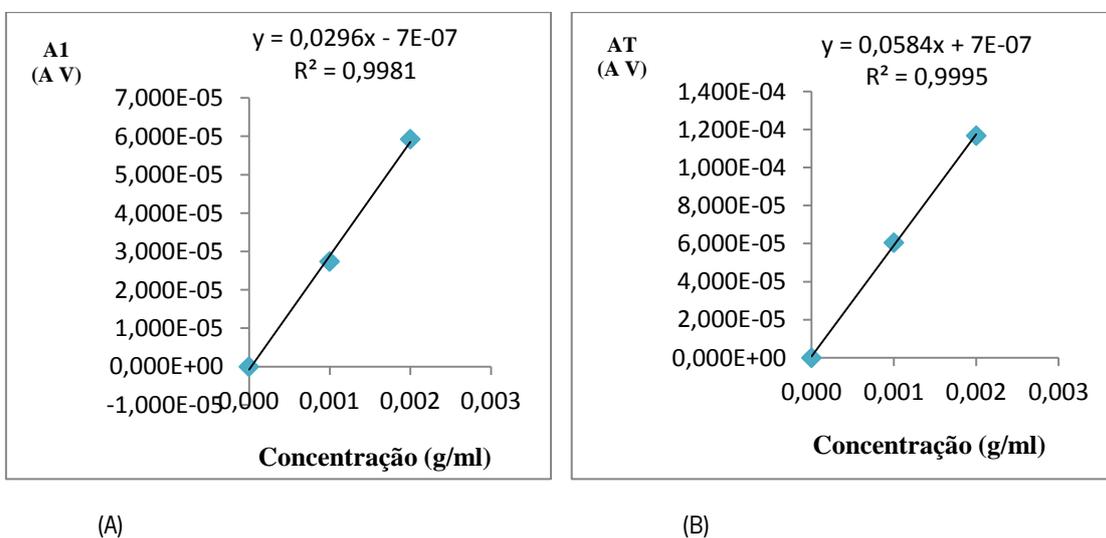
**Tabela 15:** Parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas relativos ao extrato C.10.

Concentração (g/ml)	$I_{pa}$ ( $\mu A$ )	$E_{p1}$ (V)	A1 ( $\mu A.V$ )	AT ( $\mu A.V$ )
0,020	94,8	0,259	361	911
0,010	84,5	0,229	302	823
0,005	29,8	0,254	91,3	271
0,002	21,7	0,195	59,3	117
0,001	11,1	0,22	27,4	60,6
0	0	0	0	0

A representação dos parâmetros Ipa, A1 e AT, em função da concentração do extrato C.10, encontram-se apresentadas nas figuras 15 e 16. Verifica-se que nas três concentrações mais elevadas há um desvio à linearidade pelo que estes dados não foram considerados para avaliar a capacidade antioxidante do extrato.



**Figura 15:** Retas de calibração obtida a partir da intensidade de pico anódica em função da concentração de extrato etanólico C.10.



**Figura 16:** Retas de calibração obtida a partir da área sob o voltamograma, integrada de 0 V a 0,425 V (A) e de 0 V a 0,800 V (B), em função da concentração de extrato etanólico C.10.

Na tabela 16 apresentam-se os valores das equações das retas bem como os coeficientes de correlação obtidos nas representações das figuras 15 e 16.

**Tabela 16:** Equações das retas de calibração representadas nas figuras 15 e 16 e respectivos coeficientes de correlação (r).

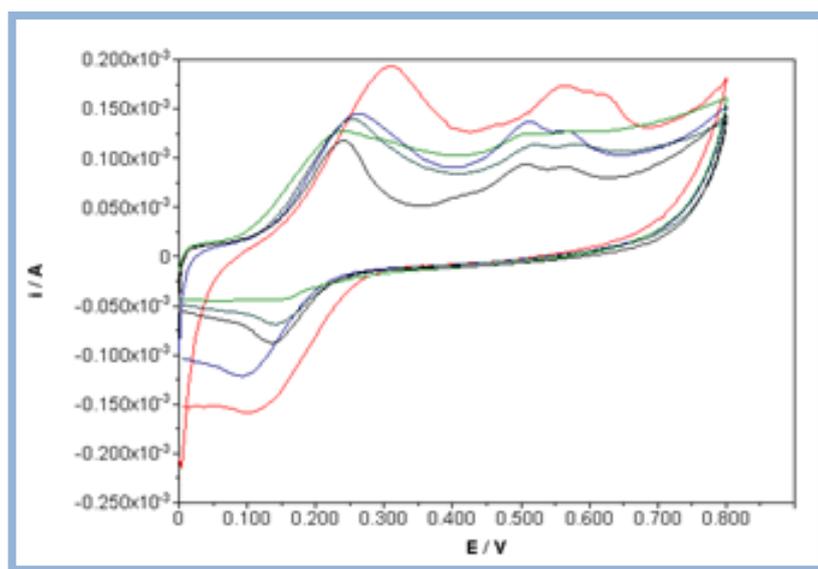
	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
Ip (A) vs C (g/ml)	$y = 0,0109x + 8 \times 10^{-8}$	0,9998
A1 (A V) vs C (g/ml)	$y = 0,0296x - 7 \times 10^{-7}$	0,998
AT (A V) vs C (g/ml)	$y = 0,0584x + 7 \times 10^{-7}$	0,9995

A capacidade antioxidante das soluções preparadas a partir da diluição do extrato C.10 foi então estimada a partir dos valores de Ipa e A1 e AT que se encontram no intervalo de aplicabilidade do método. Estes valores foram interpolados nas retas de calibração, estabelecidas com o ácido gálico, e os valores de capacidade antioxidante foram expressos em concentração equivalente de ácido gálico (tabela 17).

O valor da percentagem equivalente em ácido gálico foi determinado recorrendo à expressão seguinte (A):

$$\frac{\text{Concentração de ácido gálico}}{\text{Concentração do extrato}} \times 100 \quad (A)$$

Os restantes extratos etanólicos foram analisados segundo o mesmo procedimento. Os voltamogramas cíclicos, as retas de calibração e os parâmetros eletroquímicos determinados encontram-se em anexo. Na figura 17 apresenta-se a sobreposição dos voltamogramas cíclicos obtidos das cinco amostras de extratos isolados.



**Figura 17:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, para os extratos, etanólicos com concentrações 0,002 g/ml, PV.09 (vermelho), P.10 (azul), C.10 (verde), P.12 (azul ciano) e SB.10 (preto). O potencial foi medido relativamente ao eletrodo de referência de Ag.

Analisando a figura 17 verifica-se que todos os extratos etanólicos, à exceção de C.10, apresentam um pico de redução ao potencial de aproximadamente 0,15 V vs Ag. O extrato etanólico PV.09 apresenta uma capacidade antioxidante mais elevada, uma vez que apresenta intensidades de corrente mais elevadas do que os restantes, apesar das concentrações dos extratos serem iguais. Relativamente ao C.10 e ao SB.10, o primeiro pico de oxidação ocorre a um potencial mais baixo demonstrando que estes extratos contêm espécies que se oxidam mais facilmente relativamente aos outros EE. Os voltamogramas cíclicos relativos aos outros extratos estão apresentados nas figuras A2.1 a A2.4 no Anexo 2.

Na tabela 17, apresenta-se uma estimativa da percentagem equivalente expressa em ácido gálico a partir das diversas formas de quantificar a capacidade antioxidante por voltametria cíclica.

**Tabela 17:** Valores médios obtidos para a capacidade antioxidante dos diferentes extratos, expressa em equivalente de ácido gálico, estimados a partir das intensidades de corrente do primeiro pico de oxidação (Ipa) e das áreas sob os voltamogramas integradas entre 0 V e 0,425 V (A1) e entre 0 V e 0,800 V (AT).

	Concentração equivalente expressa em ácido gálico (mM)		
	Ipa	A1	AT
<b>PV.09</b>	53	44	34
<b>P.10</b>	54	40	30
<b>P.12</b>	34	35	26
<b>SB.10</b>	21	20	18
<b>C.10</b>	19	25	19

Da análise da tabela 17, pode concluir-se que os resultados obtidos através dos diferentes métodos de quantificação são bastante coerentes, já que conduzem à mesma ordenação dos extratos. Assim, os extratos das amostras PV.09 e P.10 são bastantes semelhantes e correspondem aos extratos de maior capacidade antioxidante, seguidos do extrato P.12. Os extratos SB.10 e C.10 não diferem significativamente e apresentam menor capacidade antioxidante. Estes resultados não estão completamente de acordo com os resultados anteriores, relativos à atividade antioxidante (tabela 6), uma vez que esta prevê a seguinte ordem: P.12 > P.10 > PV.09 > SB.10 > C.10. De facto SB.10 e C.10 são os com menor potencial, mas os mais ativos não seguem a mesma ordem. Uma vez que nas investigações anteriores (Guimarães, 2008; Cruz, 2011; Freitas, 2013; Lourenço, 2013; Marques, 2013), o método utilizado não foi o mesmo para todas as amostras não são diretamente comparáveis, podendo a ordem ser algo diferente.

Na tabela 18, apresenta-se uma estimativa da percentagem equivalente expressa em ácido gálico a partir das diversas formas de quantificar a capacidade antioxidante por voltametria cíclica.

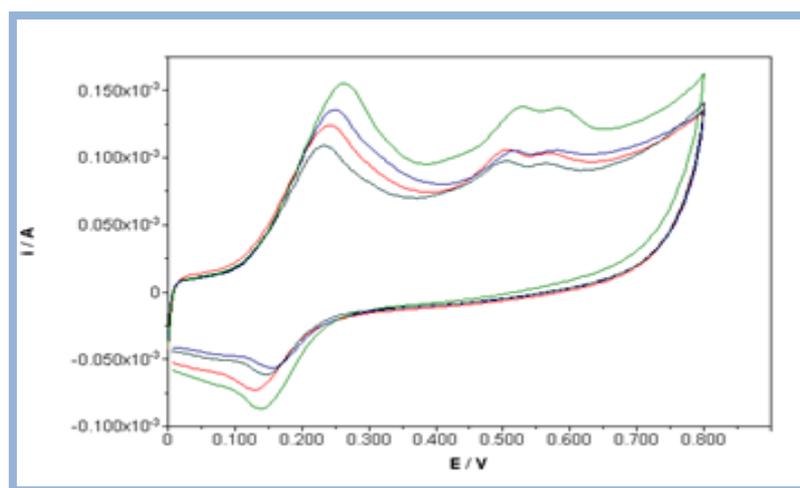
**Tabela 18:** Percentagens equivalentes expressas em ácido gálico por 0,1 g/ml de EE isolados avaliadas a partir de diferentes parâmetros eletroquímicos.

	Percentagem de ácido gálico (%)		
	Ipa	A1	AT
PV.09	9,1	7,4	5,7
P.10	9,2	6,7	5,1
P.12	5,7	5,9	4,5
SB.10	3,6	3,4	3,0
C.10	3,2	4,2	3,2

#### 3.4.2.2. Misturas de extratos etanólicos

Neste ensaio, à semelhança do realizado para as atividades antimicrobianas, pretendeu-se igualmente determinar a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos quando em combinações binárias. As misturas de extratos etanólicos foram tratadas da mesma forma que os isolados.

Na figura 18 estão apresentados os voltamogramas das diferentes misturas de extratos contendo o extrato C.10. Da análise da figura é possível observar que a mistura PV.09xC.10 apresenta uma maior atividade antioxidante, avaliada a partir da intensidade de corrente de pico ou a partir das áreas sob o voltamograma. Nas tabelas 15 e 16 estão apresentados os resultados da concentração equivalente expressa em ácido gálico e a concentração expressa em percentagem de ácido gálico em 0,10 g/ml de própolis, respetivamente. Os voltamogramas das outras misturas estão apresentados nas figuras A2.5 a A2.8 no Anexo 2 e nas figuras A2.9 a A2.20 no Anexo 2 estão apresentados a correlação entre Ipa1, A1 e AT para os diversos EE e misturas de EE.



**Figura 18:** Voltamogramas cíclicos obtidos num SPE à velocidade de 100 mV/s, para as misturas de extratos com C.10, P.10xC.10 (vermelho), P.12xC.10 (azul), PV.09xC.10 (verde) e SB.10xC.10 (azul ciano).

**Tabela 19:** Resultados obtidos em equivalente de ácido gálico presente nas misturas dos extratos com C.10, considerando a quantificação por cada parâmetro eletroquímico.

	Concentração equivalente expressa em ácido gálico (mM)		
	lpa1	A1	AT
C.10xPV.09	35	37	31
C.10xP.10	33	32	20
C.10xP.12	32	30	22
C.10xSB.10	25	26	20

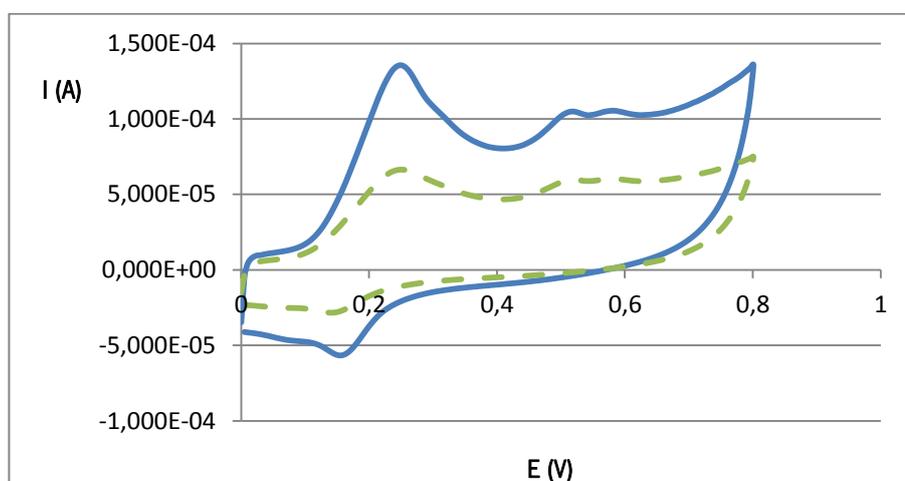
**Tabela 20:** Percentagens de ácido gálico por 0,1 g/ml de própolis avaliado considerando cada parâmetro eletroquímico nas misturas de extratos.

