



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Avaliação de Bioactividades de uma Amostra de Própolis de Origem Portuguesa Valorização de um produto natural

Licenciatura em Biologia Aplicada

Ana Sofia Pereira de Freitas

Orientadores

Rui Pedro Soares Oliveira

Cristina Alexandra Almeida Aguiar

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Setembro de 2013



Avaliação de Bioactividades de uma Amostra de Própolis de Origem Portuguesa

Valorização de um produto natural

Ana Sofia Pereira de Freitas

Orientadores

Rui Pedro Soares Oliveira

Cristina Alexandra Almeida Aguiar

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciada em Biologia Aplicada realizado sob a orientação científica do Prof. Doutor Rui Pedro Soares Oliveira e da Prof.^a Doutora Cristina Alexandra Almeida Aguiar, da Escola de Ciências da Universidade do Minho e da Prof.^a Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Setembro de 2013

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio incondicional e paciência que foi essencial para que eu pudesse terminar com sucesso esta minha jornada acadêmica e sem eles eu não teria tido forças para continuar em frente.

À Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, por ter proporcionado a oportunidade de realizar este estágio.

Ao Professor Doutor Rui Pedro Soares Oliveira, que com os seus conhecimentos e dedicação demonstrados me orientou, tornando o estágio um dos momentos mais importantes e estimulantes da minha formação acadêmica. Quero agradecer também pela disponibilidade incansável e boa disposição e carinho com que me recebeu e me apoiou neste trabalho.

À Professora Doutora Cristina Alexandra Almeida Aguiar, pelo carinho e atenção com que me recebeu no Departamento de Biologia, por me ter orientado e se ter demonstrado disponível para o esclarecimento de dúvidas.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia que me ajudaram sempre no que fosse necessário e a todos os colegas de laboratório de Ecologia Molecular pelo espírito de ajuda e companheirismo que me ajudou a vencer muitos obstáculos, em especial à Rita Marques, que se tornou uma pessoa muito especial nesta jornada que chega agora ao fim, mas que foi o início de muitas amizades que vão deixar saudades.

Ao Rui Silva, por me conhecer tão bem, pela paciência e carinho, pelo apoio e incentivo constantes, por me fazeres sentir especial.

Resumo

O própolis é uma mistura complexa formada por material resinoso e balsâmico, colhido pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores; à qual as abelhas adicionam secreções salivares já na colmeia. As abelhas utilizam o própolis na defesa contra os invasores e na imobilização das suas carcaças, protegendo a colmeia das pragas resultantes da putrefacção. A composição química do própolis varia geograficamente: com a flora disponível, com o tempo de colheita e a espécie das abelhas. Diferentes grupos de compostos podem ser encontrados nos extractos de própolis, como os polifenóis, terpenóides, esteróides e aminoácidos. Estes compostos têm sido associados com diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antioxidante e quelante de radicais livres; anti-genotóxico e genotóxico; e anti-mutagénico.

Tradicionalmente o própolis costuma ser encarado como um sub-produto sem valor na nossa apicultura, sendo frequentemente desprezado pelos apicultores nacionais. Os estudos científicos sobre o própolis português são reduzidos. O objectivo deste trabalho enquadra-se num projecto de análise e estudo do própolis português, particularmente no que diz respeito à sua caracterização química e à avaliação de actividades biológicas de modo a valorizar este produto, visando a possibilidade da sua utilização/exploração em aplicações médicas, cosméticas e nutracêuticas. O própolis seleccionado para este trabalho foi colhido num apiário no Gerês, em 2012, e foi utilizado na preparação de um extracto etanólico para ser testado em diferentes ensaios, utilizando o eucariota simples *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico.

O ensaio cometa foi realizado para analisar o efeito genotóxico e os resultados demonstraram que esta amostra não apresenta um efeito genotóxico significativo. Células incubadas com extracto etanólico de própolis (EEP) e H_2O_2 1 mM exibiram maior viabilidade do que células incubadas com H_2O_2 1 Mm, sugerindo que o extracto protege as células de levedura contra stresse oxidativo. A mesma actividade antioxidante foi também evidenciada por citometria de fluxo em que a oxidação do fluorocromo intracelular diclorofluoresceína diacetato foi menor em células incubadas com H_2O_2 (1 mM) na presença do extracto de própolis em comparação com células incubadas apenas com H_2O_2 . A análise de células tratadas com o extracto na presença do fluorocromo rodamina 123 mostrou que o EEP tem influência sobre o potencial da membrana mitocondrial, diminuindo a fluorescência emitida.

A amostra de própolis foi também avaliada quimicamente para caracterizar o seu perfil em compostos fenólicos e permitir a sua comparação com amostras de outras origens.

