

# Parâmetros químicos e bioatividade de amostras de pão de abelha e apitoxina

Filipa Alexandra Dos Santos Sobral

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança  
e à Universidade de Salamanca para obtenção do  
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Isabel Cristina F.R. Ferreira

Miguel José Rodrigues Vilas Boas

Bragança

2015

## Agradecimentos

Um sincero agradecimento a algumas pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente na realização de mais uma etapa.

Aos meus orientadores, **Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira** e **Professor Doutor Miguel Vilas-Boas** por terem orientado o meu trabalho, bem como pela dedicação, paciência, apoio, motivação e pelas longas horas dedicadas à revisão do trabalho. Agradeço ainda o conhecimento que me transmitiram a nível científico e pela confiança que depositaram em mim.

À **Doutora Lillian Barros** pela simpatia com que me recebeu, pela ajuda e o apoio em alguns ensaios da atividade antioxidante e na composição fenólica, bem como pelo conhecimento fornecido.

Ao **Doutor Ricardo Calhella** pela simpatia com que me recebeu, pela ajuda e apoio nos ensaios da atividade antitumoral, bem como pelo conhecimento fornecido.

À **Doutora Soraia Falcão** pela simpatia com que me recebeu, pela ajuda e apoio na caracterização química do veneno de abelha.

À **Mestre Ângela Fernandes** pela simpatia com que me recebeu, paciência, ajuda e apoio nos ensaios da atividade antioxidante.

À **Mestre Andreia Tomás** por ter partilhado comigo as amostras de pão de abelha, pela ajuda e simpatia que demonstrou para comigo.

A toda a equipa do **BioChemCore** pela boa disposição, simpatia e ajuda.

À minha tia Fá (**Fátima Pedro**) pois sem ajuda dela, a motivação que me deu para enfrentar mais uma etapa da minha vida, o carrinho e sobretudo pelo acolhimento pois já são muitos anos a aturarmo-nos mutuamente, nada disto seria possível, um GRANDE OBRIGADA.

Aos meus pais (**Júlio Sobral e Lurdes Sobral**) pelo apoio, ajuda e motivação que me deram, porque mesmo estando longe de mim, estiveram sempre bem perto, pois sem o vosso apoio incondicional, esta etapa não seria a mesma coisa.

Ao meu avô materno (**António Rei**) agradeço-lhe por tudo o que fez por mim, pois é como um segundo pai na minha vida. Querendo ainda pedir desculpas pelos longos meses que passava em Bragança, pois não ía muito de fim-de-semana e tu sempre a perguntares por mim. Demonstro-te aqui todo o meu carinho e obrigado por estares sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida.

À minha estrelinha mais brilhante (**Avó materna**) agradeço-te pela força que me tens enviado desde o outro lado. Sinto muito a tua falta pois infelizmente não podeste estar presente nas etapas académicas, pois retiraram-te cedo demais de ao pé de nós. Muito obrigada do fundo do coração, minha segunda mãe.

Ao meu avô paterno (**Amâncio Sobral**), minha segunda estrelinha, queria agradecer-te pela pessoa que me demonstraste ser mesmo não tendo estado muito tempo na tua vida, mas sei que sempre estive e estarei no teu coração, bem como tu no meu.

Ao meu namorado (**Fernando Ferreira**) pelo apoio incondicional e a motivação que me proporcionou; mesmo estando afastados este ano sempre estiveste presente nos momentos mais difíceis.

À minha amiga **Azucena Marques** que mesmo estando longe sempre me deu apoio e me ajudou.

À Maria Caxias (**Tânia Sacramento**) pela motivação e ajuda, bem como por me apoiares nos momentos mais difíceis e por estares comigo nos momentos mais descontraídos.

Ao Obi (**Bruno Gonçalves**) pelo apoio mutuo no momento da escrita da tese.

À **Rausstuna - Tuna Mista de Bragança** pelos bons momentos passados ao vosso lado durante este longo percurso.

Às minhas **meninas de Celorico** que muitas vezes recusei saídas, mas mesmo assim sempre me apoiaram.

Aos meus **meninos e meninas de Bragança (Gi, Mel, Tó e Cy)** pelos momentos de descontração e pelas longas conversas.

À minha amiga (**Joana Gonçalves**) pela ajuda e apoio, quer em Salamanca como em Bragança, és uma pessoa que vou guardar para o resto da vida.

À minha colega de mestrado (**Maria Miguel**) pela ajuda, apoio e motivação ao longo destes dois anos.

E a todas as pessoas que não mencionei pessoalmente, mas que me ajudaram ao longo de mais esta etapa.

**O meu muito obrigada...**

**Índice**

Agradecimentos .....	I
Índice .....	IV
Índice de figuras .....	VI
Índice de tabelas .....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumo .....	XII
Palavras-chave .....	XIII
Resumen .....	XIV
Palabras clave .....	XV
Abstract.....	XVI
Keywords.....	XVII
1. Introdução.....	1
1.1. Produtos apícolas.....	1
1.2. O caso particular do pão de abelha.....	5
1.3. O caso particular do veneno de abelha .....	8
1.4. Considerações teóricas sobre os ensaios de atividade antioxidante em foco no presente trabalho.....	10
1.4.1. <i>Stress</i> oxidativo .....	10
1.4.2. Os radicais livres e as espécies reativas.....	11
1.4.3. Ensaio de atividade antioxidante em foco no presente estudo.....	13
1.5. Considerações teóricas sobre os ensaios de atividade anti-inflamatória em foco no presente estudo .....	19
1.6. Considerações teóricas sobre os ensaios de citotoxicidade em foco no presente trabalho .....	20
1.6.1. Tipos de células .....	20
1.6.2. Linhas celulares tumorais em estudo.....	23
2. Objetivos.....	27
3. Material e Métodos .....	28
3.1. Padrões e reagentes.....	28
3.2. Amostras.....	29
3.2.1. Pão de abelha .....	29
3.2.2. Veneno de abelha.....	29

---

3.3.	Preparação das amostras .....	30
3.3.1.	Amostras de pão de abelha .....	30
3.3.2.	Amostras de veneno de abelha .....	30
3.4.	Caracterização química das amostras .....	30
3.4.1.	Caracterização das amostras de pão de abelha por HPLC-DAD-ESI/MS	30
3.4.2.	Caracterização das amostras de veneno de abelha por LC-DAD-ESI/MS <sup>n</sup> .....	31
3.5.	Avaliação das propriedades bioativas.....	33
3.5.1.	Avaliação da atividade antioxidante das amostras de veneno de abelha..	33
3.5.2.	Avaliação da atividade anti-inflamatória das amostras de veneno de abelha .....	35
3.5.3.	Avaliação da citotoxicidade das amostras de veneno e pão de abelha .....	36
3.6.	Análise estatística .....	37
4.	Resultados e Discussão.....	38
4.1.	Composição fenólica e citotoxicidade das amostras de pão de abelha.....	38
4.1.1.	Composição fenólica das amostras de pão de abelha .....	38
4.1.2.	Citotoxicidade das amostras de pão de abelha .....	46
4.2.	Composição peptídica e bioatividade das amostras de veneno de abelha .....	48
4.2.1.	Caraterização química das amostras de veneno de abelha .....	48
4.2.2.	Atividade antioxidante e anti-inflamatória das amostras de veneno de abelha.....	50
4.2.3.	Citotoxicidade das amostras de veneno de abelha.....	52
5.	Conclusão .....	54
6.	Referências .....	58

**Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Extração dos grãos de pão de abelha.....	7
<b>Figura 2.</b> Principais causas e consequências da ação dos radicais livres.....	11
<b>Figura 3.</b> Esquema da peroxidação lipídica e reação em cadeia detalhada.....	12
<b>Figura 4.</b> Descrição geral das reações que conduzem à formação de ROS.....	13
<b>Figura 5.</b> Estrutura do DPPH.....	14
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo da redução do DPPH.....	15
<b>Figura 7.</b> Reações envolvidas no ensaio do poder redutor.....	16
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do $\beta$ -caroteno.....	17
<b>Figura 9.</b> Reações envolvidas no ensaio da descoloração do $\beta$ -caroteno.....	18
<b>Figura 10.</b> Reação do MDA e TBA na formação de TBARS.....	18
<b>Figura 11.</b> Células aderentes de fígado (HepG2).....	23
<b>Figura 12.</b> Células de fibroblastos não aderentes.....	23
<b>Figura 13.</b> Imagens microscópicas das diversas formas em que se podem transformar as células HeLa.....	24
<b>Figura 14.</b> Imagens microscópicas das diversas formas em que se podem transformar as células MCF-7.....	25
<b>Figura 15.</b> Imagens microscópicas das diversas formas em que se podem transformar as células HepG2.....	25
<b>Figura 16.</b> Imagem microscópica das células NCI-H460.....	26
<b>Figura 17.</b> Perfil individual da composição fenólica na amostra PA1.....	42
<b>Figura 18.</b> Representação do perfil cromatográfico do veneno de abelha.....	49
<b>Figura 19.</b> Produção de óxido nítrico em função da concentração de veneno.....	51

**Índice de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Tempo de retenção, comprimento de onda máxima com absorção na zona do visível, dados do espectro de massas, identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de pão de abelha.....	43
<b>Tabela 2.</b> Atividade citotóxica das amostras de pão de abelha.....	47
<b>Tabela 3.</b> Caraterização química das amostras de veneno de abelha através da análise de péptidos por LC-DAD-ESI/MS <sup>n</sup> .....	49
<b>Tabela 4.</b> Atividade antioxidante e anti-inflamatória, <i>in vitro</i> , de amostras de veneno de abelha.....	51
<b>Tabela 5.</b> Atividade citotóxica, <i>in vitro</i> , das amostras de veneno de abelha.....	53

---

**Abreviaturas**

A	Absorvância
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APA	Apamina
BB	<i>Bee bread</i>
BV	<i>Bee venom</i>
CE	Energia de colisão
COX	Ciclo-oxigenase
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
EC <sub>50</sub>	Concentração da amostra responsável por 50% do efeito biológico
ECACC	<i>European collection of animal cell culture</i>
EP	Potencial de entrada
EPI	Análise de produto do ião
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ESI	Ionização por electrospray
FBS	Soro fetal bovino
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massas