	Percentagem equivalente expressa em ácido gálico (%)		
	lpa1	A1	AT
C.10xPV.09	5,9	6,2	5,2
C.10xP.10	5,6	5,4	3,4
C.10xP.12	5,4	5,2	3,7
C.10xSB.10	4,3	4,4	3,3

Os extratos P.10, P.12 e PV.09, quando misturados com C.10 diminuíram a sua capacidade antioxidante, mas apresentaram sempre valores superiores à capacidade do extrato C.10. (tabela 15). Contrariamente aos outros extratos, a mistura SB.10xC.10 tem maior capacidade antioxidante do que os extratos SB.10 e C.10 isoladamente, como se pode verificar a

partir da análise das tabelas 15 e 16. Pode-se ordenar as misturas por ordem crescente de capacidade antioxidante da seguinte forma: C.10xSB10, C.10xP12, C.10xP.10 e C.10xPV.09, seguindo a mesma ordem que os extratos etanólicos isolados. Nas tabelas A2.1 e A2.2 no Anexo 2, estão apresentados as capacidades antioxidantes determinadas para diversos EE e misturas de própolis avaliados em ensaios com diversas concentrações.

A partir dos voltamogramas de dois extratos isolados e do voltamograma experimental da mistura dos dois EE é possível avaliar a presença de efeitos sinérgicos ou antagonistas. Assim, na figura 19 apresentam-se os voltamogramas da mistura dos extratos (1:1) e ainda o voltamograma resultante da média dos dois voltamogramas normalizados para a concentração.



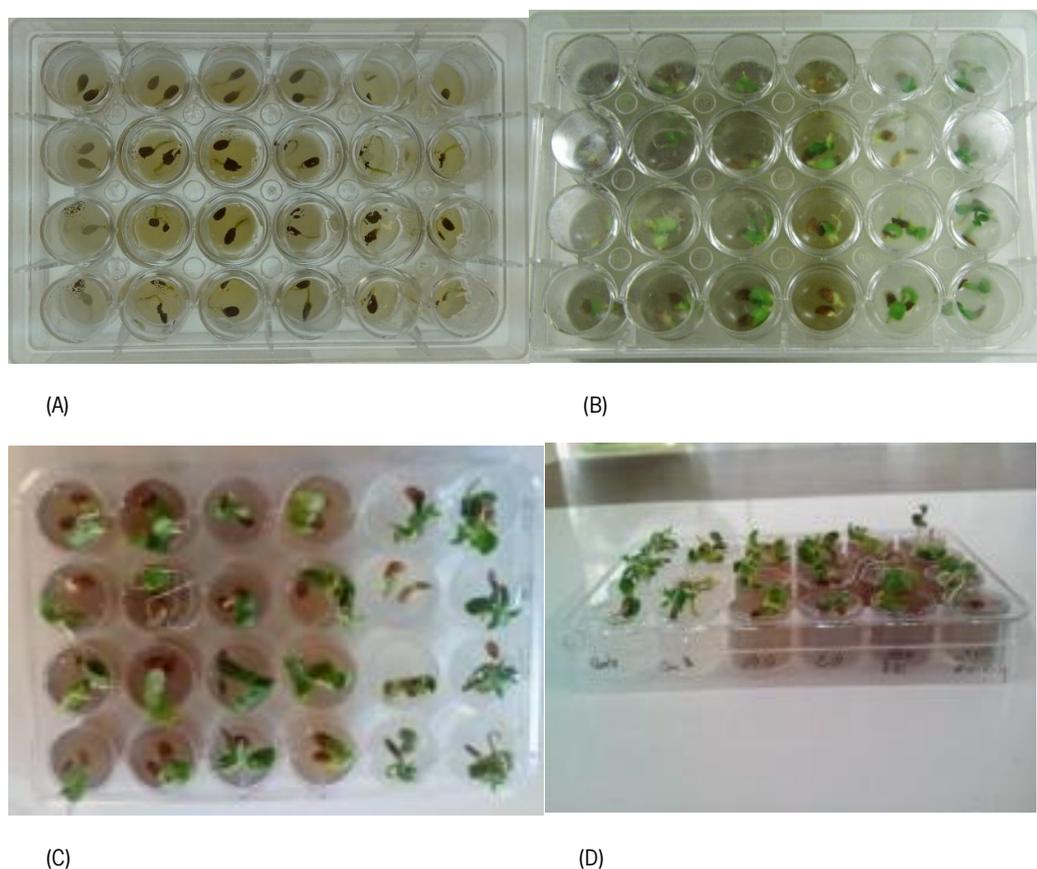
**Figura 19:** Voltamograma experimental para a mistura P.12xC.10 (azul) e voltamograma resultante da soma dos voltamogramas dos extratos isolados normalizado para a concentração (verde).

Da análise da figura 19 verifica-se que o voltamograma resultante da adição dos voltamogramas normalizados para a concentração da mistura P12xC10 (verde) é inferior ao voltamograma realmente obtido com a mistura de P12 com C10 (azul), ou seja, a mistura dos extratos apresenta um aumento significativo da capacidade antioxidante comparativamente à soma da capacidade antioxidante dos extratos respetivos separados, pelo que é possível concluir que para essa mistura existem efeitos sinérgicos. Nas restantes misturas o mesmo não acontece, uma vez que, existe uma diminuição da capacidade antioxidante na mistura. Este tipo de análise, permite-nos concluir que existem interações sinérgicas no caso de P.12xC.10 e antagónicas para as restantes três misturas. Esta interação identificada nesta mistura está de acordo com os resultados obtidos anteriormente relativamente ao efeito antibacteriano (ex: Tabela 6 e Figuras 9 e 10) onde a combinação destes dois extractos etanólicos promovia uma resposta radicalmente diferente.

### 3.5. Efeito dos diferentes extratos etanólicos e misturas no desenvolvimento de plântulas de linho crescidas *in vitro*

Potenciais efeitos fitotóxicos das diferentes amostras foram avaliadas em plântulas de linho (*Linum usitatissimum* L.) crescidas *in vitro*. Tal como foi descrito em Material e Métodos, o efeito no desenvolvimento foi determinado pela medição do crescimento da raiz e do hipocótilo, 15 dias após a inoculação das sementes em meio MS contendo extratos/misturas etanólicos de própolis na concentração 200 µg/ml.

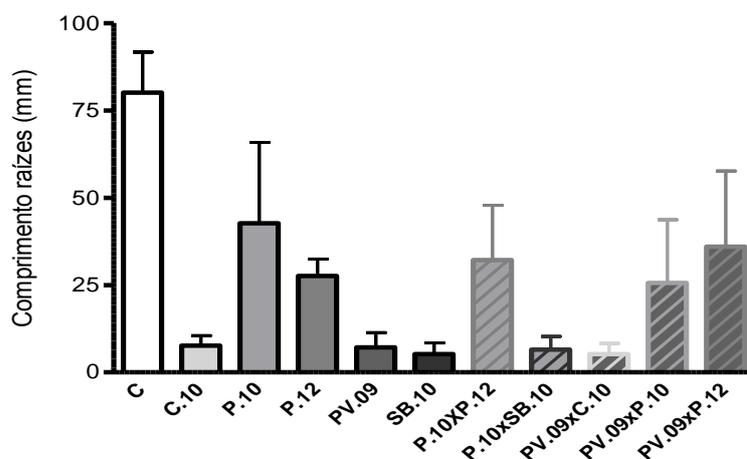
Na figura 20 pode observar-se a disposição das sementes nas placas multipoços e o início da emergência do ápice radicular (Figura 20 A), a emergência dos cotilédones (Figura 20 B) e, numa fase mais avançada, o aspecto das plântulas já com o hipocótilo alongado mas antes da diferenciação de caules (Figuras 20 C e D).



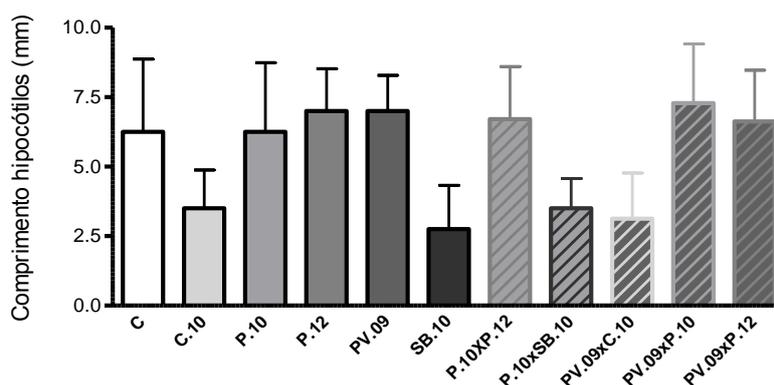
**Figura 20:** Placas de 24 poços com diferentes extratos/ misturas etanólicos de própolis a uma concentração 200 µg/ml no 3º dia (A), 8º dia (B) e 15º dia (C e D). Em cada uma das 6 colunas são inoculados os extratos, misturas ou o solvente (controlo negativo) havendo 4 replicados (4 linhas) por tratamento, cada um com 2 sementes.

O comprimento médio da raiz e do hipocótilo de plantas crescidas na presença dos diferentes extratos etanólicos e misturas encontra-se representado nas figuras 21 e 22. Para não sobrecarregar as figuras com a notação estatística relativa às comparações múltiplas (teste

Tukey), esses resultados encontram-se no Anexo 3 nas Tabelas A3.1 e A3.2.



**Figura 21:** Comprimento médio (n= 8) e respectivo desvio-padrão de raízes de plântulas de linho ao fim de 15 dias. As plântulas cresceram em meio MS com adição de extratos/misturas etanólicas de própolis numa concentração de 200 µg/ml.



**Figura 22:** Comprimento médio (n= 8) e respectivo desvio-padrão de hipocótilos de plântulas de linho ao fim de 15 dias. As plântulas cresceram em meio MS com adição de extratos/misturas etanólicas de própolis numa concentração de 200 µg/ml.

Pela análise dos resultados pode verificar-se que os extratos etanólicos provenientes de Côa (C.10), de Póvoa do Varzim (PV.09) e de São Brás (SB.10) foram os que causaram maior inibição no crescimento radicular. As combinações testadas com estes dois EE (P.10xSB.10 e PV.09xC.10) conduziram igualmente uma inibição dramática no crescimento da raiz. Este resultado obtido com SB.10 é curioso uma vez que foi em geral um dos extratos menos ativos contra leveduras e bactérias, à exceção de *B. subtilis* (Figuras 7 a 10). Isto sugere um mecanismo de toxicidade distinto daquele exercido sobre *E. coli* mas também sobre organismos eucariotas unicelulares, sendo provavelmente um efeito específico do metabolismo e fisiologia das plantas. De facto, está demonstrado que o extrato aquoso de folhas de choupo (*Populus*

sp.), uma espécie bastante comum usada na produção própolis europeu, possui efeitos fitotóxicos sobre a germinação de quatro espécies vegetais (Corona *et al.*, 2011).

No que diz respeito ao efeito do extratos provenientes de Pereiro (P.10 e P.12) sobre o crescimento das raízes não houve diferenças significativas, o que não concorda com resultados previamente reportados em que P.10 tinha um efeito fitotóxico significativamente superior ao de P.12 (Pereira, 2013). Este resultado pode dever-se ao facto de se ter utilizado uma metodologia de cultivo das plantas diferente (em placa multipoços com volumes individuais de cerca de 2 ml vs frascos de cultura *in vitro* com 20 ml de meio) que podia não ser a mais adequada, o que explicaria em parte os desvios-padrão anormalmente elevados. Contudo, é interessante notar que P.10 teve geralmente uma atividade antimicrobiana menor que P.12, à excepção novamente de *B. subtilis* (Figuras 6 a 9). Quando misturados (P.10xP.12), o efeito no comprimento da raiz intermedio, sugerindo apenas um efeito de diluição sem interação entre compostos.

Quanto ao crescimento do hipocótilo os EE provenientes São Brás (SB.10) e de Côa (C.10) são os mais ativos, o que vai de encontro a resultados relativos ao crescimento radicular. Já o PV.09 não apresentou inibição significativa relativa ao controlo. Seria de esperar que P.10 e P.12, com base em resultados anteriores (Pereira, 2013) apresentassem atividade, o que não aconteceu apoiando a hipótese de se ter de proceder a uma otimização da metodologia de cultura *in vitro* desta espécie em placa multipoços. No que diz respeito às misturas pode observar-se a que a mistura mais ativa foi a combinação entre os dois EE mais ativos (PV.09xC.10). Verifica-se ainda efeito no comprimento do hipocótilo no caso da mistura PV.09xP.12, sugerindo que a mistura mantém a atividade fitotóxica de PV.09, o que já acontecia na atividade antimicrobiana relativa às leveduras. No entanto, quando misturamos PV.09xP.10 o mesmo não acontece, podendo indicar algum tipo de antagonismo de compostos ou então como foi dito anteriormente seria necessária uma otimização da metodologia.

Relativamente à atividade fitotóxica a nível radicular, podemos ordenar os extratos da seguinte forma: SB.10 > C.10 > PV.09 > P.12 > P.10. Comparando esta seriação com a percentagem de eficiência fitotóxica calculada com base em resultados anteriores (Tabela 5) não é coincidente, não sendo um resultado esperado uma vez que a metodologia foi a mesma, sendo necessário otimizar o ensaio. Relativamente às misturas, PV.09xC.10 e P.10xSB.10 são as mais ativas, seguindo-se as misturas PV09xP.10 e PV09xP.12 e, por último, a mistura P.10xP.12, sendo a mistura em que os extratos etanólicos testados isoladamente apresentam menor atividade fitotóxica.

A resposta da raiz, órgão germinativo ou pós-embrionário, e do hipocótilo, órgão embrionário ou pré-germinativo, aos diferentes extratos e misturas é algo distinta. Por exemplo, PV.09 tem um efeito inibitório muito significativo no crescimento radicular mas não influenciou o desenvolvimento do hipocótilo. Por outro lado, a raiz foi globalmente o órgão mais sensível à presença do EE e misturas, o que poderá ser explicado pelo facto de estar mais em contacto com os compostos bioativos, mas pode também poderá indicar efeitos mais específicos ao nível da divisão celular (Ferreira, 2000) e não tanto ao nível da expansão celular ou absorção de água.

O efeito alelopático demonstrado por EE e misturas de EE pode ser devido aos constituintes fenólicos, nomeadamente flavonóides, como demonstrado por Peitz (2003) em plantas de alface (*Lactuca sativa*) na presença de extratos de acácias (*Acacia* sp.).

Num planeta com uma população de 7 mil milhões, torna-se complicado manter uma produção alimentar segura e suficiente. A agricultura intensiva com utilização de fertilizantes, pesticidas e herbicidas químicos, tem um grande impacto negativo sobre os solos e cadeias tróficas. Tendo sido descritos efeitos fitotóxicos de diferentes extratos de própolis (Pereira, 2009; Oliveira, 2010; Amorim, 2011; Ferreira, 2012; Carvalho, 2012), este poderá ser uma fonte de compostos com potencial valor bioherbicida, mais seguros, menos recalcitrantes e facilmente recicláveis nos agrossistemas.