Palavras chave

Própolis; Ensaio cometa; Antioxidante; Citotoxicidade; Função mitocondrial

Abstract

Propolis is a complex mixture composed of resinous and balsamic material, collected by bees from the branches, flowers, pollen, buds and exudates of trees, which are mixed in the hive with bees' salivary secretions. Bees use propolis in the defence against invaders, protecting the hive from infections resulting from putrefaction. The chemical composition of propolis varies geographically, with the available flora, harvesting time and the species of the bee. Different groups of compounds can be found in propolis extracts, such as polyphenols, terpenoids, steroids and amino acids. These compounds have been associated with different biological activities: antimicrobial; antioxidant and free radical scavenger; antineoplastic and genotoxic; and antimutagenic.

Traditionally propolis is often seen as a useless by-product in apiculture, being frequently discarded by the national beekeepers. Scientific studies about Portuguese propolis are very few. The aim of this work relates to the investigation on Portuguese propolis, particularly with regard to its chemical characterization and the evaluation of biological activities of this product in order to assess the possibility of their use/exploitation in medical applications, cosmetic and nutraceuticals. The propolis selected for this study was collected in an apiary Gerês, in 2012, and was used to prepare an ethanol extract (EEP) to be tested in different assays, using the simple eukariote *Saccharomyces cerevisiae* as biological model.

The comet assay was performed to analyze the genotoxicity and the results suggest that the extract of propolis does not display significant genotoxic effect. In addition, cells co-incubated with EEP and 1 mM H₂O₂ displayed higher viability than cells simply incubated with 1 mM H₂O₂, suggesting that the propolis extract protects yeast cells against oxidative stress. The same antioxidant activity was also demonstrated by flow cytometry by lower fluorescence of the intracellular fluorochrome dichlorofluorescein diacetate in cells incubated with EEP and 1 mM H₂O₂ as compared with cells incubated with 1 mM H₂O₂. The analysis of cells treated with the extract in the presence of the fluorochrome rhodamine 123, showed that EEP has an influence on the mitochondrial membrane potential, decreasing the emitted fluorescence.

The sample of propolis was chemically analyzed to characterize its profile in phenolic compounds and to enable a comparison with samples from other sources.

Keywords

Propolis; Comet assay; Antioxidant; Cytotoxicity; Mitochondrial functionality

Índice geral

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Própolis: história e conceito..... | 1 |
| 1.2. Composição química | 1 |
| 1.3. Actividades biológicas | 2 |
| 1.4. Espécies reactivas de oxigénio e antioxidantes..... | 3 |
| 1.4.1. Danos no DNA..... | 6 |
| 1.4.1.1. Metodologias para avaliação dos danos de DNA | 7 |
| 1.5. Utilização da Rodamina 123 para avaliação do potencial da membrana mitocondrial em células de levedura..... | 7 |
| 1.6. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| 1.7. Problema biológico e objectivos deste trabalho | 9 |
| 2. Materiais e métodos | 9 |
| 2.1. Origem do própolis e obtenção do extracto etanólico de própolis (EEP) | 9 |
| 2.2. Estirpe de levedura, meio de cultura e condições de crescimento | 10 |
| 2.3. Ensaio cometa..... | 10 |
| 2.4. Ensaio de viabilidade | 11 |
| 2.5. Citometria de fluxo | 12 |
| 2.5.1. Citometria de fluxo com diacetato de diclorofluoresceína | 12 |
| 2.5.2. Citometria de fluxo com rodamina 123..... | 13 |
| 2.6. Análise química do própolis..... | 14 |
| 2.7. Análise estatística..... | 14 |
| 3. Resultados | 15 |
| 3.1. Avaliação da actividade genotóxica do EEP | 15 |
| 3.2. Avaliação do efeito citotóxico do EEP | 16 |
| 3.3. EEP diminui a oxidação intracelular | 18 |
| 3.4. EEP afecta o potencial da membrana mitocondrial em células de levedura | 20 |
| 3.5. Análise química do extracto etanólico de própolis | 22 |
| 4. Discussão dos resultados e perspectivas futuras..... | 24 |
| 5. Bibliografia | 25 |

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

8-oxoG – 7,8-dihidro-8-oxoguanina

$\Delta\psi_m$ – gradiente eléctrico

ANOVA – análise da variância

AP – apurínicos/apirimidínicos

CAT – catálise

DSB – quebras de cadeia dupla, do inglês *double strand breaks*

DO – densidade óptica

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

EEP – extracto etanólico de própolis

GSH – glutationa

GSH-Px – glutationa peroxidase

GSH-R – glutationa redutase

H₂DCF – diclorofluoresceína

H₂DCFDA – diacetato de diclorofluoresceína

HIV – vírus de imunodeficiência humana, do inglês *human immunodeficiency virus*

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

N⁷-meG – N⁷-metilguanina

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

Rh 123 – Rodamina 123

ROS – espécies reactivas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

Rpm – rotações por minuto

SD – desvio padrão

SOD – superóxido dismutase

SSB – quebras de cadeia simples, do inglês *single strand breaks*

UV – ultravioleta