---

GI <sub>25</sub>	Concentração da amostra que inibe 25% do crescimento celular
GI <sub>50</sub>	Concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HeLa	Linha celular de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular de carcinoma de fígado
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa, utilizando a interface de ionização por eletropulverização
IL	Interleucinas
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível
L <sup>•</sup>	Radical lipídico
LC	Cromatografia líquida
LC-DAD-ESI/MS <sup>n</sup>	Cromatografia líquida com detecção por matriz de díodos e espectrometria de massa de ionização por eletropulverização
LH	Lípido insaturado
LOO <sup>•</sup>	Radical peroxilo
LPS	Lipopolissacárido
MCF-7	Linha celular de carcinoma da mama
MDA	Malondialdeído
MEL	Melitina
MS	Espectrometria de massa
NED	Di-hidrocloreto de N-(1-naftil)etilenediamina
NCI-H460	Linha celular de carcinoma do pulmão

---

nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NOS	Sintase de óxido nítrico
PA	Pão de abelha
PAC	Amostra de pão de abelha comercial ( <i>Bee Healthy Farms</i> , EUA)
PCD	Processo de morte celular programada
PD	Potencial de deutério
PGE2	Prostaglandina E2
PI	Padrão interno
PLA2	Fosfolipase A2
PLP2	Células não tumorais de fígado de porco
RAW 264,7	Linha celular de macrófagos de rato
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPM	Rotações por minuto
RSA	Atividade captadora de radicais livres
RSS	Espécies reativas de enxofre
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforrodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
v	Volume

VA	Veneno de abelha
VAA	Acupuntura com veneno de abelha
v/v	Razão volume/volume
w/v	Razão peso/volume

## Resumo

Este trabalho incluiu o estudo da bioatividade e a caracterização química de dois produtos apícolas, sendo eles o pão de abelha (PA) e o veneno de abelha (VA).

O PA é uma mistura fermentada de pólen das plantas, mel e saliva das abelhas. As abelhas obreiras usam o PA como alimento para as larvas e para que as abelhas jovens produzam geleia real. No presente trabalho, foram estudadas cinco amostras de PA recolhidas em colmeias de *Apis mellifera iberiensis* de diferentes apiários de Bragança, e uma amostra de PA comercial. Todas as amostras foram caracterizadas por HPLC-DAD-ESI/MS em termos de compostos fenólicos e testando-se a sua citotoxicidade em diferentes linhas celulares tumorais humanas, bem como em células de fígado de porco não tumorais. Os principais compostos fenólicos encontrados foram derivados de flavonoides, principalmente quercetina, canferol, miricetina, isoramnetina e derivados glucósidos de herbacetina. No total, foram identificados trinta e dois compostos nas seis amostras de PA, apresentando as amostras PA1 e PA3 o teor mais elevado e uma maior diversidade de compostos identificados. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação ente os flavonoides presentes nas amostras estudadas e a sua baixa a moderada citotoxicidade. Pelo que consultamos da literatura, este é o primeiro trabalho de caracterização exaustiva dos flavonoides glucosídicos em amostras de PA, contribuindo assim para a caracterização química deste produto apícola ainda pouco explorado.

O VA ou apitoxina é uma mistura complexa de substâncias com atividades biológicas já descritas na literatura. No presente trabalho, analisaram-se quimicamente cinco amostras de VA recolhidas em colónias de *Apis mellifera iberiensis* em dois apiários do concelho de Bragança, avaliando-se também as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas. A análise das amostras por LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> demonstrou a presença maioritária de melitina, seguindo a fosfolipase A2 e a apamina. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória, mas sem uma relação direta com os compostos químicos analisados individualmente. Os resultados obtidos evidenciam a existência de concentrações específicas nas quais estes compostos são mais ativos (e.g., presentes na amostra VA5). As amostras de VA demonstraram citotoxicidade semelhante para todas as linhas tumorais testadas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), sendo a MCF-7 e a HeLa as mais suscetíveis. No entanto,

estas amostras não parecem ser adequadas para o tratamento do carcinoma da mama, hepatocelular e cervical, porque nas concentrações ativas, as amostras também foram tóxicas para as células não tumorais (PLP2). Relativamente ao carcinoma de pulmão, o VA poderá ser utilizado abaixo da concentração tóxica para as células não tumorais. Em geral, o presente estudo evidencia o enorme potencial bioativo do VA, sendo o primeiro trabalho realizado com amostras Portuguesas.

**Palavras-chave**

Pão de abelha; Veneno de abelha; *Apis mellifera iberiensis*; Compostos fenólicos; Atividade antioxidante; Potencial anti-inflamatório; Citotoxicidade

## Resumen

Este trabajo incluye el estudio de la bioactividad y caracterización química de dos productos de la colmena, siendo ellos el pan de abeja (PA) y el veneno de abeja (VA).

El PA es una mezcla fermentada de polen de las plantas, de miel y de saliva de las abejas. Las abejas obreras usan el PA como alimento para las larvas y para que las jóvenes abejas produzcan la jalea real. En este trabajo, se estudiaron cinco muestras de PA recogido de *Apis mellifera iberiensis* de diferentes apiarios de Bragança y una muestra de PA comercial. Todas las muestras fueron caracterizadas por HPLC-DAD-ESI / EM en términos de compuestos fenólicos y de su citotoxicidad fue ensayada en diferentes líneas celulares de tumores humanos, bien como en células de hígado de cerdo no tumorales. Los principales compuestos fenólicos encontrados son derivados de flavonoides, principalmente quercetina, canferol, miricetina, isoramnetina y los derivados de glucósidos de herbacetina. En total, fueron identificados treinta y dos compuestos en las seis muestras de PA, presentando las muestras PA1 y PA3 el contenido más alto y una mayor diversidad de compuestos identificados. Sin embargo, no fue posible establecer una correlación entre los flavonoides presentes en las muestras estudiadas y su citotoxicidad de baja a moderada. Por lo que se percibe de la literatura, este es el primer informe de caracterización exhaustiva de flavonoides glucosídicos en muestras de PA, contribuyendo así al conocimiento químico de este producto de las abejas menos estudiado.

El VA o veneno de abeja es una mezcla compleja de sustancias con actividad biológica ya descrita en la literatura. En este trabajo, se analizaron cinco muestras de VA obtenidas de *Apis mellifera iberiensis* de Bragança (dos apiarios diferentes), que fueron caracterizadas químicamente y evaluadas en relación a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y citotoxicidad. Las muestras analizadas por LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> han demostrado que la melitina es el compuesto más abundante, seguido por la fosfolipasa A2 y apamina. Todas las muestras demostraron actividad antioxidante y antiinflamatoria, pero sin una relación directa con los productos químicos analizados individualmente. Los resultados obtenidos evidencian que existen concentraciones específicas, en las cuales estos compuestos son más activos (e.g., presentes en VA5). Las muestras de VA demostraron citotoxicidad similar para todas las líneas tumorales ensayadas (MCF-7,

NCI-H460, HeLa y HepG2), siendo la MCF-7 y la HeLa las más susceptibles. Sin embargo, las muestras estudiadas no parecen ser adecuadas para el tratamiento de carcinoma de mama, hepatocelular y cervical, porque las concentraciones activas de las muestras también fueron tóxicas para las células no tumorales (PLP2). En cuanto al carcinoma del pulmón, el VA se debe utilizar por debajo de la concentración tóxica para las células no tumorales. En general, el presente estudio evidencia el enorme potencial de bioactividad del VA, siendo este el primer trabajo realizado con muestras portuguesas.

**Palabras clave**

Pan de abeja; Veneno de abeja; *Apis mellifera iberiensis*; Compuestos fenólicos; Atividade antioxidante; Potencial anti-inflamatório; Citotoxicidad

## Abstract

This work includes the bioactivity evaluation and chemical characterization of two bee products, namely bee bread (BB) and bee venom (BV).

Bee bread (BB) is a fermented mixture of plant pollen, honey, and bee saliva that worker bees use as food for the larvae, and for young bees to produce royal jelly. In the present study, five BB samples, collected from *Apis mellifera iberiensis* hives located in different apiaries near Bragança, in the Northeast region of Portugal, and one BB commercial sample, were characterized by HPLC-DAD-ESI/MS in terms of phenolic compounds. Furthermore, the samples were screened against different human tumor cell lines, and also against non-tumor liver cells. The main phenolic compounds found were flavonols derivatives, mainly quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin and herbacetin glycoside derivatives. Thirty-two compounds were identified in the six BB samples, presenting BB1 and BB3 the highest content and the highest number of identified compounds. However, it was not possible to establish a correlation between the flavonoids and the observed low to moderate cytotoxicity. To the author's knowledge, this is the first report characterizing glycosidic flavonoids in BB samples, contributing to the chemical knowledge of this less explored bee product.

Bee venom (BV) or apitoxin is a complex mixture of substances with reported biological activity. In the present work, five bee venom samples obtained from *Apis mellifera iberiensis* from the Northeast Portugal (two different apiaries) were chemically characterized and evaluated for their antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. The LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> analysis of the samples showed that melittin was the most abundant compound, followed by phospholipase A2 and apamin. All the samples revealed antioxidant and anti-inflammatory activity but without a direct relation with any of the individual chemical components identified. The results highlight that there are specific concentrations (present in BV5) in which these compounds are more active. The BV samples showed similar cytotoxicity for all the tested tumor cell lines (MCF-7, NCI-H460, HeLa and HepG2), being MCF-7 and HeLa the most susceptible ones. Nevertheless, the studied samples seem to be not suitable to treat breast, hepatocellular and cervical carcinoma (MCF-7) because at the active concentrations, the samples were also toxic for non-tumor cells (PLP2). Regarding the non-small lung cell carcinoma, BV

should be used under the concentration toxic for non-tumor cells. Overall, the present study corroborates the enormous bioactive potential of BV being the first report on samples from Portugal.