### **3.6. Eficiência biológica global dos EE e misturas de própolis**

De forma a sintetizar as bioatividades dos extractos de própolis e misturas estudadas neste trabalho construiu-se uma tabela resumo com os principais resultados obtidos (Tabela 21). Para a atividade antimicrobiana considerou-se o valor de MIC (para cada amostra e para cada microrganismo. No que diz respeito à capacidade antioxidante, utilizou-se o valor da % equivalente expressa em ácido gálico correspondente à área total do voltamograma de cada amostra. Para a atividade fitotóxica consideraram-se os valores médios dos comprimentos (mm) tanto da raiz como do hipocótilo.

**Tabela 21:** Tabela resumo dos resultados obtidos no presente trabalho (bioatividades avaliadas nos vários EE e misturas de própolis).

	Bactérias MIC (µg/ml)		Leveduras MIC (µg/ml)		Capacidade antioxidante (A V)	Atividade fitotóxica	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Área total	Raízes (mm)	Hipocótilo (mm)
C.10	>1000	750	>1000	>1000	3,2	7,7	3,5
P.10	>1000	>1000	1000	750	5,1	44,1	6,3
P.12	>1000	>1000	750	>1000	4,5	29,7	7,0
PV.09	>1000	>1000	500	500	5,7	16,7	7,0
SB.10	>1000	>1000	>1000	>1000	3	5,3	2,8
PV.09xC.10	>1000	500	500	500	5,2	5,3	3,1
PV.09xP.10	>1000	>1000	500	500		25,6	7,3
PV.09xSB.10	>1000	>1000	500	500			
PV.09xP.12	>1000	>1000	500	500		28,0	6,6
C.10xP.10	>1000	>1000	>1000	>1000	3,4		
C.10xSB.10	>1000	>1000	1000	750	3,3		
C.10xP.12	100	100	>1000	>1000	3,7		
P.10xSB.10	>1000	500	500	500		6,5	3,5
P.10xP.12	>1000	>1000	750	750		32,1	6,7
SB.10xP.12	>1000	500	>1000	>1000			

À semelhança da lista ordenada de extratos construída a partir de resultados de bioatividades obtidos por outros autores, segue-se a lista ordenada dos extratos e misturas testadas neste trabalho (Tabela 22) construída a partir da tabela anterior.

**Tabela 22:** Lista ordenada por % de eficiência biológica global das diferentes amostras ( EE e misturas de própolis) e respectivas % eficiências específicas (antimicrobiana, antioxidante e fitotóxica)

	Atividade Antimicrobiana (%)				Média	Capacidade antioxidante (%)	Atividade Fitotóxica (%)		Eficiência biológica global (%)
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>		Área total	Raiz	Hipocótilo	
PV.09xC.10	10	40	40	40	32,5	52	92	50	57
P.10xSB.10	10	40	40	40	32,5		90	44	55
SB.10	10	10	10	10	10	30	92	56	47
C.10	10	20	10	10	12,5	32	88	44	44
C.10xP.12	80	80	10	10	45	37			41
PV.09	10	10	40	40	25	57	74	-12	36
PV.09xSB.10	10	10	40	40	25				25
PV.09xP.12	10	10	40	40	25		56	-6	25
P.12	10	10	20	10	12,5	45	53	-12	25
P.10	10	10	10	20	12,5	51	30	0	23
C.10xSB.10	10	10	10	20	12,5	33			23
PV.09xP.10	10	10	40	40	25		60	-17	23
C.10xP.10	10	10	10	10	10	34			22
P.10xP.12	10	10	20	20	15		49	-7	19
SB.10xP.12	10	40	10	10	17,5				18

Analisando a Tabela 22, é possível concluir que misturas de própolis podem ter efeitos nas atividade biológicas do própolis, veja-se nomeadamente a mistura C.10xP.12, com uma eficiência antimicrobiana elevada (45%) quando comparada com os seus extratos etanólicos isolados C.10 e P.12 (ambos com 12,5 %). Relativamente aos EE isolados verificam-se alterações nas eficiencias biologicas obtidas, uma vez que SB.10 e C.10 são mais bioativos que PV.09, P.12 e P.10, contrariamente ao que verifica na tabela 8. Este resultado mostra a difícil tarefa de compilação e globalização dos resultados obtidos em diferentes anos por diferentes investigadores e metodologias. A nível da eficiência biológica global verifica-se que há misturas com % superiores às dos seus isolados, nomeadamente PV.09xC.10 (57 %) e P.10xSB.10 (55 %), ambos com atividades antimicrobiana, antioxidante e fitotóxica elevadas. Curiosamente as amostras colhidas em Pereiro a nível de eficiência biológica global não apresentam grandes diferenças 23 % para o EE P.10 e 25 % para P.12. Idealmente, para concluir o trabalho, seria necessário completar os resultados em falta e otimizar o método utilizado na avaliação da atividade fitotóxica. No entanto ainda há um longo caminho a percorrer no que diz respeito ao própolis, mistura natural extremamente complexa e variável dependendo dos constituintes e suas interações.

#### 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Da realização deste trabalho pode confirmar-se que o própolis português se trata de um produto natural que apresenta uma diversidade de atividades biológicas, nomeadamente antibacteriana, antifúngica, antioxidante e fitotóxica. A variabilidade encontrada no perfil e eficiência de bioatividades é explicada não só pelas diferentes proveniências do própolis, mas também com o seu ano de produção, ambos os fatores dependentes do clima e flora dominantes onde os apiários estão localizados.

Relativamente à atividade antimicrobiana foi possível concluir que a atividade antifúngica dos extratos etanólicos das amostras de própolis testadas foi geralmente superior à antibacteriana. Para além disso, e de acordo com o que tenho vindo a ser descrito, verificou-se que são mais ativos contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* do que contra a Gram-negativa *E. coli*. As misturas de extratos, de um modo geral, não apresentaram efeitos antagonistas, havendo várias combinações que apresentaram efeitos sinérgicos. Em particular a mistura C.10xP.12 induziu uma redução da MIC contra *E. coli* e *B. subtilis* de mais de 10x, sublinhando o valor da mistura de extratos de proveniências distintas na identificação/produção de produtos bioativos mais eficientes e eficazes.

O ensaio de interação com antibióticos comerciais mostrou a potencialidade de utilização do própolis nacional em combinação com antibióticos para diminuição da dose terapêutica, particularmente contra bactérias Gram-negativas, onde a interação foi mais evidente. Vários extratos potenciaram em particular o efeito da ciprofloxacina. A mistura C.10xP.12 não potenciou o efeito dos antibióticos relativamente aos observados com C.10 e P.12 individualmente, o que sugere que os compostos antimicrobianos possam ter um modo de ação semelhante ao dos antibióticos ou afetar as mesmas vias, não ocorrendo ganho de eficiência. De ter em atenção também que todo um trabalho de otimização de concentrações teria de ser realizado para se poderem tirar conclusões mais robustas relativamente à interação entre compostos/extratos de própolis e drogas comerciais.

A voltametria cíclica mostrou ser um método viável para avaliação da capacidade antioxidante de extratos complexos como os de própolis, permitindo comparar de um modo mais exato efeitos sinérgicos e antagónicos, pois é possível simular voltamogramas considerando a contribuição de cada EE e compará-los com os obtidos com as misturas. Os extractos PV.09 e P.10 revelaram-se aqueles com maior capacidade antioxidante e C.10 o menor. Contudo, este

último revelou possuir compostos que se oxidam mais facilmente que os restantes, podendo isto explicar o comportamento deste EE em mistura.

Esta possibilidade de rastreio rápido do perfil antioxidante de extratos e de combinações *ad-hoc* através de um método eletroquímico preciso e pouco exigente em termos de volume de amostra, poderá ser útil no desenho e caracterização de produtos padronizados à base de própolis.

Embora o método testado para avaliação rápida de atividade fitotóxica necessite de otimização, revelou-se sensível e com boa capacidade discriminante. O efeito dos extratos e misturas testadas no crescimento de raízes e hipocótilos foi muito evidente, observando-se uma enorme variabilidade de eficiências. A raiz revelou-se o órgão mais afetado, logo aquele com maior sensibilidade para a deteção de efeitos fitotóxicos e com valor diagnóstico. Os extratos C.10, PV.09 e SB.10 e as suas combinações binárias induziram inibições dramáticas no crescimento da raiz (mais de 90%). O PV.09 foi também aquele com maior atividade antifúngica o que parece sugerir ação numa via fundamental de células de eucariotas. Já os C.10 e SB.10, sem ação antifúngica ou antibacteriana, deverão ter exercido efeito em mecanismos específicos de plantas.

Este trabalho foi inovador no estudo de misturas de extratos de própolis e que revelou o enorme potencial de se testarem combinações de amostras distintas não só para identificação de novas bioatividades como no sentido de potenciar atividades biológicas previamente reconhecidas. Os extratos etanólicos mostraram ainda que, devido à sua composição rica em compostos fenólicos, têm capacidade de interagir com outras amostras naturais e drogas comerciais, havendo margem para a criação de novos produtos ou formulações de interesse industrial, da vertente farmacêutica à cosmética, alimentar e agronómica.

Para este trabalho estar completo seria importante robustecer a tabela de eficiência biológica global determinando as atividades específicas em falta, pois revelou-se um instrumento muito útil para conceção de ensaios de bioatividades. Em trabalho futuro seria interessante testar outras combinações possíveis, na tentativa de identificação de novas atividades, como também de efeitos sinérgicos e antagónicos.

A caracterização química dos extratos e misturas mais promissoras será uma tarefa incontornável, de modo a identificar os compostos presentes no própolis, perceber quais os compostos que interagem entre si e contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de ação

quer em microrganismos, quer em organismos multicelulares como as plantas, quer em modelos celulares animais.

Globalmente, os resultados obtidos mostram ainda que o própolis português é uma fonte valiosa de compostos e novas soluções com impacto na indústria e economia nacionais. Seria possível em concreto produzir misturas padronizadas do ponto de vista químico e das atividades biológicas. Uma outra abordagem importante para a valorização deste co-produto da atividade apícola, passaria também pela sensibilização dos apicultores portugueses para o valor deste produto ainda considerado por muitos como “lixo” na colmeia.

## 5. Bibliografia

- Alves C**, David JM, David JP, Bahia M, Aguiar R, (2010). Métodos para determinação de actividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 2204-2205
- Amorim J** (2011). Actividade fitotóxica e antimicrobiana de própolis Português (Pereiro e Guarda). Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho.
- Anon** (1927). The origin of the cooration of bee `s wax and the composition of propolis. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L 'Academie Des Sciences*,184:1134-1136
- Arvouet-Grand A**, Lejeune B, Bastide P, Pourrat A, Privat AM, Legret P (1992). Propolis extract. II. Wound healing the the rat and rabbit. *Journal de pharmacie de Belgique*, 48 (3):171-178.
- Awale S**, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota, S (2008). Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 181-189
- Baltazar A**, (2010). Estudo do efeito protetor do própolis de origem portuguesa na danificação oxidativa em eritrócitos humanos. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, 26
- Bankova VS**, De Castro SL, Marcucci, MC (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3–15
- Bankova V** (2005a). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnofarmacology*, 114-117
- Bankova V** (2005b). Recent trends and important developments in propolis Research. *Evid based Compl Alt Med*, 2 (1):29-32
- Banskota AH**, Tezuka Y, Kadota S (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*; 15:561-571
- Basnet P**, Matsuno T, Neidlein R, (1997) Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*, 52 (11-12):828-833
- Bauer**, AWWMM, Kirby, JC, Sherris A, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*, 36:493-496
- Bazo AP**, Rodrigues MAM, Sforcin JM, Viana de Camargo JL, Ribeiro LR, Salvadori DMF (2002). Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 22:183-194
- Biri M**, Albert JMA (1979). Moderna criação das abelhas. *Editorial de Vecchi*
- Bosio K**, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia, D (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol*, 31:174–177
- Boyanova L**, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, Mitov I, Krastev Z (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*, 54(5): 481-483
- Brumfitt W**, Hamilton-Miller JM, Franklin I (1990). Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. *Microbios*, 62:19-22

- Burdock G**, (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis, *Food and Chemical Toxicology*, 36:347–363
- Buriol L**, (2008). Extratos etanólicos e oleosos de própolis: Quantificação e actividade biológica, Universidade estadual do Centro-Oeste
- Cabral I**, Oldoni T, Prado A, Bezerra R, Alencar S (2009). Composição fenólica, actividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 1523
- Callejo A**, Armentia A, Lombardero M, Asentio T (2001). Propolis, a new bee-related allergen. *Allergy*, 56:579-579
- Capasso S** Castaldo F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine *Fitoterapia*, Volume 73, Suppl 1:1-6
- Corona MEP**, Crespo E, Rodrigo J, Santos JA, De Las Heras P, Castro-Díez P, De Aldana VBR (2011) Efecto alelopático de especies invasoras de ribera. *Sociedad Española para el Estudio de los Pastos* 1:189-194
- Carvalho L** (2012). Obtenção de extratos de própolis da Serra do Gerês e determinação da sua actividade antimicrobiana e fitotóxica. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho.
- Carvalho R** (2013). Characterization of the antitumoral activity of Portuguese propolis. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho.
- Carvalho RS**, Gonçalves VMM, Ferreira AM, Cardoso SM, Sobral AJ, Aguiar CA, Baltazar F (2014). Antitumoral and antiangiogenic activity of Portuguese propolis *in vitro* and *in vivo* models.
- Castaldo S**, Capasso F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 Suppl 1:1-6
- Chaillou LL**, Nazareno MA (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT-Food Science and Technology*, 42 (8):1422-1427
- Chen L**, Mohr SN, Yang CS (1996). Decreased of plasma and urinary oxidative metabolites of acetaminophen after consumption of watercress by human volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 60:651-660
- Chen CN**, Wu CL, Lin JK (2007). Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwenense propolis. *Cancer letters*, 245:218-231
- Chevion S**, Roberts M, Chevion M, (2000). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity, *Free Radical Biology and Medicine* :861-863
- Chia-Nana C**, Chia-Lib W, Jen-Kuna L (2004). Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome C release in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol*, 67:53-66.
- Cirasino L**, Pisati A, Fasani F (1987). Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 16(2):110-111