**Keywords**

Bee bread; Bee venom; *Apis mellifera iberiensis*; Phenolic compounds; Antioxidant activity; Anti-inflammatory potential; Cytotoxicity

## 1. Introdução

### 1.1. Produtos apícolas

Os produtos apícolas, tais como o mel, a própolis, o pólen, a geleia real, o pão de abelha (PA) e o veneno de abelha (VA), são utilizados desde os tempos ancestrais com múltiplas finalidades, entre outras, na cura de feridas, tosse, artrites e esclerose múltipla, sendo a sua aplicação reconhecida como apiterapia. Mais recentemente, a sua aplicação tem procurado estender-se ao tratamento do cancro, sendo que para muitas das utilizações a investigação ainda se encontra na sua fase inicial, considerando que a maior parte dos estudos são ainda realizados somente *in vitro* e apenas uma minoria alcançou os ensaios em animais (Jagua-Gualdrón, 2012). Em todos os casos, a identificação da composição destes produtos tem permitido encontrar possíveis mecanismos, através dos quais poderá haver utilidade no tratamento de doenças (Jagua-Gualdrón, 2012).

O mel é um fluído natural, doce e viscoso, produzido a partir da transformação enzimática que as abelhas provocam no néctar recolhido das flores, sendo também uma boa fonte de antioxidantes (Noor et al., 2014). A sua composição é maioritariamente constituída por hidratos de carbono (79%), água (20%) e outros componentes minoritários como oligoelementos, proteínas, vitaminas, enzimas, entre outros (Jagua-Gualdrón, 2012). O mel apresenta propriedades antioxidante e antimicrobiana devido à presença de uma variedade de compostos tais como o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol, a prolina, as vitaminas, a catalase e a glicose oxidase, conferindo-lhe eficácia contra a inflamação, cancro, doenças coronárias, queimaduras, envelhecimento, cicatrização de feridas, doenças gastrointestinais e doenças cardíacas. O potencial antitumoral do mel está descrito por ensaios *in vitro* em linhas celulares tumorais, tais como HepG2 (carcinoma do fígado), 5637 (carcinoma da bexiga), L929 (fibroblastos de ratinhos normais), MCF-7 (carcinoma da mama), entre outras (Pereira et al., 2015; Sadeghi-Aliabadi et al., 2015; Yaacob et al., 2014). Esta atividade biológica do mel é, no entanto, variável, dependendo particularmente das espécies botânicas e das condições geográficas de onde são originárias (Noor et al., 2014).

A própolis é o nome atribuído a uma substância resinosa preparada pelas abelhas (*Apis mellifera* L.) a partir dos exsudados de várias plantas e utilizada por estas para selar os buracos, suavizar as paredes internas e proteger a colmeia contra a entrada de intrusos.

A composição química da própolis é qualitativamente e quantitativamente variável, dependendo também da localização geográfica das colmeias e das espécies botânicas em redor do apiário. Geralmente é composta por resina e bálsamo vegetal (50%), cera de abelha (30%), óleos essenciais (5-10%), pólen (5%) e outras substâncias, incluindo alguns minerais (Noor et al., 2014). A sua utilização em medicina popular advém já dos tempos ancestrais e, recentemente, tornou-se um tema de especial interesse na área da investigação oncológica, sendo uma fonte de compostos valiosos para a prevenção e tratamento do cancro (Barbariá et al., 2011). A própolis possui diversas propriedades biológicas, como por exemplo, propriedade antibacteriana, antifúngica, antiviral, imunestimulante, antitumoral, antioxidantes (Popova et al., 2007), espasmolíticas, anti-inflamatórias, anti-ulcerosas e citostáticas (Haro et al., 2000). Nas regiões temperadas do mundo, os exsudados de choupo (principalmente de *Populus nigra* L.) são a principal fonte da recolha de resina pelas abelhas, sendo por isso a própolis mais conhecida do ponto de vista químico e farmacológico. Os constituintes associados com as atividades biológicas benéficas e especialmente as propriedades antimicrobiana e antioxidante, são os flavonoides (incluindo flavonas, flavonóis, flavanonas e dihidroflavonóis) mas também outros compostos fenólicos nomeadamente substitutos do ácido cinâmico e dos seus ésteres (Popova et al., 2007).

A geleia-real é uma secreção ligeiramente ácida (pH 3,5-4,5) da hipofaringe e glândulas mandibulares das abelhas obreiras jovens. A secreção tem um aspeto cremoso, esbranquiçado, com odor suave e sabor ligeiramente picante (Lercker et al., 1981), desempenhando um papel importante no desenvolvimento e determinação sexual da abelha rainha (Wu et al., 2015). A geleia-real é o alimento de todas as larvas durante os primeiros três dias de gestação, no entanto, após este tempo, as larvas de obreiras e de zângão são alimentadas com uma mistura de geleia real, mel e pólen. Para a abelha rainha a geleia-real é o seu único alimento, durante a fase larvar mas também durante a fase adulta, a qual poderá atingir os 4 a 5 anos (Isidorov et al., 2012; Lercker et al., 1981). Esta especificidade na alimentação é responsável pela indução da diferenciação das abelhas rainhas, conhecendo-se ainda muito pouco sobre o modo de atuação, especialmente das proteínas que constituem a geleia-real. A primeira proteína a ser identificada, sendo

também a mais abundante foi denominada por GR1 (Buttstedt et al., 2014). Para fins comerciais, a geleia-real é recolhida a partir dos alvéolos reais (alvéolos de abelha rainha), pois são aqueles onde se encontram depositadas maiores quantidades de geleia-real (até 500-600 mg). Uma colmeia conduzida para a produção de geleia-real poderá proporcionar cerca de 500g durante a época de primavera e verão.

A composição química da geleia fresca é constituída maioritariamente por água (50-65%), proteínas (11-18%), hidratos de carbono (10-15%), ácidos gordos e lípidos (4-8%), e sais minerais (cerca de 1,5%), podendo encontrar-se também uma pequena quantidade de compostos fenólicos e vitaminas (Isidorov et al., 2012). A geleia-real é um produto de rápida degradação pelo que é frequente a sua comercialização após um processo de liofilização ou como gelatina pura ou ainda sob a forma de mistura com outros ingredientes. A geleia-real é caracterizada pelas suas atividades anti-metastática, antioxidante, bem como hipoglicemiante e imunológica, nos efeitos da redução do colesterol, estrogénios e propriedade anti cansaço. Uma das razões associadas com estas propriedades é a presença de um conjunto de ácidos gordos hidroxilados de cadeia curta (Isidorov et al., 2012).

O pólen, o gametófito masculino das flores, é recolhido pelas abelhas que o misturam com o néctar das plantas (Margaoan et al., 2010) e com as suas secreções bucais ricas em enzimas (amílase, catalase, etc.) transformando-o, assim, no alimento ideal para as larvas que se encontram no estado inicial de desenvolvimento (Campos et al., 2008). Para recolherem o pólen das flores, as abelhas tocam com o corpo nos estames cobrindo-se assim com o pólen (Campos et al., 2008). Os grãos de pólen são depois agregados numa pequena bola através da adição das secreções bucais e transportados para a colmeia nas suas patas traseiras, armazenando-o no interior da colmeia separadamente dos alvéolos com mel (Margaoan et al., 2010).

Os grãos de pólen podem apresentar diferentes formas e cores, mas também diferem no seu conteúdo em substâncias nutritivas, vitaminas, aminoácidos e também na composição em ácidos fenólicos e flavonoides, variando de acordo com a sua origem floral. Os compostos fenólicos são essenciais para a fisiologia das plantas, devido à sua contribuição na morfologia, tanto na sua forma como na sua estrutura. Estes compostos estão envolvidos no crescimento e reprodução das plantas mas também conferem resistência contra agentes patogénicos por ação das fitoalexinas e proteção contra as

pragas aumentando a adstringência da planta como alimento, tornando-a indigesta para os predadores. Os polifenóis são o maior grupo dos numerosos grupos metabólicos das plantas e são parte íntegra da dieta dos humanos e animais. O interesse pelos compostos fenólicos tem aumentado devido à sua atividade antioxidante e eliminação dos radicais livres. Vários investigadores chegaram à conclusão, que os polifenóis possuem atividade antioxidante devido às suas propriedades redox, o que lhes permite atuarem como agentes dadores de hidrogénio, reduzindo-o a oxigénio singlete, podendo também funcionar como agentes quelantes de metais. Os estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre o aumento do consumo de fenóis antioxidantes e uma redução do risco de doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro (Margaoan et al., 2010).

O pólen apícola é recolhido da colmeia através da colocação de um equipamento específico, “capta-pólen”, na entrada da colmeia, obrigando a abelha a passar por um pequeno orifício que provoca a queda do pólen para uma gaveta onde o apicultor o recolhe. O pólen fresco recolhido pelas abelhas contém aproximadamente 20 a 30% de água. Este elevado teor de humidade, torna o pólen num meio com condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos (bactérias e leveduras). Para prevenir a deterioração e manter a sua máxima qualidade, o pólen deve ser recolhido diariamente, limpo de impurezas e desidratado. Alternativamente poderá ser congelado imediatamente após a recolha para processamento posterior (Margaoan et al., 2010).

A gestão de necessidades no interior de uma colmeia é suprida pelo armazenamento de mel e de pólen, representando o mel a principal fonte de energia e o pólen a fonte de proteínas necessárias para o desenvolvimento e reprodução das abelhas. A composição do pólen apresenta um elevado valor nutricional devido à presença de aminoácidos essenciais, vitaminas, flavonóides e carotenóides. Adicionalmente, contém ainda sais minerais, hidratos de carbono, água e fibras vegetais. Esta diversidade composicional permite considerar o pólen como um bom suplemento alimentar para o consumo humano, verificando-se um aumento da procura pelas empresas farmacêuticas, saúde e alimentar, e uma diversificação da gama de produtos que contêm na sua composição o pólen apícola, existindo padrões de qualidade definidos em vários países, como por exemplo no Brasil, Bulgária, Polónia e Suíça (Campos et al., 2008).

O pólen apícola tem sido usado na medicina popular durante séculos associando-se a uma ampla gama de benefícios em relação à saúde entre as quais atividades

antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antirradiação, anti-tumoral hepatoprotetora, quimioprotetora e/ou quimiopreventiva e anti-inflamatórias. Além disso, é descrito como promotor de efeitos benéficos na prevenção de problemas da próstata, arteriosclerose, gastroenterite, doenças respiratórias, alergias dessensibilizadas, melhora os sistemas cardiovascular e digestivo, a imunidade do corpo e atrasa o envelhecimento (Pascoal et al., 2014). Alguns investigadores têm associado os efeitos anti-tumorais do pólen e dos seus extratos com a capacidade bloqueadora de espécies reativas de oxigénio (ROS), enquanto outros afirmam que o pólen poderá inibir significativamente o crescimento tumoral e aumentar a imunidade, quando usado como medicamento anti-tumoral ou adjuvante no decorrer do tratamento clínico do tumor em pacientes (Margaoan et al., 2010). Em geral, o pólen melhora as condições gerais do equilíbrio nutritivo, da função do fígado, da permeabilidade capilar, da função digestiva e dos rins, a redução do colesterol no sangue e no tratamento da prostatite crónica (Margaoan et al., 2010).

## 1.2. O caso particular do pão de abelha

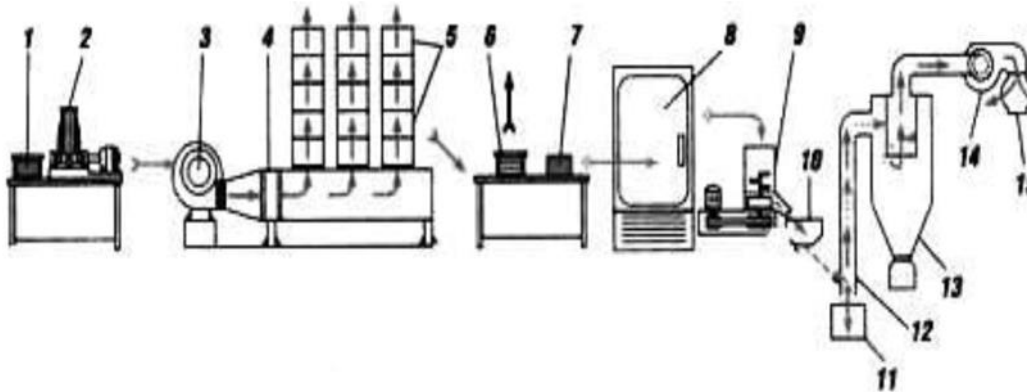
As necessidades nutricionais das abelhas, *Apis mellifera*, são alcançadas pela recolha de pólen, néctar e água. O néctar é a principal fonte de carbono, enquanto o pólen fornece proteínas, lípidos, vitaminas e minerais (Gilliam, 1979). Ao entrar para o interior da colmeia, o pólen recolhido pelas abelhas é misturado com uma pequena quantidade de mel e de saliva, sendo de seguida armazenado no interior dos alvéolos de cera onde sofre uma série de alterações químicas, transformando-se num produto denominado por pão de abelha (Araneda et al., 2014; Markiewicz-Zukowska et al., 2013), considerado por alguns autores como o alimento mais completo da natureza (Fatrcová-Šramková et al., 2013). Esta mistura sofre diferentes processos químicos provocados pela ação das enzimas provenientes das secreções glandulares das abelhas, de microrganismos, da humidade e da temperatura, transformando o pólen apícola em pão de abelha, PA, após duas semanas de armazenamento, e consolidando assim a sua conservação e preservação (Araneda et al., 2014; Nagai et al., 2004). Durante o processo de armazenamento a composição química do PA sofre diversas alterações, entre outros fatores, há uma alteração na acidez, diminuindo de um pH de 7,2 para valores entre 3,5 a 4,2, associado com a formação de ácido láctico. Este processo de fermentação conduz também a uma degradação da estrutura do grão de pólen, aumentando assim a biodisponibilidade dos nutrientes, e permitindo

que as abelhas obreiras o utilizem na alimentação das larvas e das abelhas jovens produtoras de geleia real. À semelhança do pólen apícola, a composição química do PA é maioritariamente determinada pela composição do pólen recolhido pelas abelhas, variando por isso de acordo com as características das plantas presentes numa determinada região em redor do apiário (Isidorov et al., 2009).

O processo de extração do PA baseia-se na recolha dos quadros de cera onde se encontra armazenado o pão de abelha, a secagem, refrigeração, segmentação e separação dos grãos de PA dos fragmentos de cera. Na seleção dos quadros é necessário que estes se encontrem isentos de mel para proporcionar um processo de segmentação suave e reduzir a aderência com o aparelho de segmentação. Os favos com presença de bolores são automaticamente rejeitados pelas contaminações que poderão introduzir no produto. Na literatura são referidos diversos processos tecnológicos para remoção do PA dos quadros de cera, como a sua imersão em água, com secagem e extração manual por vibração; a secagem e separação dos grãos por vácuo; ou a secagem, congelação, segmentação e filtração das partículas de cera. No entanto, todos estes métodos mencionados contém diversas desvantagens, como por exemplo, a perda de nutrientes associados com as imersões em água, a ineficácia do processo ou o elevado recurso a procedimentos manuais, limitando assim a sua aplicabilidade na produção industrial do pão de abelha (Akhmetova et al., 2012).

O processo atualmente mais utilizado a nível industrial e que permite uma mecanização completa da extração do PA inclui quatro grandes etapas: secagem, segmentação, filtragem e desinfecção. O material retirado da colmeia (quadros de alvéolos com pão de abelha) é submetido a uma secagem a 40°C durante 8-10 horas até atingir os 14-15% de humidade. Alternativamente, e para uma secagem mais rápida do PA, deve-se retirar a camada de mel que cobre o pão de abelha pois atrasa o processo de secagem. Esta secagem rápida pode ser realizada sob vácuo e dura cerca de 5-7 horas a 40°C, ocorrendo uma descida da humidade de 10%. Após a secagem, efetua-se um arrefecimento até -1°C e, em seguida, os alvéolos são triturados numa máquina com orifícios de 4,9 a 5mm, o que permite a sua fração completa. O material fragmentado é, em seguida, limpo por filtração através de um fluxo de ar de 7,5 a 8m/s e um filtro com diâmetro de 2,6mm. Todas as partículas de cera são removidas durante este processo de filtração. Após a separação do PA, este é desinfetado sendo submetido aos raios gama e a uma mistura de gás (incluindo o óxido de etileno e metileno) (Akhmetova et al., 2012).

Na **Figura 1** apresenta-se um equipamento descrito para a produção industrial de pão de abelha.



**Figura 1.** Extração dos grãos de pão de abelha.

(1) Camada externa dos granulados de pão de abelha, (2) máquina de raspagem, (3) ventilador, (4) aquecedor, (5) colmeias, (6) quadros, (7) cera e pão de abelha, (8) congelador, (9) máquina de segmentação, (10) máquina de dosagem, (11) recipiente, (12) poço de ventilação, (13) ciclone, (14) ventilador, (15) recipiente de pó seco (Adaptado de Akhmetova et al., 2012).

Os estudos disponíveis na literatura sobre o pão de abelha são ainda muito reduzidos, estando a sua composição dependente das características e origem do pólen. Maioritariamente o PA é constituído por água, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, elementos inorgânicos e vários outros componentes tais como ácido decanóico, gamaglobulina, ácidos nucleicos, vitaminas B e C, ácido pantoténico, biopterina, neopterina, acetilcolina, hormonas reprodutivas, etc. (Giroud et al., 2013). Alguns autores descrevem também a presença de compostos fenólicos, quer através da avaliação global do teor em fenóis totais por ensaios colorimétricos em PA de Espanha e da Polónia (Araneda et al, 2014; Markiewicz-Zukowska et al., 2013), quer através da identificação específica de alguns compostos como ácido láctico, ácido arabinóico, ácido hexadecanóico e ácido tetracosanóico para amostras de PA provenientes da Polónia. As principais propriedades funcionais atribuídas ao PA relacionam-se com a sua atividade antibacteriana (Abouda et ai, 2011; Baltrušaytè et al., 2007), antioxidante (Nagai et al., 2004) e antitumoral (Borawska et al., 2014; Markiewicz-Zukowska et al., 2013). Para a última atividade mencionada, foram testados extratos alcoólicos em linhas celulares (linha celular de glioblastoma humano U87MG e linha celular de astrócitos humanos SVGp12- CRL-08621) (Borawska et al, 2014; Markiewicz-Zukowska et al, 2013) e os resultados observados na linha celular U87MG foram examinados após 24, 48 e 72 horas

de incubação, observando-se uma diminuição de viabilidade em relação ao tempo, pois após 72h demonstrou  $62,4 \pm 4,6\%$ .

### 1.3. O caso particular do veneno de abelha

O veneno de abelha (VA) ou apitoxina é uma arma única no reino animal e tem um papel primordial de defesa para a colmeia. O VA é produzido na glândula de veneno das abelhas melíferas localizada na cavidade abdominal das abelhas obreiras, sendo uma mistura complexa composta, pelo menos, por 18 compostos com atividade biológica descrita (Jagua-Gualdrón 2012; Liu et al., 2002; Oršolić 2009; Oršolić 2012), tendo em conta que estas substâncias são destinadas à proteção das abelhas contra uma ampla diversidade de predadores e de outros artrópodes ou vertebrados. Os compostos ativos do veneno de abelha incluem proteínas e péptidos (melitina (MEL), apamina (APA), adolapina, o péptido desgranulador de mastócitos, secapina, procamina, inibidor da protease, tertiapina e outros pequenos péptidos), enzimas (fosfolipase A2 (PLA2), hialuronidase, fosfomonoesterase ácida, lisofosfolipase e  $\alpha$ -glucosidase), assim como componentes não peptídicos, tais como aminas fisiologicamente ativas (histamina, dopamina e noradrenalina), aminoácidos (ácido aminobutírico e  $\alpha$ -aminoácidos), açúcares (glucose e frutose), e compostos voláteis (Gajski & Garaj-Vrhovac, 2013; Liu et al., 2014; Park et al., 2010). De entre os descritos, os principais componentes são a histamina, catecolaminas, poliaminas, MEL e PLA2 (Oršolić et al., 2003), surgindo a melitina, o péptido desgranulador de mastócitos e a apamina como os componentes mais estudados do VA e responsáveis pela maior parte dos seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-neoplásicos (Jagua-Gualdrón, 2012).