- Claus R**, Kinscherf R, Gehrke C, Bonaterra G, Basnet P, Metz J, Deigner HP (2000). Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittel-Forsch* 50:373-379.
- Cruz M** (2011). Evaluation and characterization of antioxidant and antigenotoxic properties of Portuguese propolis. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Bio-emprededorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais. Universidade do Minho.
- Cuesta-Rubio O**, Frontana-Urbe BA, Ramirez-Apan T, Cardenas J (2002) Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z Naturforsch C*, 57: 372-378
- Cushnie T**, Lamb A (2005). Antimicrobial activity of flavonoids – review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 344-347
- De Castro SL**, Higashi KO (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of ethnopharmacology*, 46(1):55-58
- Demestre M**, Messerli SM, Celli N, Shahhossini M, Kluwe L, Mautner V, Maruta H (2009). CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytotherapy Research*, 23(2); 226-230
- Devasagayam TPA**, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *J. Assoc. Phys. India*, 52:794-804
- Díaz-Carballo D**, Malak, S, Bardenheuer W, Freistuehler M, Reusch H. P. (2008a). The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16 (22):9635-9643
- Díaz-Carballo D**, Freistã HM, Malak S, Bardenheuer W, Reusch HP (2008b). Mucronulatol from Caribbean propolis exerts cytotoxic effects on human tumor cell lines. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 46 (5):226-235.
- Drago L**, Mombelli B, De Vecchi E, Fassina MC, Tocalli L, Gismondo MR (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemotherapy*, 12:390-395
- Farooqui T**, Farooqui AA (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4:779-793
- Fernandes F F**, Dias, A. L. T., Ramos, C. L., Ikegaki, M., Siqueira, A. M. D., & Franco, M. C. (2007). The "in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49 (2): 93-95
- Fernandes Junior A**, Balestrin EC, Betoni JEC, Orsi RDO, Cunha MDLRD, Montelli AC (2005). Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (5): 563-566
- Ferreira S** (2012). Avaliação da actividade fitotóxica e antimicrobiana de própolis Português. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Foley JA**, De Fries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Snyder PK (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309 (5734): 570-574

- Freitas A** (2013). Avaliação de Bioatividades de uma Amostra de Própolis de Origem Portuguesa. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Funari SR** (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol* 73:243–249
- Garcia-Viguera C**, Greenaway W, Whatley FR (1992). Composition of propolis from two different Spanish regions. *Z Naturforsch C*, 47:634-637
- Gekker G**, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK (2005) Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol* 102:158–163.
- Ghisalberti EL** (1979). Propolis: a review. *Bee World* 60, 59–84.
- Guimarães M** (2009). Avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extractos de própolis. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Halliwell B** (1997). Antioxidants and Human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*. 55 Suppl 1: 44-49
- Halliwell B** (1999). Oxygen and nitrogen are procarcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen sp.: measurement, mechanism and effects of nutrition. *Mutat. Res*, 443: 37-52
- Han SK**, Park HK (1995). A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP on protein change of meat products. *Korean Journal of Animal Science* (Korea Republic)
- Hegazi AG**, El Hady FK, Abd Allah FA (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C*, 55: 70-75
- Hegazi AG**. El Hady FK (2001): Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z Naturforsch C*, 56: 82-88.
- Holderna E**, Kedzia B (1987). Investigation upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. *Herba Pol*, 33 (2):145-151
- Isla MI**, Nieva Moreno M I., Sampietro A.R., Vattuone M.A., 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol*, 76 (2): 165-170
- Jasprica I**, Mornar A, Debeljak Ž, Smolčić-Bubalo A, Medić-Šarić M, Mayer L, Šverko V (2007). In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 110 (3): 548-554
- Kaneeda J**, Nishina T (1994). Safetiness of propolis. Acute toxicity. *Honeybee Science*, 15, 29-33
- Kasuma Y**, Kenichi I (2001a). Propolis composition and its production. *JP Pat*, 20010374227 (A)
- Kasuma Y**, Kenichi I (2001b). Extraction of propolis extract. *JP Pat*, 2001017096 (A)
- Kenny GE**, Cartwright FD, Roberts MC (1986). Agar dilution method for determination of antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum*. *Pediatr. Infect. Dis*, 5:338-340
- Kim SH.**, Cheon, H.J, Yun N., Oh S.T., Shin E., Shim K.S., Lee S.M. (2009). Protective effect of a mixture of *Aloe vera* and *Silybum marianum* against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and liver fibrosis. *J Pharmacol Sci*, 109:119-127

- Kimoto** N, Hirose M, Kawabe M, Satoh T, Miyataka H, Shirai T (1999). Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. *Cancer letters*, 147 (1):221-227
- Krol** W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z (1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-forsch*, 43:607-609
- Kujumgiev** A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *J.Ethnopharmacol*, 64:235-40
- Kumar** N, Ahmad M, Dang R and Husain A. (2008) Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu Zone. *J.Med Plant Res*, 2 (12):361-364
- Kumazawa** S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84:329-339
- Laskar** RA, Sk I, Roy N, Begum NA (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122:233-237
- Lavie** P (1976). The relationship between propolis, poplar buds (*Populus* spp.) and castereum. *Proc. XXV, International Beekeeping Congress, Grenoble, 1975*. Apimondia Publication Hause. Bucharest: 229-233
- Lee** SC, Fung CP, Lee N, See LC, Huang JS, Tsai CJ, Chen KS, Shieh WB (2001). Fluconazole disk diffusion test with methylene blue- and glucose-enriched Mueller-Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol*, 39:1615-1617
- Levy** SB (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemoth*, 49 25-30
- Li** F, Awale S, Tezuka Y, & Kadota S (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structureactivity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16:5434-5440.
- Lourenço** T (2013). Preparação de extratos de própolis dos Açores e avaliação das suas actividades antimicrobiana e antioxidante. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho.
- Lu** LC, Chen YW, Chou CC (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 102 (2):213-20
- Lustosa** S, Galindo A, Nunes L, Randau K, Neto P (2008). Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (3):447-460
- Madrigal-Santillán** E, Madrigal-Bujaidar E, Cruz-Jaime S, Valadez-Vega MC, Sumaya-Martínez MT, Pérez-Ávila KG, Morales-González JA (2013). The Chemoprevention of Chronic Degenerative Disease Through Dietary Antioxidants: Progress, Promise and Evidences. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants. Rijeka: Croatia InTech* : 155-185
- Magro-Filho** O, Carvalho ACPD (1994). Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. Cytological and clinical evaluation. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 36 (2)102-111

- Mairesse** LAS (2005) Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos 329. Tese Doutorado em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria
- Malaspina**, O., Palma, M., (1996). Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação. Instituto de Biociências de Rio Claro
- Mani** F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM (2006). Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol*, 105:95-98
- Marcucci** MC (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83–99
- Marcucci** MC (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19:529-536
- Marcucci** MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N (2001) Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74 (2): 105-112
- Markham** KR, Mitchel KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y (1996). HPLC and CG-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *Phytochemistry* 42: 205-211
- Marquele** FD, Oliveira ARM, Bonato PS, Lara MG, Fonseca MJV 2006. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 41: 461-468
- Marques** R (2013). Avaliação da actividade antimicrobiana de própolis. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Matsuno** T (1995). A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Z Naturforsch C*, 50: 93-97
- McFarland** J (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49 (14):1176-1178.
- Menezes** H (2005). Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas, *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo.
- Mirzoeva** O K, Grishanin R N, Calder PC (1997): Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res*, 152: 239–246.
- Mohammadzadeh** S; Sharriatpanahi M, Hamedi M; Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN (2007) Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*. 103: 729-733
- Monti** M, Berti EC, Arminati G, Cusini M (1983) Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 9 (2): 163-163
- Moreira** LL, Dias LG, Pereira JÁ, Estevinho, L (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3482-3485

- Moreira**, LL, Dias T, Dias, LG, Rogão M, Da Silva, JP, Estevinho, LM (2011). Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 520-526
- Murad** JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova VS, Sforcin JM (2002). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 79: 331-334
- Murashige** T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497
- Novak** EM, Silva MSC, Marcucci MC, Sawaya ACHF, López BGC, Fortes MAHZ, Giorgi RR, Marumo KT, Rodrigues RF, Maria DA (2014). Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An *in vitro* and *in vivo* study. *Journal of functional foods* 11: 91-102
- Ozkul** Y, Silici S, Eröglu E (2004). The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* 12: 742-747
- Oldoni** T (2007). Isolamento e identificação de compostos com actividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, Universidade de São Paulo
- Oliveira** I (2010). Avaliação das propriedades antitumorais de extratos de própolis nas células tumorais humanas (HCT-15). Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Oliveira** H (2011). Actividade fitotóxica e antimicrobiana de própolis Português (Pereiro e Guarda). Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Orsi** RO, Sforcin JM, Rall VLM, Funari SRC, Barbosa L, Fernandes JRA. 2005 Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J Venomous Anim Toxins including Trop Dis*, 11: 109-116
- Orsolich** N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I (2005). Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumour formation and growth. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28: 1928-1933
- Ozkul** Y, Silici S, Eroglu E (2004). The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Journal of Phytomedicine*, 742
- Park** YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury, JA, Rosalen, PL (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol*, 36, 24-28
- Park** YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*, 50: 2502-2506
- Paulo** J (2009). Avaliação da actividade antimicrobiana e alelopática de extratos de própolis. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Pereira** ADS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR (2002). Própolis: 100 years of research and future perspectives. *Química Nova*, 25:321-326
- Pereira** J (2008). Avaliação da actividade antimicrobiana e fitotóxica de amostras de própolis Português. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho

- Pereira H** (2013). Genotoxic, phytotoxic and protective effects of Portuguese própolis. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Bio-emprededorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais. Universidade do Minho
- Popravka SA** (1978) Chemical composition of propolis, its origin and standardization. *A remarkable Hive Product: Propolis Apimondia Publicaton House, Bucharest*: 15-18
- Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS** (1992). Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, 84: 277-290
- Sahinler N, Kaftanoglu O** (2005) Natural product propolis: chemical composition. *Nat Prod Res*, 19: 183-188
- Salatino A, Teixeira ÉW, Negri G** (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (1): 33-38.
- Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, Da Silva Cunha IB, Araujo, CEP, Shimizu MT** (2002). Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 35 (3): 203-207.
- Scheller S, Szflarski J, Tustanowski J, Nolewajka E, Stojko A** (1977). Biological properties and clinical application of propolis (I). Some physico-chemical properties of propolis. *Arzneim.-Forsch (Drug Res.)* 27: 889-890.
- Scheller S, Ilewicz I, Luciak M, Skrobidurska D, Stojko A, Matuga W** (1978). Biological properties and clinical application of propolis (IX). Experimental observation on the effect of ethanol extract of propolis (EEP) on dental pulp regeneration. *Arzneim.-Forsch (Drug Res.)* 28:289-291.
- Sforcin JM, Fernandes A, Lopes CA, Bankova V, Funari SR.**(2000). Seasonal effect on Brazilian propolis and antibacterial activity. *Apitherapy*, 23(5): 314-316
- Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V** (2005). Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*. 98: 301-305
- Sforcin JM** (2007) Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*, 113:1-14.
- Sicili S, Kutluca S** (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 69-73
- Silva A** (2009). Caracterização Físico-Química, actividade antimicrobiana e antioxidante. Tese de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Viçosa
- Silva E** (2010). Avaliação da Actividade Antimicrobiana de própolis Português. Relatório de Projeto de Licenciatura, Departamento de Biologia, Universidade do Minho
- Silva J** (2012). Própolis: teor em fenóis totais e actividades antimicrobiana e inibitória da enzima hialuronidase. Tese de Mestrado Farmacia e Quimica de Produtos Naturais. Instituto Politécnico de Bragança
- Silva E, Muniz M, Nunomurra R** (2013). Constituintes fenólicos e actividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Química Nova*, 628 (5): 628-633

- Simões** LMC, Gregório LE, Da Silva Filho, AA, De Souza ML, Azzolini AECS, Bastos JK, Lucisano-Valim YM (2004). Effect of brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:59-65
- Stepanović** S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M (2003) In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res*, 158: 353–357
- Teixeira** EW, Negri G, Meira RM, Message D, Salatino (2005). A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (1): 85-92
- Tosi** EA, Ré E, Ortega ME, Cazzoli AF (2007). Food preservative based on propolis: bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli. *Food Chem*, 104: 1025–1029
- Trusheva** B, Popova M, Bankova V, Simona S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I (2006). Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 3: 249–254
- Urquiaga** I, Leighton F (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33(2):55-64
- Uzel** A, Sorkun K, Ozant, O, Cog D, Gencay O, Salidh B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160: 189–195
- Valença** I (2011). Estudo da actividade antimicrobiana e antitumoral de própolis Português. Tese de Mestrado em Genética Molecular. Universidade do Minho
- Valença** I, Morais-Santos, F, Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Almeida-Aguiar, C., & Baltazar, F. (2013). Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 184.
- Valko** M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser, J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1): 44-88
- Vargas** A, Logueiro A, Witt N, Costa M, Sila M, Viana L, (2004). Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, 34(1): 159-163
- Vicentino** ARR, Menezes FS (2007). Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev Bras Farmacogn* 17:384-387
- Viuda-Martos** M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA (2008). Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *J Food Sci*, 73(9): 116-124.
- Volpi** N, Bergonzini G (2006) Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354–361
- Walker** KJ, Stevens PA, Stevens DP, Mountford JO, Manchester SJ, Pywell RF (2004). The restoration and re-creation of species-rich lowland grassland on land formerly managed for intensive agriculture in the UK. *Biological Conservation*, 119, (1): 1-18
- Wollenweber** E, Hausen BM, Greenaway W (1990) Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. *Bulletin de Groupe Polyphenol*, 15:112–120