O veneno de abelha é usado como medicamento tradicional para tratar infeções inflamatórias crónicas (artrite, reumatismo e dor nas costas) (Chang & Bliven, 1979; Kim et al., 2003; Kwon et al., 2001; Park et al., 2008; Son et al., 2007; Vasileiadou et al., 2010) e doenças de pele (Escrig et al., 1997; Han et al., 2012<sup>(1)</sup>; Han et al., 2012<sup>(2)</sup>). De facto, são descritas propriedades anti-inflamatórias em amostras provenientes de diferentes origens, nomeadamente Egito (Amin & Abdel-Raheem, 2014), Coreia (Lee et al., 2009; Park et al., 2007; Park et al., 2008), Estados Unidos da América (Chang & Bliven, 1979), e noutras amostras comerciais (Jang et al., 2005; Moon et al., 2007; Yoon et al., 2008). Alguns compostos individuais, como é o caso do péptido desgranulador de mastócitos

têm também revelado a mesma atividade (Banks et al., 1990), da melitina (Moon et al., 2007; Park et al., 2007; Rayahin et al., 2014; Srivastava et al., 2012) e da fosfolipase A2 (Ximenes et al., 2012), relacionados com a sua capacidade para reduzir as citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL-1 $\beta$ , ou IL-6), assim como outros mediadores da inflamação, incluindo a prostaglandina E2 (PGE2) e o óxido nítrico (NO), que são sintetizados pela ciclo-oxigenase (COX) e induzidos pela sintase do óxido nítrico (iNOS), respetivamente. A produção destes mediadores foi demonstrada em vários tecidos inflamados estando envolvidos na patogénese de várias doenças, tais como aterosclerose, obesidade, síndrome metabólica, diabetes, doenças neurodegenerativas e vários tipos de cancros (Jang et al., 2005; Janik et al., 2007; Karimzadeh et al., 2013; Mohammadi et al., 2015; Nam et al., 2003).

Os efeitos antitumorais do VA (Gajski et al., 2014; Ip et al., 2012; Kim et al., 2015; Lee et al., 2007; Liu et al., 2002; Moon et al., 2006), de amostras provenientes do Irão (Alizadehnohi et al., 2012) e da Eslovénia (Oršolić et al., 2003; Oršolić, 2009), bem como alguns componentes do veneno, tais como PLA 2 (Ferguson & Duncan, 2009) e melitina (Hu et al., 2006; Huh et al., 2012) surgem também descritos na literatura. Estas propriedades estão relacionadas com a indução da apoptose e necrose (Liu et al., 2014), e efeitos citotóxicos em diferentes linhas celulares, incluindo carcinomas da próstata, mama, rim, epitélio bronquial (Putz et al., 2006), pulmão (Huh et al., 2012), ovário (Alizadehnohi et al., 2012), cólon (Ferguson & Duncan, 2009), bexiga (Ip et al., 2012), leucemias (Moon et al., 2006), cervical (Gajski et al., 2014; Kim et al., 2015; Oršolić, 2009) e laringe (Gajski et al., 2014), mas também em células não tumorais, tais como linfócitos (Gajski & Garaj-Vrhovac, 2008; Garaj-Vrhovac & Gajski, 2009; Lee et al., 2007).

Os efeitos antimutagénicos (Varanda et al., 1999), antinocivos (Baek et al., 2006) e radioprotetores (Garaj-Vrhovac & Gajski, 2009) são outras propriedades bioativas do VA, juntamente com o ainda pouco investigado potencial antioxidante desta matriz natural, tendo sido apenas estudadas amostras provenientes da Coreia (Han et al., 2010) e dos EUA (Rekka et al., 1990), e do componente PLA2 (Snyder et al., 1985).

## 1.4. Considerações teóricas sobre os ensaios de atividade antioxidante em foco no presente trabalho

### 1.4.1. *Stress* oxidativo

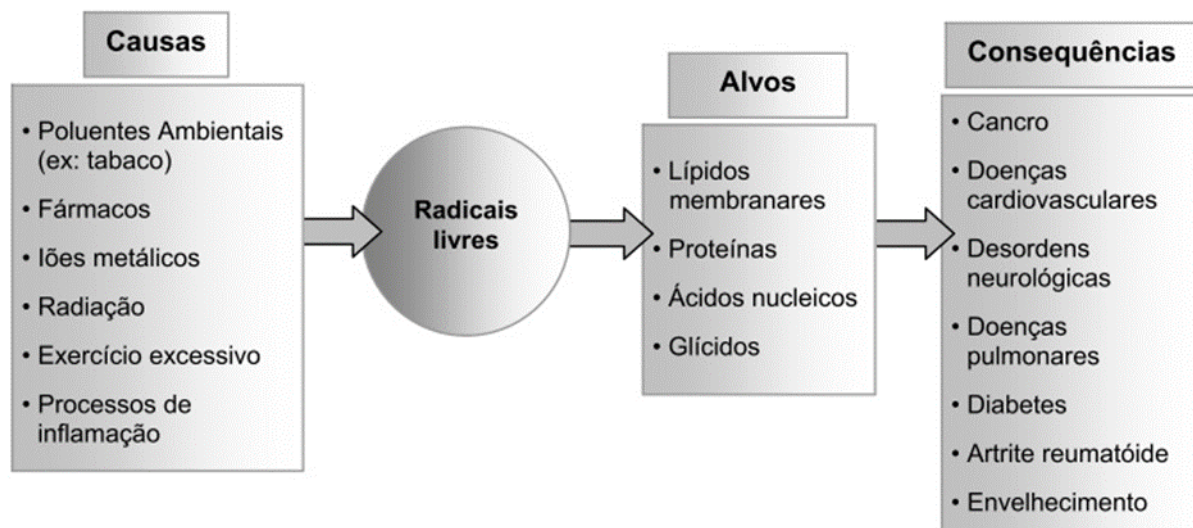
As reações bioquímicas que ocorrem nas células e nos organelos do nosso corpo são a força motriz que sustentam a vida. As leis da natureza impõem a sua ocorrência desde a infância até à idade adulta e, finalmente, a sua entrada num estado débil que leva à morte (Carocho & Ferreira, 2013). Os radicais livres são produzidos no metabolismo normal das células aeróbias, principalmente na forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Ferreira et al., 2009). Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas são uma condição essencial para o normal funcionamento do organismo (Ferreira & Abreu, 2007).

Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos de sinalização e de regulação (Ferreira & Abreu, 2007). No entanto, o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes podem ser destruídas devido à produção excessiva de ROS ou por deficiência das defesas celulares antioxidantes. Este desequilíbrio é conhecido como *stress* oxidativo, e neste caso, o excesso de ROS pode oxidar e danificar os lípidos celulares, as proteínas e o DNA, conduzindo à sua modificação e à inibição da sua função normal (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira et al., 2009).

O *stress* oxidativo pode ter causas naturais, nomeadamente em situações de exercício físico extremo ou em processos de inflamação (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira et al., 2009), ou causas não naturais, tais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (**Figura 2**). De facto, a produção não controlada de radicais livres tem sido relacionada com mais de uma centena de doenças, incluindo vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras. A superprodução de ROS também tem sido relacionada com o processo de envelhecimento (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira et al., 2009).

Considerando a estimativa de que 70% das doenças crónicas e dos custos associados podem ser prevenidos, facilmente se compreende a primordial importância do conhecimento, e se possível, do controlo da produção excessiva de ROS (Ferreira &

Abreu, 2007). Este controlo pode ser alcançado assegurando níveis adequados de antioxidantes e captadores de radicais livres, aumentando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos) ou evitando comportamentos de risco que levam a uma maior produção de ROS, como o tabaco, a exposição excessiva, os poluentes ambientais e xenobióticos (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira et al., 2009).



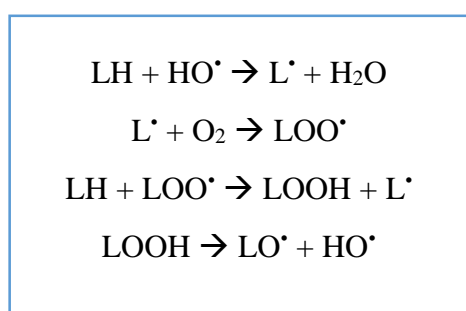
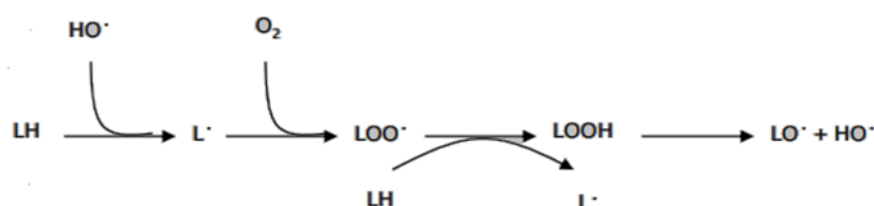
**Figura 2.** Principais causas e consequências da ação dos radicais livres (Ferreira & Abreu, 2007).

#### 1.4.2. Os radicais livres e as espécies reativas

Um radical livre pode ser um átomo, uma molécula ou um ião que contém um ou mais eletrões desemparelhados, isto é tem orbitais com apenas um eletrão (Ferreira & Abreu, 2007), ou seja, são altamente instáveis e encontram-se ativos para reações químicas com outras moléculas. Essas reações envolvem três elementos sendo eles oxigénio, azoto e enxofre, produzindo assim, as ROS mas também as espécies reativas de azoto (RNS) e as espécies reativas de enxofre (RSS) (Carocho & Ferreira, 2013). As ROS representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo (Ferreira & Abreu, 2007). As ROS incluem radicais livres como o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que é considerado um ROS “primário”, o radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), o radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) que é considerado um ROS “secundário”, o óxido nítrico (NO) e outras espécies, como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) que é um ROS “secundário”, o singlete de oxigénio ( $^1O_2$ ), o ácido hipocloroso (HOCl) e o peroxinitrilo ( $ONOO^{\cdot}$ ) (Carocho & Ferreira, 2013). O anião superóxido é principalmente produzido nas mitocôndrias, onde ocorre uma pequena, mas contínua, “fuga” de eletrões da cadeia respiratória. Estes

elétrões, ao invés de reduzir o  $O_2$  a moléculas de água, reduzem o  $O_2$  a anião superóxido. Apesar do anião superóxido não ser um radical muito ativo, pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais normalmente designados ROS “secundários”. O radical hidroxilo tem um tempo de vida muito curto mas é muito reativo, sendo a ROS que causa mais danos, nomeadamente por atacar moléculas de ADN, que danifica tanto as purinas como as pirimidinas e o esqueleto da desoxirribose do ADN (Ferreira & Abreu, 2007).

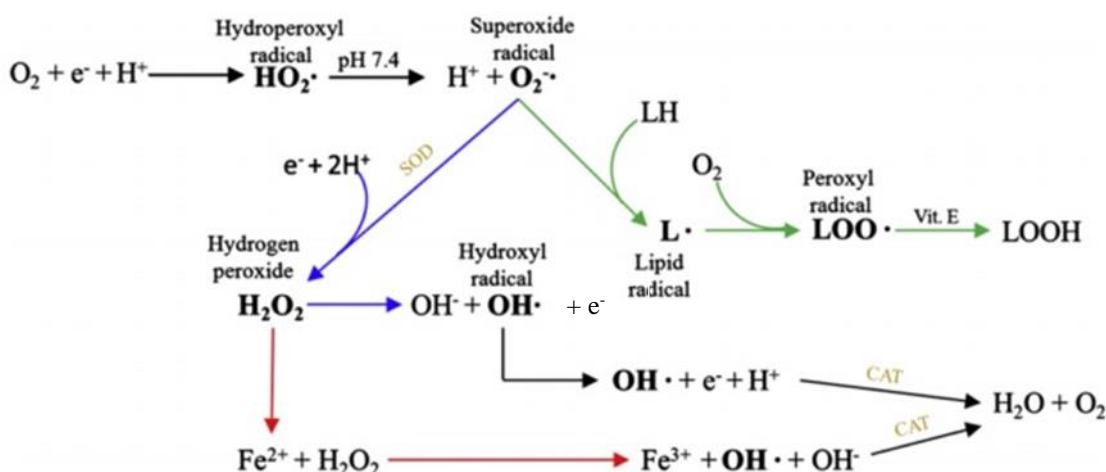
A peroxidação lipídica (**Figura 3**) é um dos fenómenos associados ao ataque dos radicais livres. Inicia-se com a extração de um átomo de hidrogénio de uma cadeia polinsaturada de um lípido (LH), através de uma ação intermédia de uma espécie reativa ( $HO^\bullet$  ou  $H_2O_2$ ), formando um radical lipídico ( $L^\bullet$ ). Seguindo-se o ataque pela adição de uma molécula de  $O_2$  formando-se um radical peróxido ( $LOO^\bullet$ ). Se este radical não for neutralizado por defesas antioxidantes, ele irá rapidamente desencadear um fenómeno de propagação lipídica reagindo com outros lípidos adjacentes e formando lípidos hidropéroxidos ( $LOOH$ ), que podem ser facilmente decompostos para formar novamente radicais  $L^\bullet$  (Ferreira & Abreu, 2007).



**Figura 3.** Esquema da peroxidação lipídica e reação em cadeia detalhada. (Adaptado dos apontamentos da disciplina de Bioensaaios de Produtos Naturais, 2014/2015)

As RNS derivam do NO por reação com o  $O_2^{\bullet-}$  e formação do  $ONOO^-$ . As RSS formam-se facilmente por reação das ROS com os tióis. As ROS que conduzem à produção de espécies reativas estão representadas na **Figura 4**. O radical hidropéroxido dissocia-se a pH 7, para formar o anião superóxido. Este anião é muito reativo e pode

interagir com as moléculas que geram as ROS quer diretamente através de uma enzima, quer por processos catalisados por metais. O ião superóxido também pode ser desintoxicado com o peróxido dismutase (SOD), através da reação de Haber-Weiss, e, finalmente, a água pela enzima catalase (CAT). Se o peróxido de hidrogénio reage com um catalisador do ferro como o  $\text{Fe}^{2+}$ , a reação de Fenton pode ter lugar ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$ ) formando o radical hidroxilo. No que diz respeito as RNS, o mecanismo de formação de  $\text{ONOO}^-$ , é  $\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^-$ . Finalmente, as RSS derivam, sob as condições oxidativas, a partir de tióis para formar um dissulfureto que, com a continuação da oxidação pode resultar em dissulfureto-S-monóxido ou dissulfureto-S-dióxido como uma molécula intermediária. Para finalizar, uma reação com o tiol reduzido pode resultar na formação do ácido sulfínico ou sulfenilo (Carocho & Ferreira, 2013).



**Figura 4.** Descrição geral das reações que conduzem à formação de ROS.

As setas verdes representa a peroxidação lipídica. As setas azuis representam as reações Haber Weiss e as setas vermelhas representam as reações de Fenton. As letras em negrito representam os radicais ou as moléculas com o mesmo comportamento ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). SOD refere-se à enzima superóxido dismutase e CAT à enzima catalase. Adaptado de (Carocho & Ferreira, 2013)

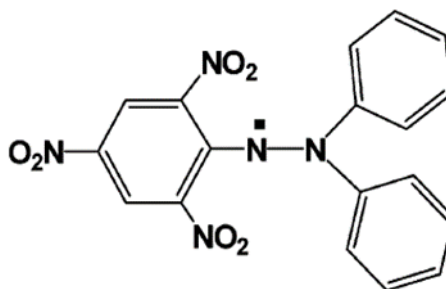
### 1.4.3. Ensaio de atividade antioxidante em foco no presente estudo

Um antioxidante é um composto que inibe ou atrasa a oxidação de substratos mesmo que o composto se encontre presente numa concentração significativamente menor que o substrato oxidado (Matkowski, 2008). Existem dois tipos de fontes de antioxidantes, os que podemos obter a partir de alimentos e suplementos alimentares, como por exemplo, as vitaminas E, D e  $\beta$ -caroteno, e os que são produzidos dentro do nosso próprio corpo e que são menos conhecidos, mas vitais. O último tipo inclui moléculas como a glutatona e o ácido úrico, que podem eliminar diretamente os radicais

livres, e enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que podem transformar os radicais livres em produtos não tóxicos. A melatonina tem surgido também como um novo membro dos sistemas antioxidantes além das macromoléculas ceruloplasmina e transferrina, e uma série de pequenas moléculas, incluindo a metionina e as vitaminas (E e C). Os antioxidantes podem ocorrer de forma endógena no organismo (enzimas e melatonina) ou exógena podendo ser obtidos a partir de suplementos alimentares e drogas sintéticas ou naturais, como as vitaminas e os seus precursores (vitaminas E e C, e carotenoides), selénio e polifenóis (Al-Jaber et al., 2011).

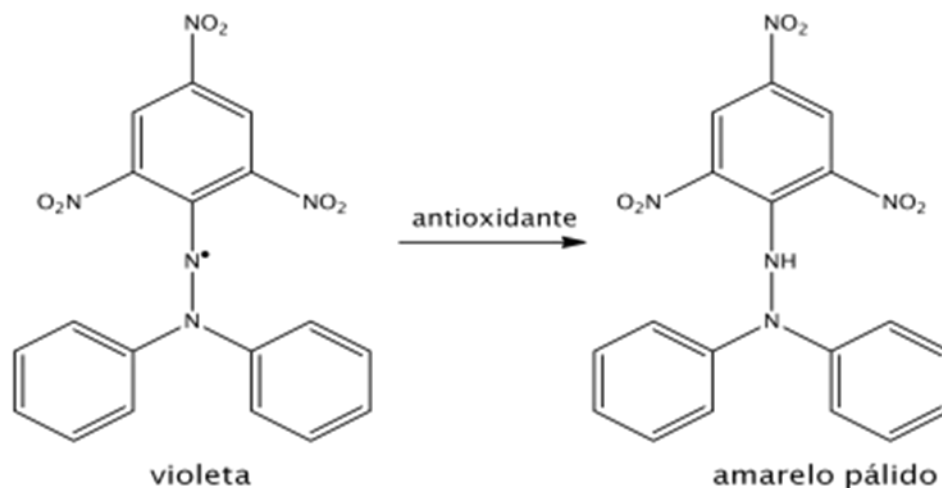
#### Atividade captadora de radicais DPPH

O ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (**Figura 5**) baseia-se no pressuposto que um dador de hidrogénio é um antioxidante.



**Figura 5.** Estrutura do DPPH (Prior et al., 2005).

Trata-se de um ensaio colorimétrico que utiliza o radical DPPH, que é um radical de azoto orgânico de longa duração (Karadag et al., 2009) e sofre uma mudança da cor púrpura para amarelo, como representado na **Figura 6** (Carocho & Ferreira, 2013), ou seja, o DPPH é convertido em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina ou num análogo substituído da hidrazina (Amarowicz et al., 2004), quando na presença de um antioxidante, e é amplamente utilizado como estudo preliminar (Carocho & Ferreira, 2013). A ação captadora de radicais DPPH resulta na diminuição da absorvância a 517 nm, assim, quanto mais rápida é a diminuição da absorvância, mais potente é a atividade antioxidante do extrato testado em termos da capacidade de doar um átomo de hidrogénio (Amarowicz et al., 2004).

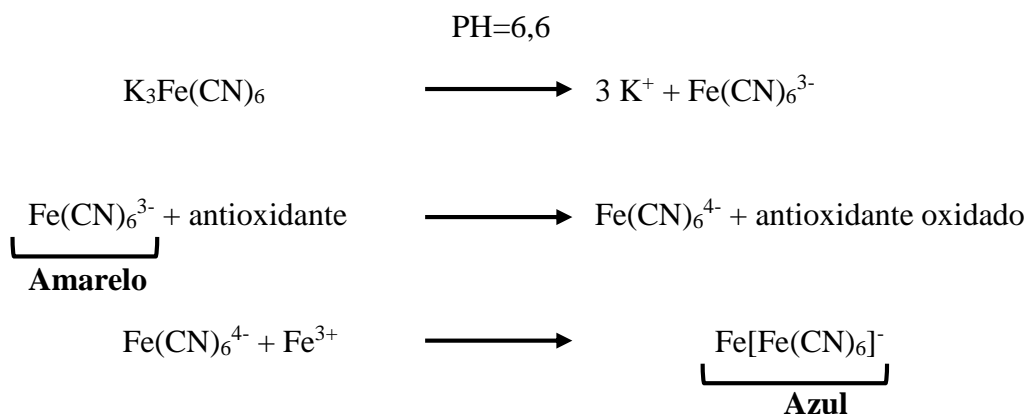


**Figura 6.** Esquema representativo da redução do DPPH.

O ensaio DPPH é uma técnica simples e rápida, necessitando apenas de um espectrofotômetro de UV-Vis o que pode explicar o seu uso generalizado no rastreamento de antioxidantes. Quando efetuado em microplacas, permite estudar um grande número de amostras (Karadag et al., 2009).