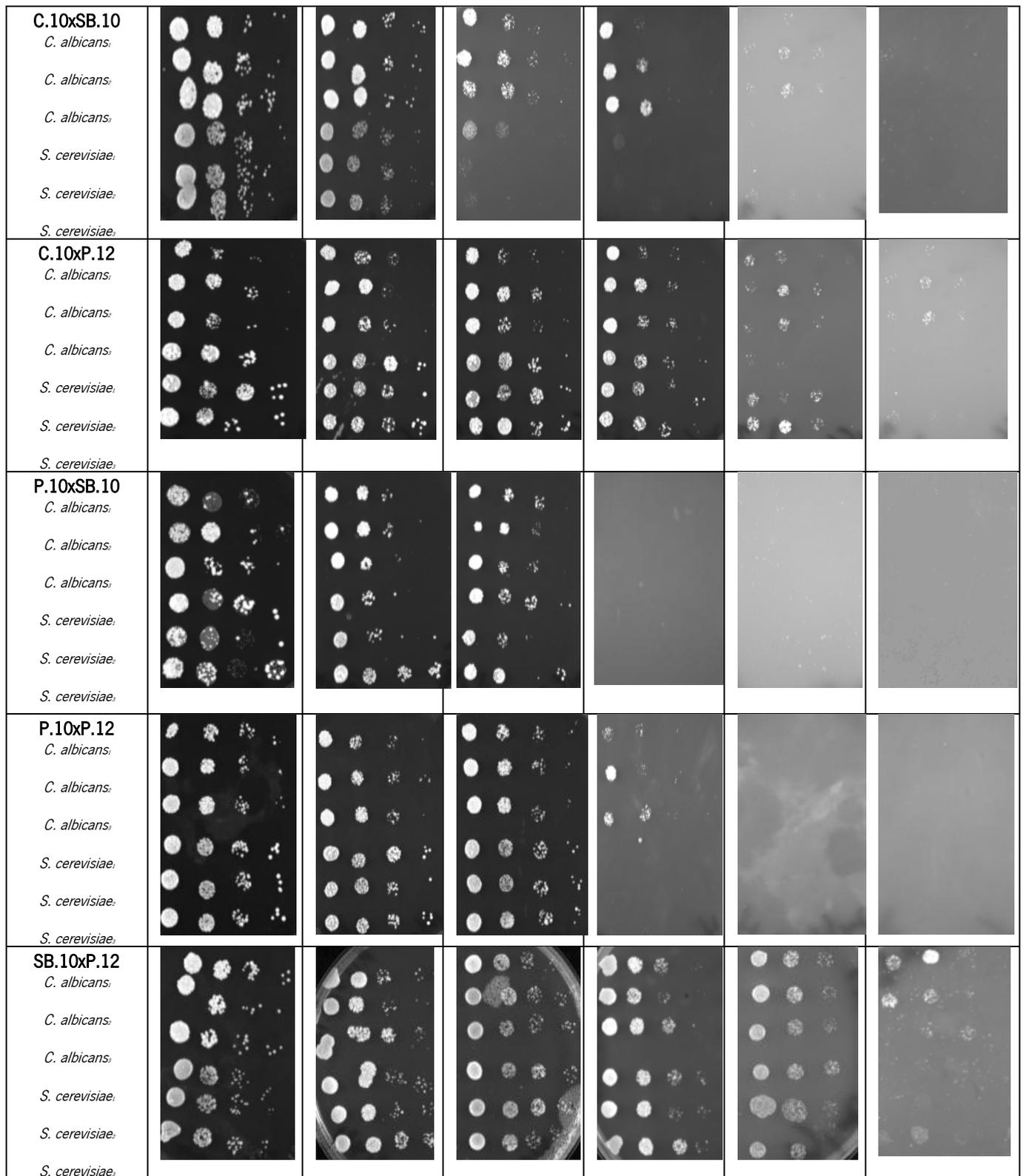
Anexos

Anexo 1 – Atividade antimicrobiana

	Controlo 10 <sup>+</sup> 10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	100 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	200 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	500 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	750 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	1000 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>
<b>C.10</b> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>						
<b>P.10</b> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>						
<b>P.12</b> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>						
<b>PV.09</b> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>						
<b>SB.10</b> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>						

Figura A1.1: Fotografias tiradas em ChemiDoc XRS (BioRad) das culturas de *C. albicans* e *S. cerevisiae* em placas com extratos etanólicos de própolis incorporados no meio YPD em diferentes concentrações.

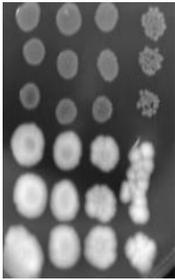
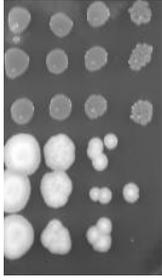
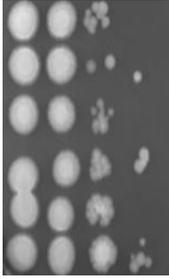
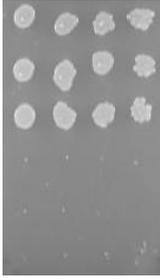
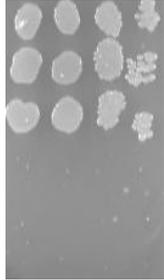
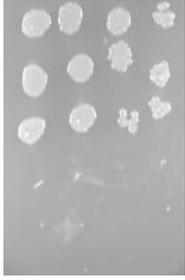
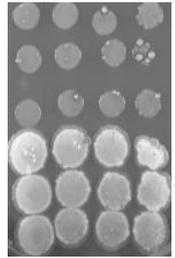
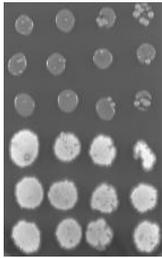
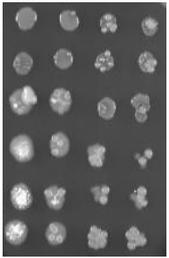
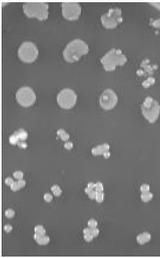
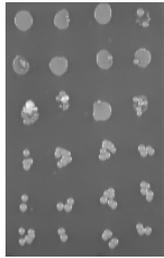
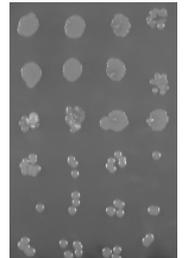
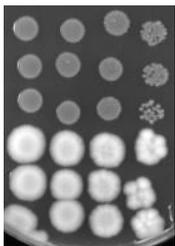
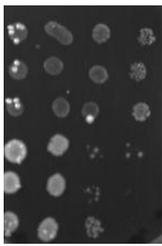
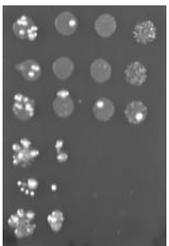
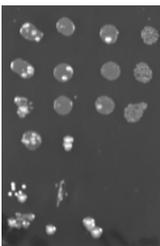
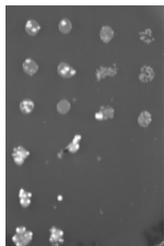
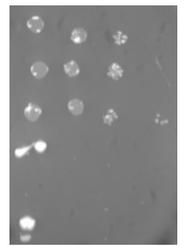
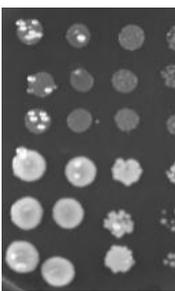
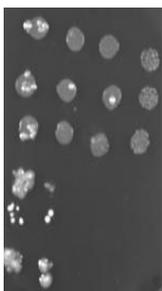
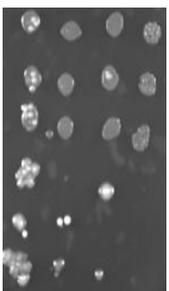
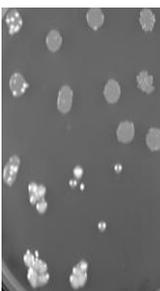
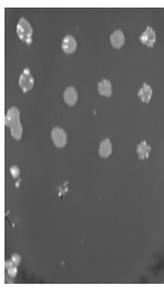
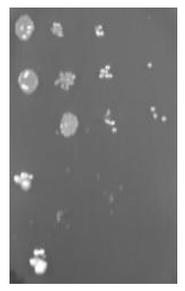
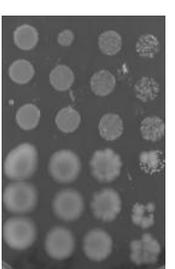
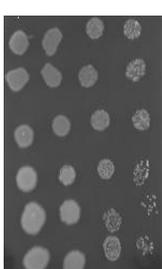
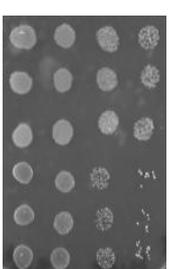
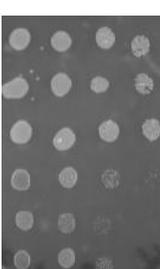
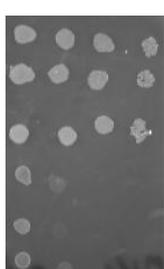
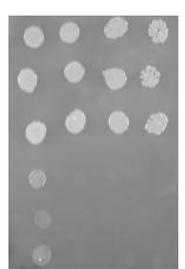
	Controlo 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	100 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	200 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	500 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	750 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	1000 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>
<b>PV.09xC.10</b> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i>						
<b>PV.09xP.10</b> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i>						
<b>PV.09xSB.10</b> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i>						
<b>PV.09xP.12</b> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i>						
<b>C.10xP.10</b> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>C. albicans.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i> <i>S. cerevisiae.</i>						

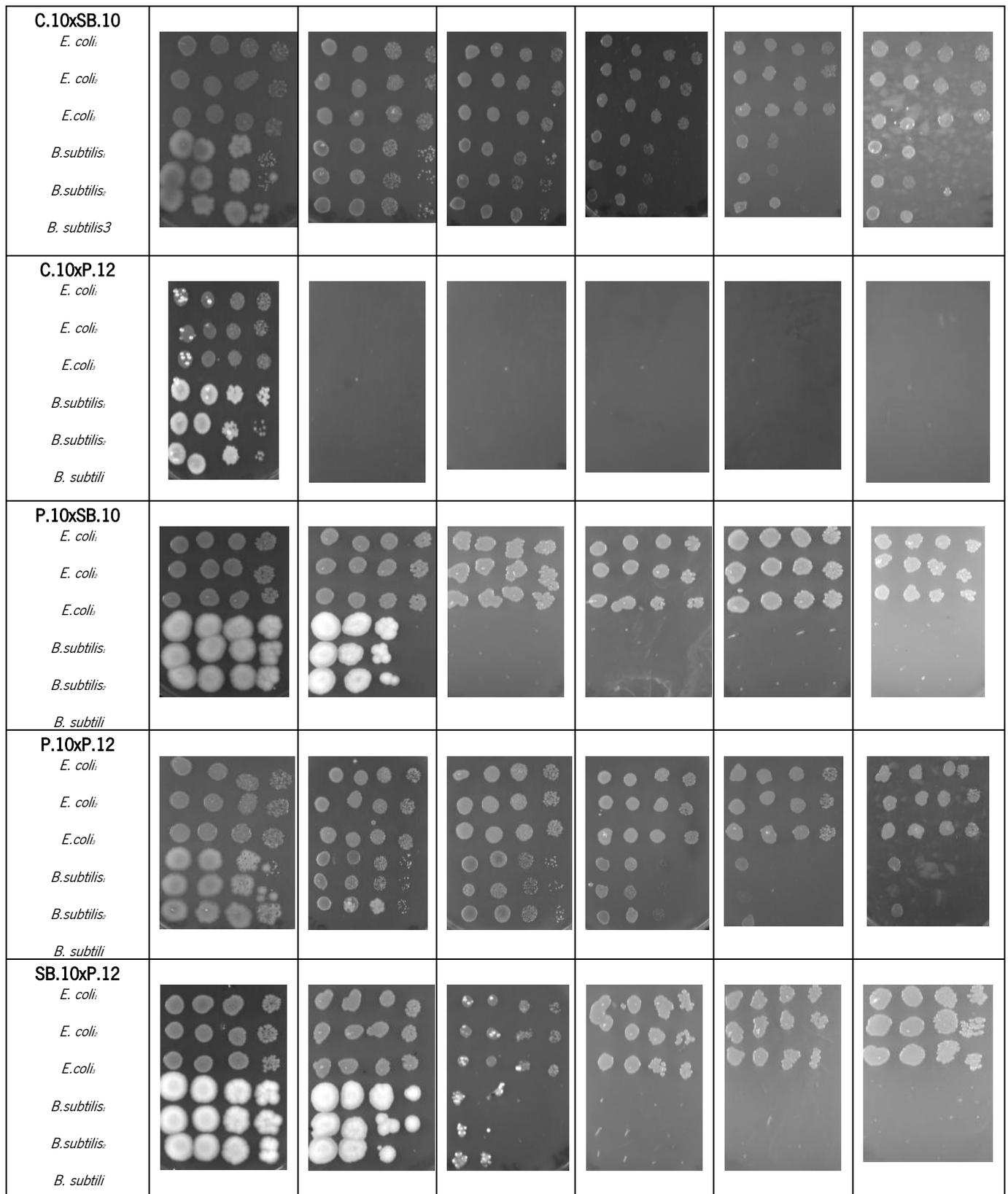


**Figura A1.2:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *C. albicans* e *S. cerevisiae* em placas com misturas de extratos etanólicos de própolis incorporados no meio YPD em diferentes concentrações.

	Controlo 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	100 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	200 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	500 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	750 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	1000 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>
<b>C.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>						
<b>P.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>						
<b>P.12</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>						
<b>PV.09</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>						
<b>SB.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i>						

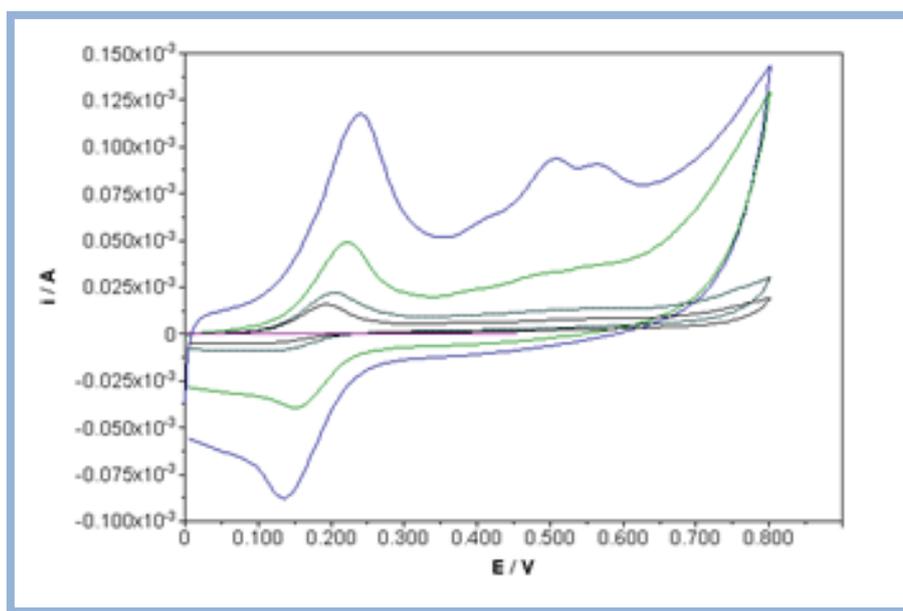
**Figura A1.3:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *E. coli* e *B. subtilis* em placas com extratos etanólicos de própolis incorporados no meio LB em diferentes concentrações.

	Controlo 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	100 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	200 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	500 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	750 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>	1000 µg/ml 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup> 10 <sup>+</sup>
<b>PV.09xC.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis3</i>						
<b>PV.09xP.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis3</i>						
<b>PV.09xSB.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis3</i>						
<b>PV.09xP.12</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis3</i>						
<b>C.10xP.10</b> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis3</i>						

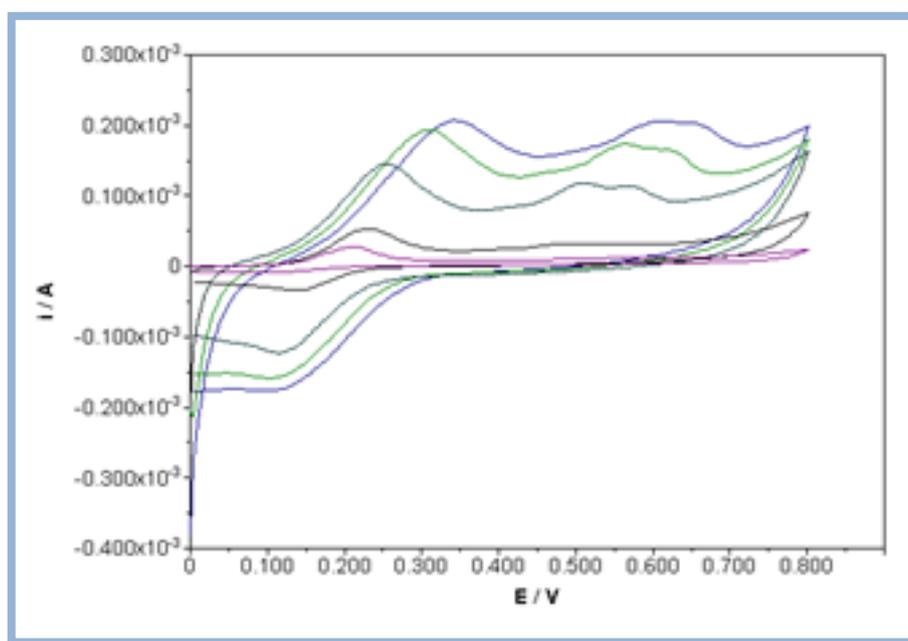


**Figura A1.4:** Fotografias tiradas em Chemi doc XRS (BioRad) das culturas de *E. coli* e *B. subtilis* em placas com misturas de extratos etanólicos de própolis incorporados no meio LB em diferentes concentrações.

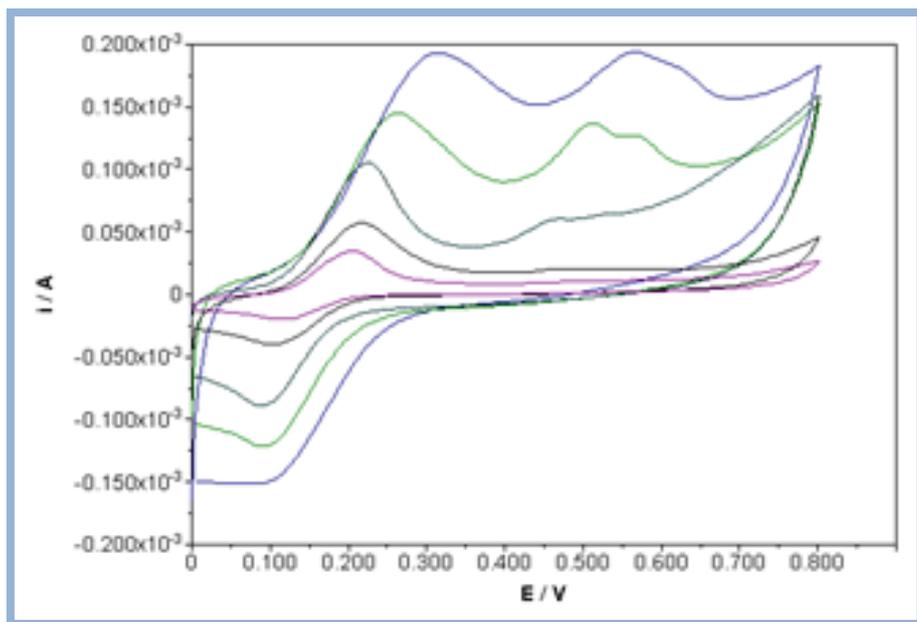
## Anexo 2 – Capacidade antioxidante



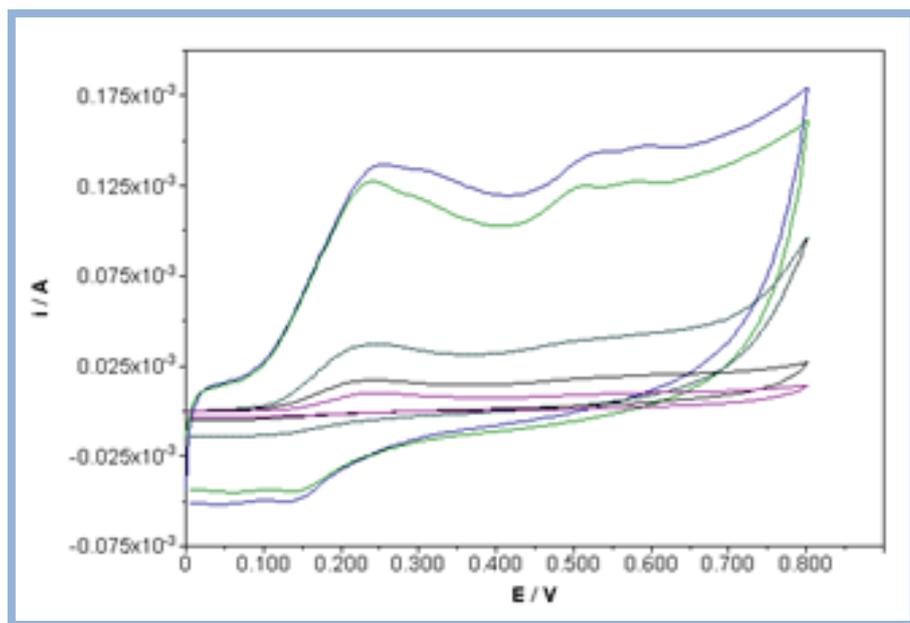
**Figura A2.1:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato SB.10, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).



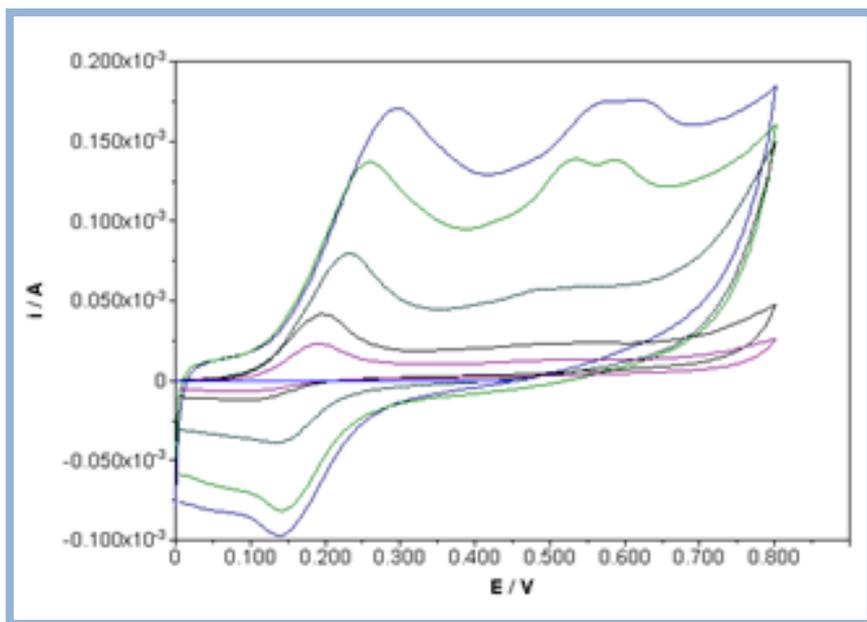
**Figura A2.2:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato PV.09, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).



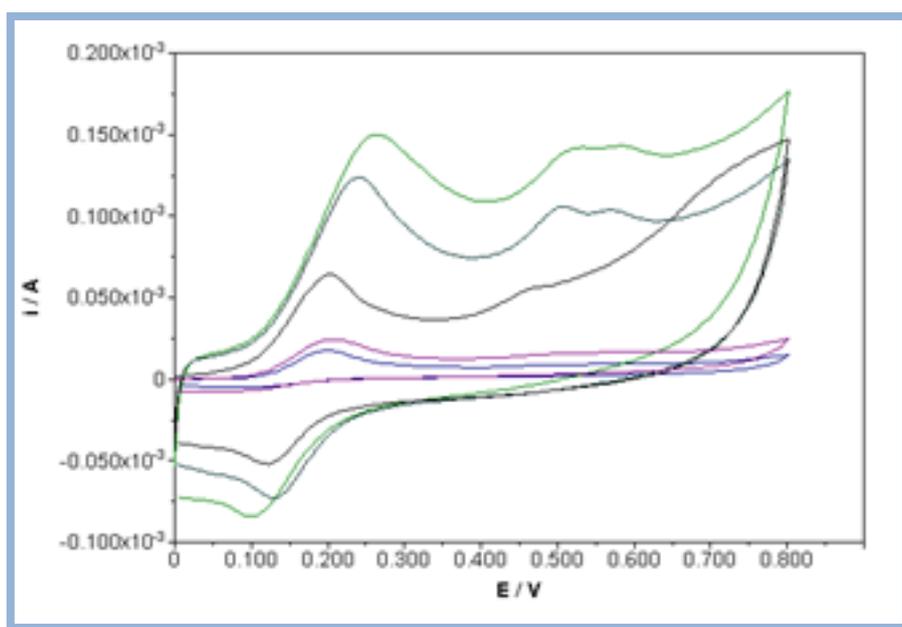
**Figura A2.3:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato P.10, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).



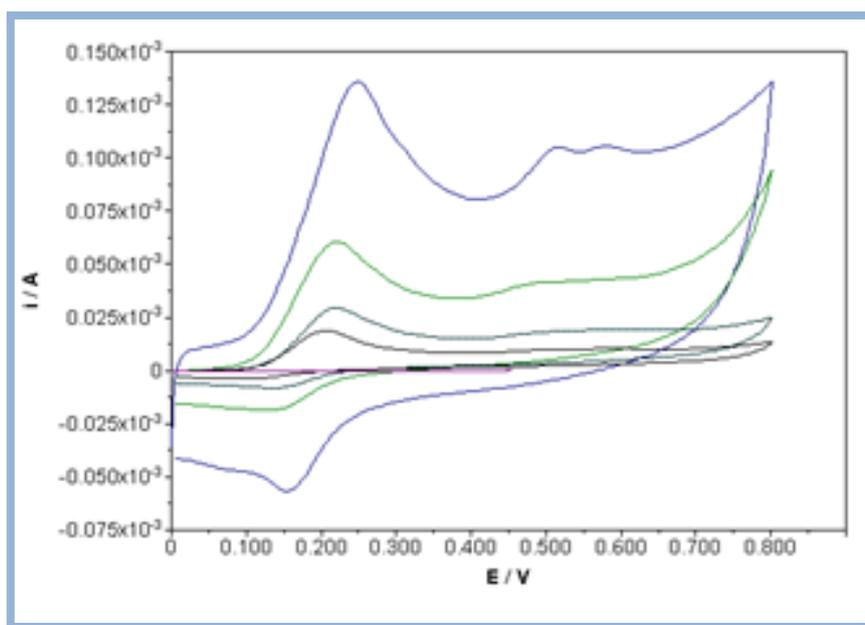
**Figura A2.4:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para o extrato C.10, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).



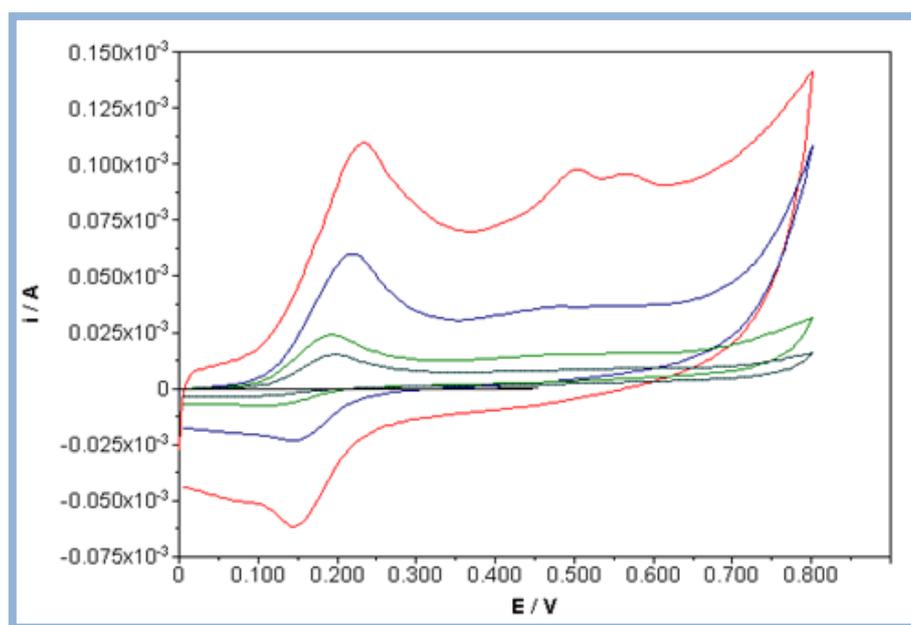
**Figura A2.5:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xPV.09, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).



**Figura A2.6:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xP.10, com concentrações: 0,001 g/ml (azul), 0,002 g/ml (roxo), 0,005 g/ml (preto), 0,01 g/ml (azul ciano) e 0,02 g/ml (verde).



**Figura A2.7:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xP.12, com concentrações: 0,001 g/ml (roxo), 0,002 g/ml (preto), 0,005 g/ml (azul ciano), 0,01 g/ml (verde) e 0,02 g/ml (azul).



**Figura A2.8:** Voltamogramas cíclicos obtidos à velocidade de 100 mV/s, para a mistura de extratos C.10xSB.10, com concentrações: 0,001 g/ml (azul ciano), 0,002 g/ml (verde), 0,005 g/ml (azul) e 0,01 g/ml (vermelho).