#### Poder redutor pelo ensaio do ferricianeto/azul da Prússia

O ensaio do poder redutor pelo ensaio do ferricianeto/azul de Prússia foi originalmente desenvolvido por Benzie e Strain para medir o poder redutor no plasma, mas o ensaio foi posteriormente adaptado e utilizado para o ensaio de antioxidantes em botânica (Prior et al., 2005). Este ensaio baseia-se na capacidade de algumas moléculas antioxidantes para reduzir o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ao íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (**Figura 7**), através da doação de elétrons (Karadag et al., 2009). A reação deteta compostos com potenciais redox de  $<0,7$  V, ou seja, o potencial redox do  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo um ensaio que permite manter a capacidade redox em células e tecidos (Prior et al., 2005). O resultado da cor azul é medida espectrofotometricamente a 593 nm, tendo em conta a linearidade relacionada com a capacidade de redução total dos antioxidantes doadores de elétrons (Karadag et al., 2009).

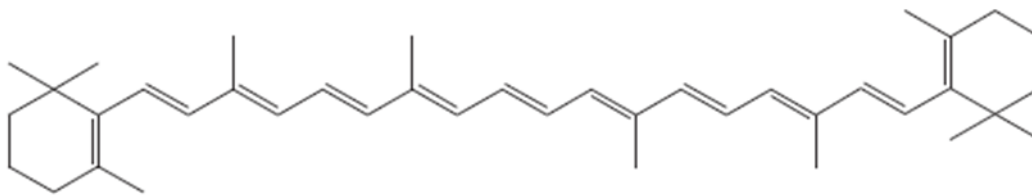


**Figura 7.** Reações envolvidas no ensaio do poder redutor.

O ensaio do poder redutor é simples, rápido, barato, robusto e não requer equipamento especializado. Este ensaio pode ser realizado por métodos automatizados, semi-automatizados ou manuais (Karadag et al., 2009). No presente trabalho, o ensaio foi realizado pelo método manual.

#### Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio do $\beta$ -caroteno/linoleato

Os carotenoides são uma grande família de compostos e são pigmentos sintetizados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais (Rao & Rao, 2007; Uenojo et al., 2007). As frutas e as verduras constituem as principais fontes de carotenoides na dieta humana, mas também estão presentes em fungos e flores, sendo responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho (Rao & Rao, 2007; Uenojo et al., 2007). Pensa-se que estes são responsáveis pelas propriedades benéficas das frutas e dos vegetais na prevenção de doenças, incluindo as doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose, degeneração muscular relacionada com a idade e outras doenças crónicas (EL-Agamey et al., 2004; Rao & Rao, 2007). Até ao momento, foram identificadas mais de 600 estruturas. No entanto, apenas cerca de 40 se encontram presentes na dieta humana. Destes 40, cerca de 20 carotenoides foram identificados no sangue e em tecidos humanos. Mas cerca de 90% dos carotenoides presentes na dieta e no corpo humano são representados pelo  $\beta$ -caroteno (**Figura 8**),  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina. Os carotenoides são utilizados comercialmente como corantes alimentares e em suplementos nutricionais (Uenojo et al., 2007).



**Figura 8.** Estrutura química do  $\beta$ -caroteno (Uenojo et al., 2007).

Os carotenoides são tetraterpenoides de 40 carbonos ligados por unidades opostas no centro da molécula, ou seja, todos os carotenoides possuem uma estrutura poliisoprenoide, compreendida por uma cadeia longa conjugada de ligações duplas e uma simetria bilateral em torno das ligações duplas centrais. A ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração das ligações duplas, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigénio ou a combinação destes processos resultam na diversidade das estruturas dos carotenoides. A cadeia poliénica pode ter de 3 a 15 ligações duplas conjugadas e o comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da molécula. As ligações duplas são baseadas em 7 grupos terminais diferentes, dos quais apenas 4 ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$  e  $\psi$ ) são encontrados nos carotenoides de vegetais superiores. Os carotenoides são compostos apenas por carbonos e hidrogénios sendo denominados por carotenos (Rao & Rao, 2007; Uenojo et al., 2007).

A vitamina A, ou retinol, é um precursor do  $\beta$ -caroteno, esta vitamina é um micronutriente, lipossolúvel e das mais importantes, sendo produzida no fígado. A vitamina A é conhecida por ter um impacto benéfico sobre a pele, olhos e órgãos internos, o que lhe confere a atividade antioxidante e a capacidade de neutralizar radicais peróxido envolvidos no processo de peroxidação lipídica (Carocho & Ferreira, 2013; Marques, 2014).

O ensaio da peroxidação lipídica do  $\beta$ -caroteno/linoleato é uma técnica espectrofotométrica inicialmente desenvolvida por Marco e modificada por Miller, que envolve a medição da descoloração do  $\beta$ -caroteno a 470 nm resultante da oxidação do  $\beta$ -caroteno por degradação do ácido linoleico, avaliando a atividade de capturação de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Laguerre et al., 2007; Pereira, 2011). O ácido linoleico possui um grupo metileno bis-álíco ativo, que se encontra localizado no carbono 11 entre duas ligações duplas, que durante a oxidação remove um átomo de hidrogénio (H). Em seguida, o H que foi removido dá origem ao radical livre

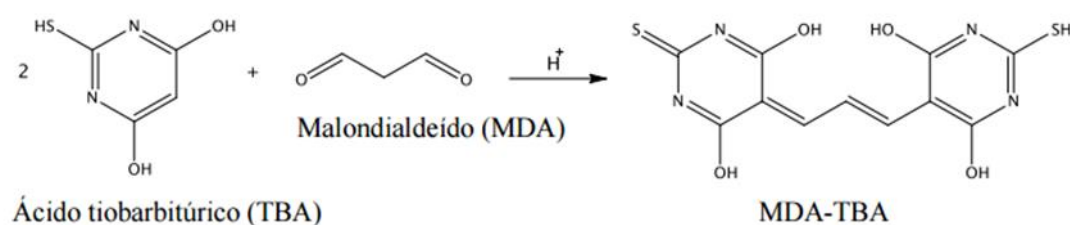
pentadieno que “ataca” o  $\beta$ -caroteno insaturado para readquirir o átomo de H. Como as moléculas do  $\beta$ -caroteno perdem a sua conjugação, os carotenoides perdem a sua característica cor de laranja (**Figura 9**). Neste ensaio, o  $\beta$ -caroteno sofre uma rápida descoloração quando na ausência de um antioxidante (Amarowicz et al., 2004; Burda & Oleszek, 2001; Marques, 2014).



**Figura 9.** Reações envolvidas no ensaio de descoloração do  $\beta$ -caroteno.

#### Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS

O ensaio TBARS foi desenvolvido no fim dos anos 40 e é agora o método mais comumente utilizado para detetar a oxidação lipídica, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo que este ensaio é simples, específico e não requer controlos rigorosos (Antolovich et al., 2002; Carocho & Ferreira, 2013; Laguerre et al., 2007). As substâncias reativas: ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) têm sido utilizadas como biomarcadores (Niki, 2009). Este ensaio envolve a reação do TBA com o MDA produzido pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos para formar um cromogéneo rosa (**Figura 10**) que pode ser medido por absorvância a 532 nm ou por fluorescência a 553 nm (Carocho & Ferreira, 2013; Laguerre et al., 2007).



**Figura 10.** Reação do MDA e TBA na formação de TBARS.

Esta coloração resulta da condensação de 2 moles de TBA e 1 mol de MDA, sob efeito conjunto da temperatura média e do pH.

No entanto, este método tem sido alvo de várias críticas. A primeira é que o MDA é o único que tem cadeias de ácidos gordos contendo, pelo menos três ligações duplas, como o ácido linolénico, mas com a exclusão do ácido linoleico e os produtos de decomposição da peroxidação do ácido oleico. Em segundo lugar, o TBA não é específico para o MDA, pois este pode reagir com outros aldeídos, escurecer os produtos da reação, produtos de degradação de proteína e açúcar, aminoácidos e os ácidos nucleicos (Antolovich et al., 2002; Laguerre et al., 2007).

### **1.5. Considerações teóricas sobre os ensaios de atividade anti-inflamatória em foco no presente estudo**

A inflamação é uma resposta biológica complexa a um estímulo nocivo, ou seja, é um mecanismo de defesa do hospedeiro em resposta a uma lesão no tecido, em relação a produtos químicos nocivos ou agentes patogénicos, para eliminar os patogénicos invasores e para remover substâncias irritantes, que estão associada a várias condições fisiopatológicas (Buapool et al., 2013; Kim et al., 2014). Existem dois tipos de inflamação, aguda ou crónica (Buapool et al., 2013). A inflamação aguda é uma maneira eficiente que o organismo possui, permitindo neutralizar, inativar ou eliminar o agente causador da agressão. A inflamação crónica é caracterizada por um agente agressor/invasor sendo inerte, pouco agressivo, ou quando é persistente podendo haver uma agravação para uma inflamação aguda (Blanck, 2008). Os principais sinais de inflamação são a dor, inchaço, vermelhidão e calor que se desenvolvem como uma resposta aguda na zona inflamada.

No processo inflamatório, as células inflamadas são ativadas para segregar mediadores, tais como bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas (como por exemplo, a PGE<sub>2</sub>), leucotrienos e o óxido nítrico (NO) (Buapool et al., 2013).