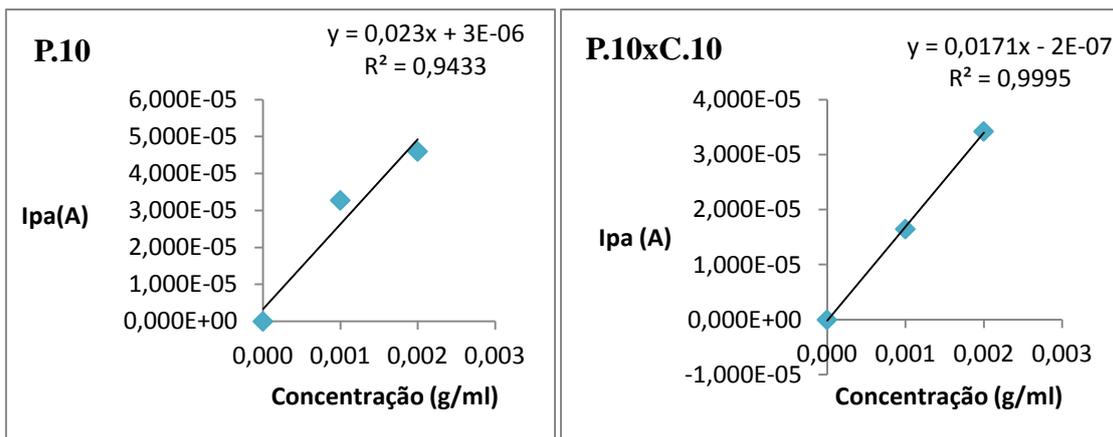


Figura A2.9: Representação gráfica da intensidade de pico anódica (Ipa) em função da concentração do extrato P.10 e a sua mistura com C.10.

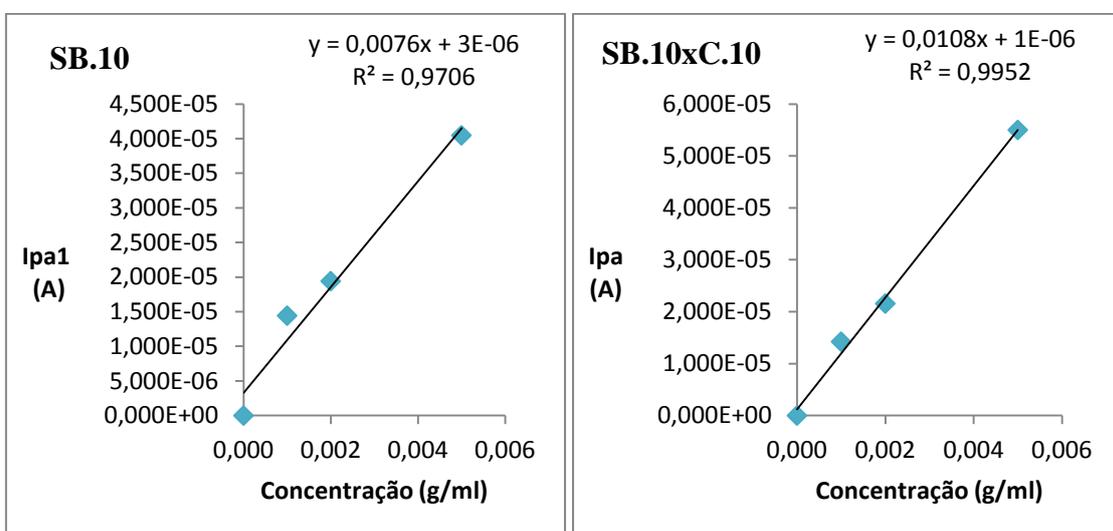


Figura A2.10 Representação gráfica da intensidade de pico anódica (Ipa) em função da concentração do extrato SB.10 e a sua mistura com C.10.

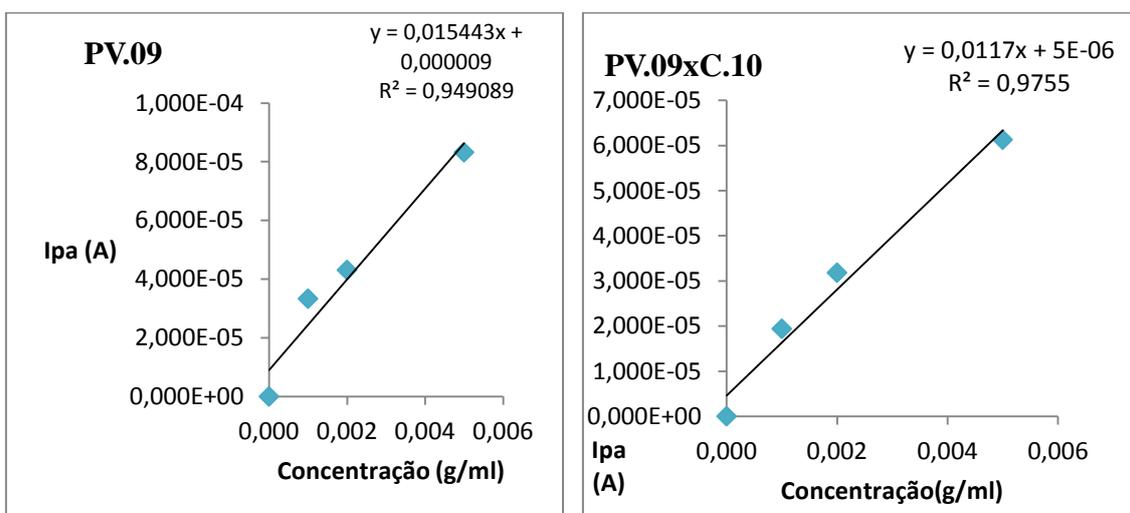


Figura A2.1137: Representação gráfica da intensidade de pico anódica (Ipa) em função da concentração do extrato PV.09 e a sua mistura com C.10.

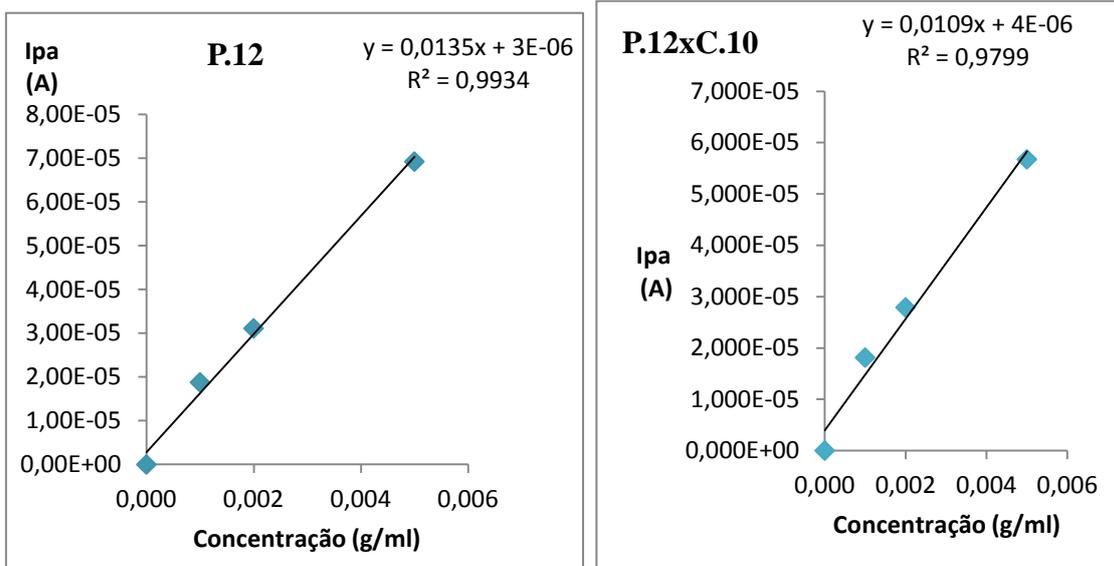


Figura A2.12: Representação gráfica da intensidade de pico anódica (Ipa) em função da concentração do extrato P.12 e a sua mistura com C.10.

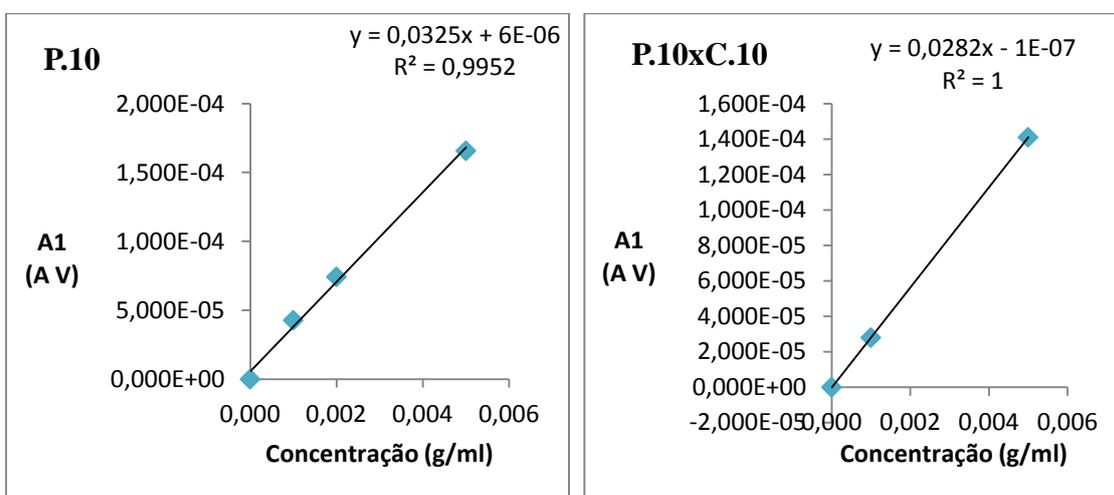


Figura A2.13: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato P10 e respetiva mistura com C.10.

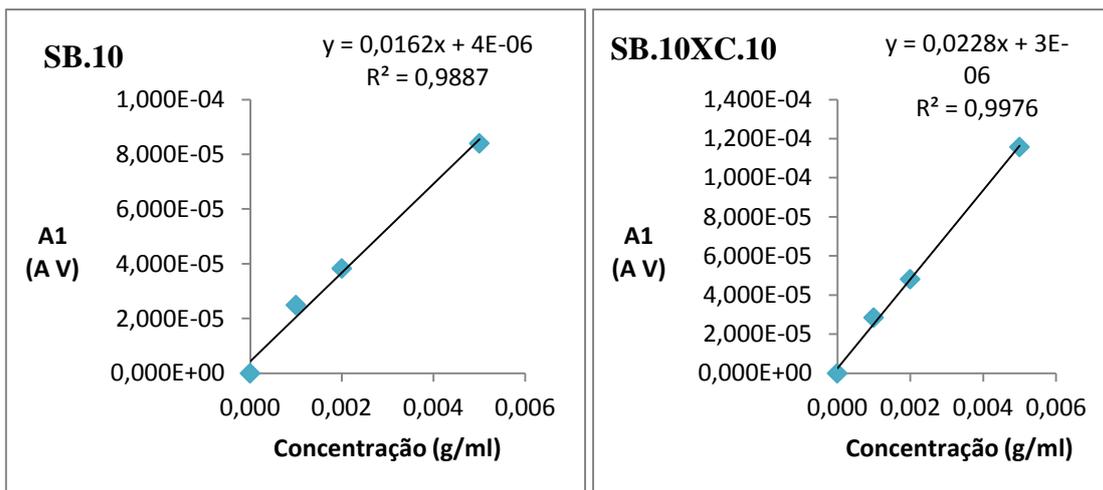


Figura A2.14: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato SB.10 e respetiva mistura com C.10.

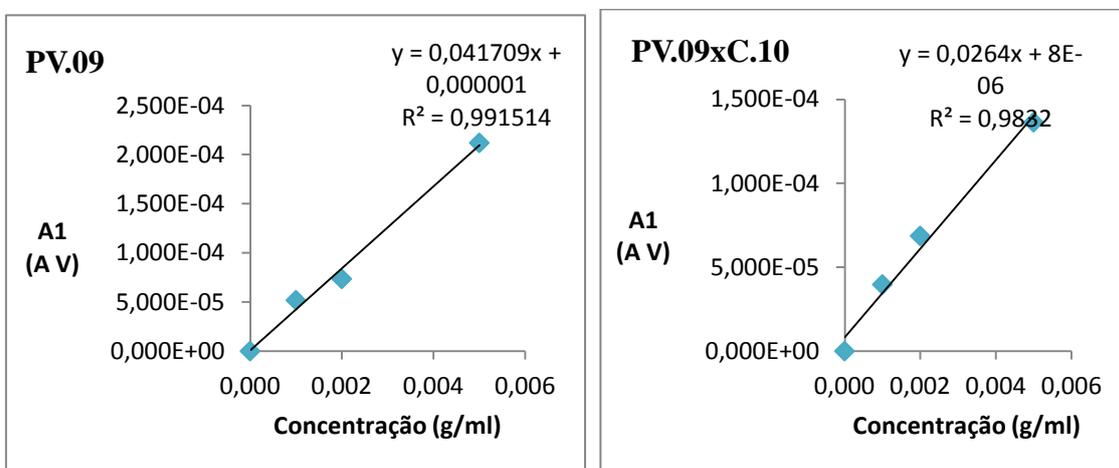


Figura A2.15: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato PV.09 e respetiva mistura com C.10.

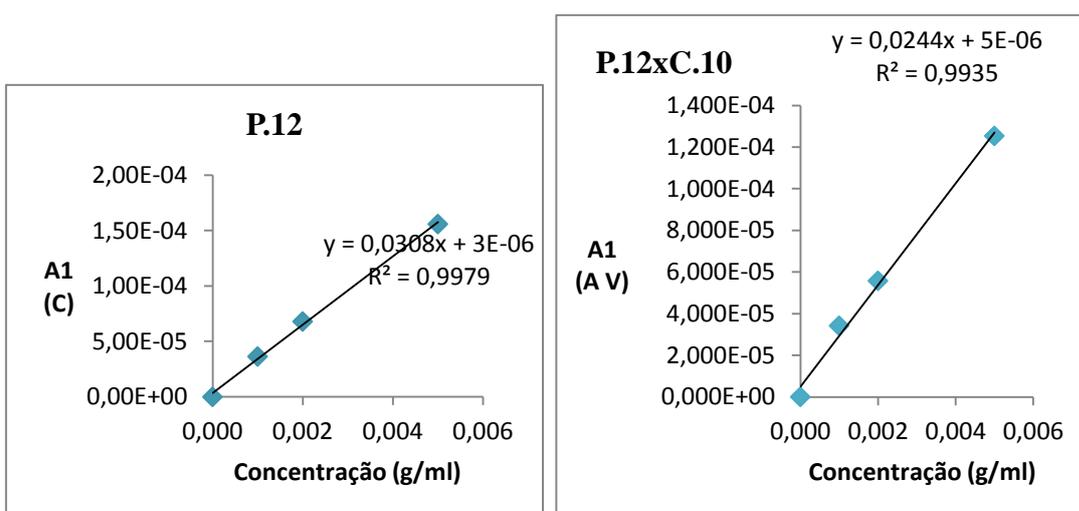


Figura A2.16: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,425 V (A1) em função da concentração do extrato P.12 e respetiva mistura com C.10.

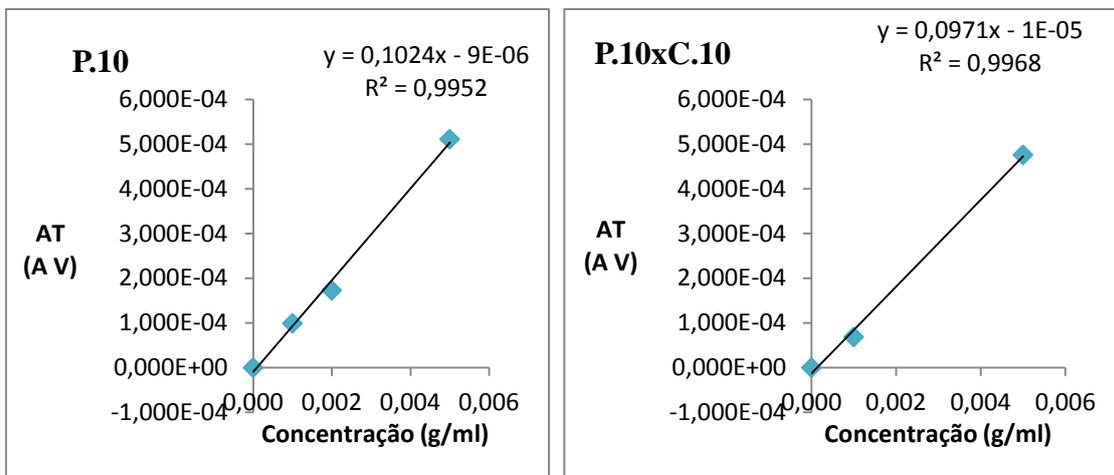


Figura A2.17: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato P.10 e mistura com C.10

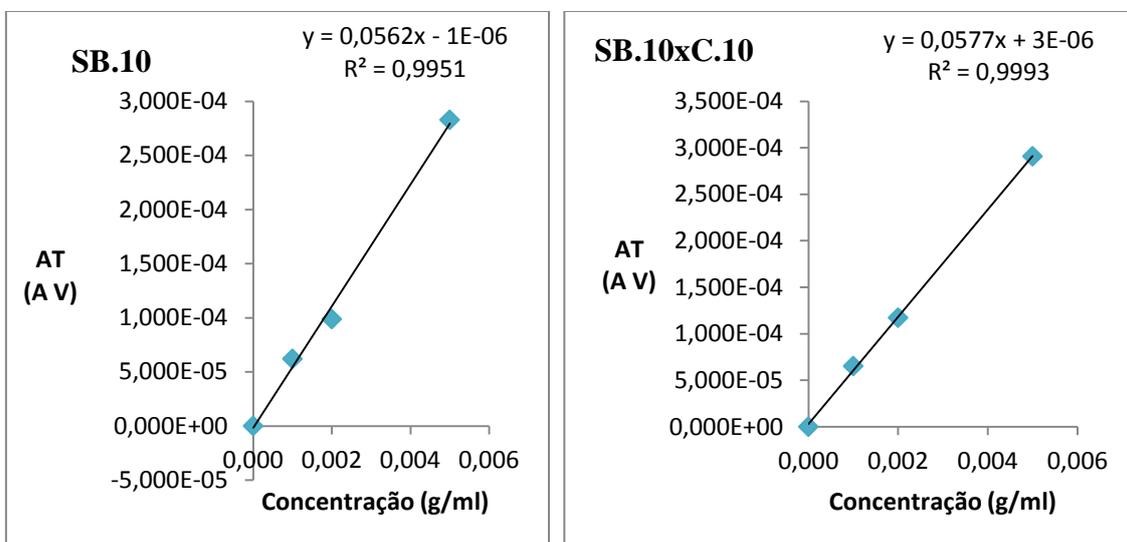


Figura A2.18: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato SB.10 e mistura com C.10.

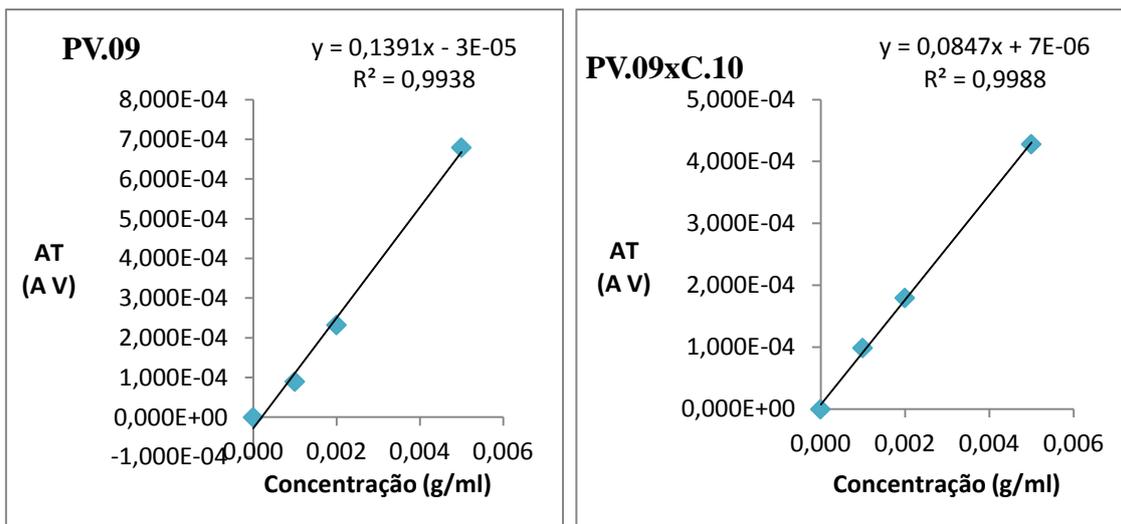


Figura A2.19: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato PV.09 e mistura com C.10.

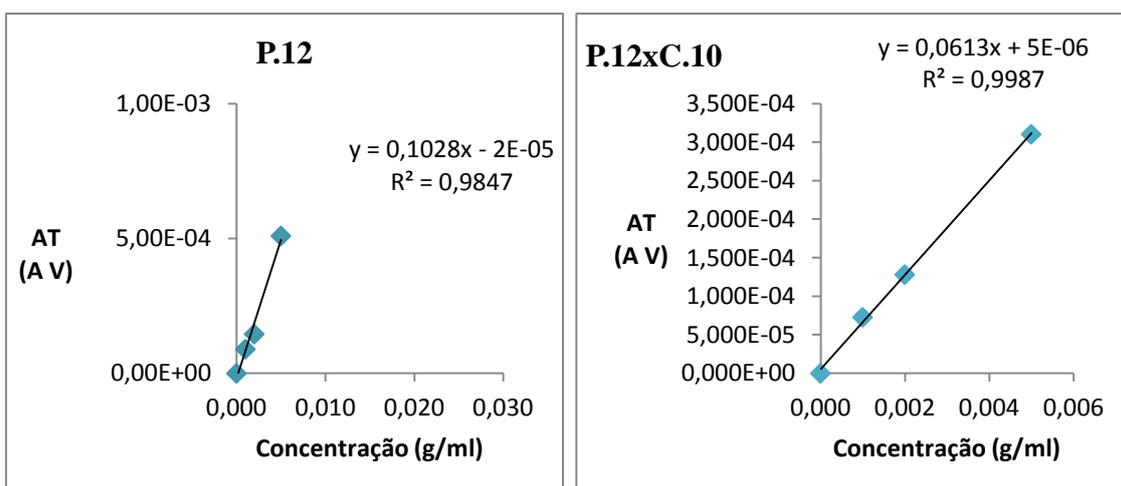


Figura A2.20: Representação gráfica da área sob o pico integrada de 0 V a 0,800 V (AT) em função da concentração do extrato P.12 e mistura com C.10.

**Tabela A2.1:** Capacidade antioxidante dos extratos e de misturas de extratos, expressa em equivalente de ácido gálico, determinada a partir da intensidade de pico anódica, [AG]; da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V, [AG]<sub>A1</sub>, e da área do voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V ([AG,AT]eq) e equivalente de ácido gálico para o extrato, determinado nas mesmas condições em ensaio com concentração 0,002 g/ml.

	Concentração 0,002 g/ml								
Extratos / Misturas	C.10	P10	C10x P10	SB10	C10x SB10	PV09	C10x PV09	P12	C10x P12
Ipa (A)	2,17x10 <sup>5</sup>	4,60x10 <sup>5</sup>	3,42x10 <sup>5</sup>	1,94x10 <sup>5</sup>	2,16x10 <sup>5</sup>	4,31x10 <sup>5</sup>	3,2x10 <sup>5</sup>	3,11x10 <sup>5</sup>	2,79x10 <sup>5</sup>
[AG] <sub>eq</sub> (mM)	22	45	33	20	22	42	31	31	28
A1 (A V)	5,93x10 <sup>5</sup>	7,43x10 <sup>5</sup>	7,33x10 <sup>5</sup>	3,83x10 <sup>5</sup>	4,82x10 <sup>5</sup>	7,35x10 <sup>5</sup>	6,9x10 <sup>5</sup>	6,80x10 <sup>5</sup>	5,57x10 <sup>5</sup>
[AG] <sub>A1</sub> eq (mM)	30	37	37	19	24	36	34	34	28
AT (A V)	1,17x10 <sup>4</sup>	1,73x10 <sup>4</sup>	1,12x10 <sup>4</sup>	9,87x10 <sup>3</sup>	1,17x10 <sup>4</sup>	2,32x10 <sup>4</sup>	1,80x10 <sup>4</sup>	1,46x10 <sup>4</sup>	1,28x10 <sup>4</sup>
[AG] <sub>AT</sub> eq (mM)	19	28	18	16	19	38	30	24	21

**Tabela A2.2:** Capacidade antioxidante dos extratos e de misturas de extratos, expressa em equivalente de ácido gálico, determinada a partir da intensidade de pico anódica, [AG]; da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V, [AG]<sub>A1</sub>, e da área do voltamograma integrada de 0 V a 0,800 V ([AG,AT]eq) e equivalente de ácido gálico para o extrato, determinado nas mesmas condições em ensaio com concentração 0,001 g/ml.

	Concentração 0,002 g/ml								
Extratos/ Misturas	C10	P10	C10x P10	SB10	C10x SB10	PV09	C10x PV09	P12	C10xP12
Ipa (A)	1,11x10 <sup>5</sup>	3,28x10 <sup>5</sup>	1,65x10 <sup>5</sup>	1,44x10 <sup>5</sup>	1,42x10 <sup>5</sup>	3,33x10 <sup>5</sup>	1,94x10 <sup>5</sup>	1,88x10 <sup>5</sup>	1,81x10 <sup>5</sup>
[AG] <sub>eq</sub> (mM)	23	64	33	29	29	65	38	37	36
A1 (A V)	2,74x10 <sup>5</sup>	4,27x10 <sup>5</sup>	2,80x10 <sup>5</sup>	2,49x10 <sup>5</sup>	2,85x10 <sup>5</sup>	5,18x10 <sup>5</sup>	3,97x10 <sup>5</sup>	3,64x10 <sup>5</sup>	3,42x10 <sup>5</sup>
[AG] <sub>A1</sub> eq (mM)	27	42	27	24	28	51	39	36	33
AT (A V)	6,06x10 <sup>5</sup>	9,90x10 <sup>5</sup>	6,85x10 <sup>5</sup>	6,20x10 <sup>5</sup>	6,52x10 <sup>5</sup>	8,98x10 <sup>5</sup>	9,89x10 <sup>5</sup>	8,96x10 <sup>5</sup>	7,29x10 <sup>5</sup>
[AG] <sub>AT</sub> eq (mM)	19	32	22	19	20	29	32	29	23

**Tabela A2.3:** Capacidade antioxidante das amostras C10 e SB10 em equivalente de ácido gálico, determinada através da intensidade de pico anódica ( $[AG, I_{pa}]_{eq}$ ), da área sob o voltamograma integrada de 0 V a 0,425 V ( $[AG, A1]_{eq}$ ) e equivalente de ácido gálico para o extrato, determinado nas mesmas condições em ensaio com concentração 0,005 g/ml.

Extratos / Misturas	Concentração 0,005 g/ml	
	C10	SB10
$I_{pa}$ (A)	$2,98 \times 10^{-5}$	$4,05 \times 10^{-5}$
$[AG]_{eq}$ (mM)	12	16
A1 (A V)	$9,13 \times 10^{-5}$	$8,41 \times 10^{-5}$
$[AG]_{A1}$ eq (mM)	18	17

### Anexo 3 – Atividade fitotóxica

**Tabela A3.1:** Nível de significância das comparações múltiplas entre valores médios de comprimento de raiz realizadas por 1-way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey. Ns - diferenças não significativas; \* - significativas (0,01<p≤0,5), \*\* - muito significativas (0,001<p≤0,01), \*\*\* - altamente significativas (p≤ 0,001)).

	C	C.10	P.10	P.12	PV.09	SB.10	C.10x PV.09	P.10X P.12	P.10x PV.09	P.10xS B.10	P.12x PV.09
C											
C.10	***										
P.10	***	***									
P.12	***	ns	ns								
PV.09	***	ns	***	ns							
SB.10	***	ns	***	ns	ns						
C.10x PV.09	***	ns	***	ns	ns	ns					
P.10x P.12	***	*	ns	ns	*	**	**				
P.10x PV.09	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
P.10x SB.10	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	**	ns		
P.12x PV.09	***	**	ns	ns	*	***	***	ns	ns	**	

**Tabela A3.2:** Nível de significância das comparações múltiplas entre valores médios de comprimento de hipocótilo realizadas por 1-way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey. Ns - diferenças não significativas; \* - significativas (0,01<p≤0,5), \*\* - muito significativas (0,001<p≤0,01), \*\*\* - altamente significativas (p≤ 0,001)).

	C	C.10	P.10	P.12	PV.09	SB.10	C.10x PV.09	P.10X P.12	P.10x PV.09	P.10xS B.10	P.12xP V.09
C											
C.10	ns										
P.10	ns	ns									
P.12	ns	ns	ns								
PV.09	ns	ns	ns	ns							
SB.10	**	ns	*	**	**						
C.10xP V.09	*	ns	ns	*	*	ns					
P.10xP .12	ns	ns	ns	ns	ns	**	*				
P.10xP V.09	ns	*	ns	ns	ns	**	**	ns			
P.10xS B.10	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	*		
P.12xP V.09	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	