O NO é uma molécula de sinalização importante para a defesa do hospedeiro em resposta a vários agentes patogénicos, tais como bactérias, vírus, fungos e parasitas, e que se encontra envolvida na imunorregulação intracelular e intercelular (Joo et al., 2014; Kim et al., 2014; Zhang et al., 2014). Sob condições fisiológicas normais, o NO

desempenha um papel importante na regulação de vários processos fisiopatológicos, tais como neuronal, comunicação, vasodilatação e neurotoxicidade. Mas, a superprodução de NO causa danos nos tecidos associados às inflamações agudas e crônicas. O NO é um mediador intracelular produzido em várias células de mamíferos e com uma vida curta, produzido a partir de L-arginina pela sintase do óxido nítrico (NOS) (Buapool et al., 2013; Joo et al., 2014). Existem três isoformas distintas de NOS, sendo elas a NOS neuronal (nNOS), a NOS induzível (iNOS) e a NOS endotelial (eNOS). Destas isoformas, a iNOS é uma enzima importante que se encontra envolvida na regulação da inflamação (Buapool et al., 2013; Kim et al., 2014). A produção de NO pode ser reduzida através da inibição da iNOS, de forma a aliviar a inflamação (Zhang et al., 2014). Mas, caso ocorra uma elevada produção de iNOS e uma supressão da produção de NO podem surgir consequências prejudiciais, tais como artrite reumatoide, choque séptico, doença de Alzheimer e doenças inflamatórias (Buapool et al., 2013; Kim et al., 2014).

Os macrófagos são componentes importantes do sistema imunitário dos mamíferos e desempenham um papel fundamental, fornecendo uma defesa imediata contra os agentes externos/nocivos, antes da migração dos leucócitos e da produção de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo o radical livre de curta duração do NO (Joo et al., 2014).

O lipopolissacárido (LPS) é um componente que se forma a partir das células de bactérias Gram-negativo, sendo um dos ativadores mais poderosos dos macrófagos e envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias (Joo et al., 2014).

## **1.6. Considerações teóricas sobre os ensaios de citotoxicidade em foco no presente trabalho**

### 1.6.1. Tipos de células

#### Cultura primária

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células provenientes de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguirem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à caixa de cultura ou caixa “Carrel” formam assim a primeira monocamada de

células provenientes do tecido, sendo que no nosso caso a cultura primária é proveniente de células de fígado de porco. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à presença das suas características genotípicas e fenotípicas (Alves & Guimarães, 2010).

As células primárias que conseguem manter as suas características originais possuem um tempo de vida curto. No organismo, a morte celular é um mecanismo para a renovação tecidual. É um tipo de morte programada e não causa danos. Esse processo é denominado apoptose. Na apoptose, a célula não se rompe, ela simplesmente se “destrói”, formando os botões apoptóticos que são degradados. À medida que a cultura é repicada, as células com maior capacidade de proliferação irão predominar na caixa de cultura em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa de proliferação normal (Alves & Guimarães, 2010).

#### Células estabelecidas

As células estabelecidas ou linha celular contínua são as células que ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem elevada taxa de proliferação. Este tipo de células são muito utilizadas em investigação, pois podem ser mantidas em cultura por um grande período de tempo e guardam grande parte das características do tecido original. Muitas linhas celulares contínuas podem ser propagadas sem perder as suas características pelo menos até oitenta gerações, ou seja, até oitenta repicagens provenientes da cultura de células inicial, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo em relação ao número original da espécie. Essas células são muito utilizadas em pesquisas e na produção de vacinas, como é o caso da linha MRC-5, proveniente do tecido de pulmão de feto humano e utilizada na produção da vacina de rubéola (Alves & Guimarães, 2010).

#### Células transformadas

As células transformadas são células que deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido de origem. Este tipo de células podem ser transformadas em cultura utilizando substâncias químicas, vírus ou agentes físicos, como a luz ultravioleta (Alves & Guimarães, 2010).

A transformação celular é uma alteração genética que permite mutações em genes responsáveis pelo controlo do ciclo celular. A mutação pode resultar de uma superexpressão de proto oncogenes ou da inativação de genes supressores de tumor. O principal reflexo dessa mutação é a presença da telomerase ativa. Durante a divisão, a célula perde o telómero, ou seja, perde um fragmento da porção final dos seus cromossomas. Esse processo é um tipo de controlo para que a célula, ao “procurar” se há possibilidade de divisão (check point), realiza a apoptose ao perceber que o seu ADN está danificado a ponto de alterar alguma transcrição. A telomerase repõe o telómero perdido permitindo que a célula se divida indefinidamente sem perder o seu ADN. O aumento da proliferação está diretamente ligada ao processo de transformação (Alves & Guimarães, 2010).

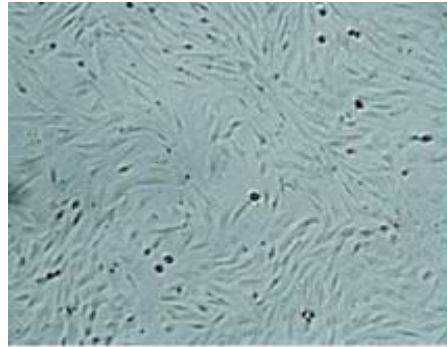
As células transformadas também podem ser obtidas diretamente a partir de tecidos já mutados, como é o caso dos tecidos tumorais. O exemplo mais conhecido deste tipo de células são as células HeLa provenientes de um tumor cervical humano. As células HeLa são células genética e morfologicamente diferentes do tecido original, e não possuem dependência de ancoragem nem inibição por contato, além de serem capazes de proliferar infinitamente quando em cultura (Alves & Guimarães, 2010).

No presente trabalho, foram utilizadas quatro linhas celulares de células transformadas sendo elas HeLa (anteriormente referidas), HepG2 (carcinoma de fígado), NCI-H460 (carcinoma de pulmão) e MCF-7 (carcinoma de mama).

#### Células aderentes

As células aderentes (**Figura 11**) são provenientes de tecidos duros e, por isso, são dependentes de agregação, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. Para este tipo de células, as caixas de cultura devem possuir carga negativa. Esta carga interfere na produção de proteínas de adesão e proteoglicanos que irão iniciar o processo de adesão da célula á superfície da caixa de cultura. A matriz extracelular é que interage com a carga negativa da caixa, fazendo com que as células adiram á matriz através de recetores específicos. Sendo que em cultura *in vitro*, as células aderentes espalham-se por todo o fundo da caixa formando uma monocamada celular (Alves & Guimarães, 2010).

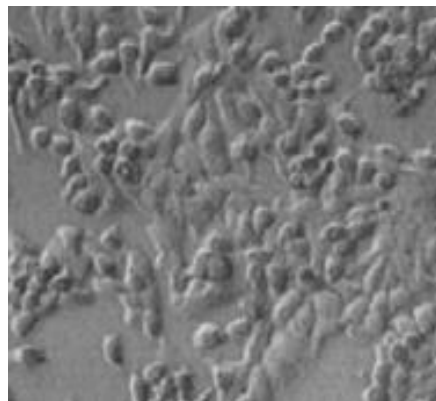
No presente trabalho, as quatro linhas celulares utilizadas são todas células aderentes.



**Figura 11.** Células aderentes de fígado (HepG2) (Adaptado de <http://www.celeromics.com>).

#### Células não aderentes ou em suspensão

As células não aderentes (**Figura 12**) podem ser cultivadas em suspensão no meio e são provenientes de tecidos que não necessitam de agregação para proliferarem e sobreviverem. Esta capacidade é restrita às células hematopoiéticas, às linhas celulares transformadas ou às células de tecidos tumorais (Alves & Guimarães, 2010).



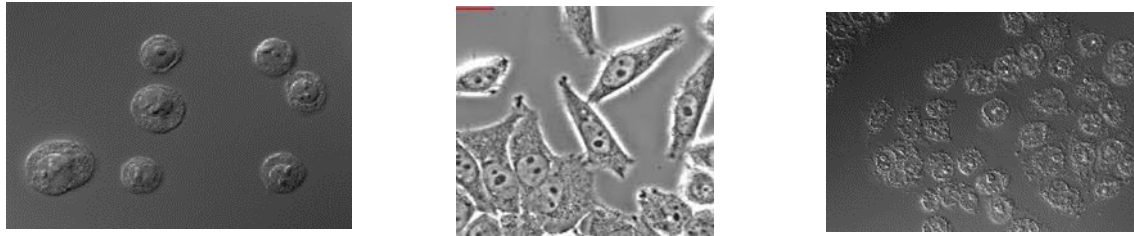
**Figura12.** Células de fibroblastos não aderentes (Kawasaki-Oyama et al., 2008).

### 1.6.2. Linhas celulares tumorais em estudo

#### Linha celular HeLa

As células HeLa (**Figura 13**) são provenientes de *Homo sapiens*, mais precisamente de um tecido retirado da biopsia realizada a Henriette Lacks, sendo fornecida para o departamento de patologia para avaliação clínica e ao laboratório de

cultura celular do departamento de cirurgia do Hospital Johns Hopkins para fins de investigação.



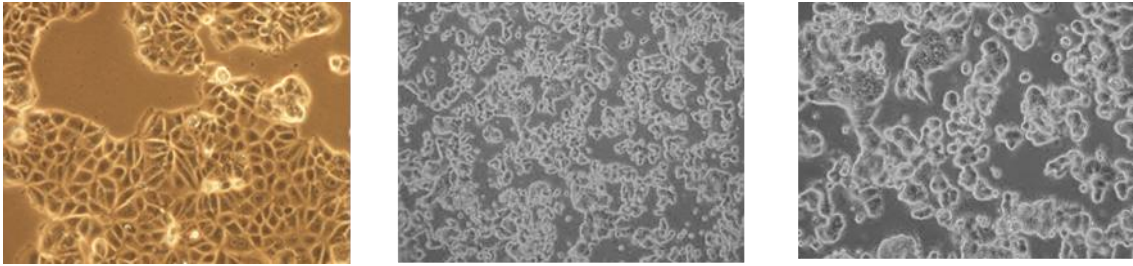
**Figura 13.** Imagens microscópicas das diversas formas em que se podem transformar as células HeLa. (Adaptado de celeromics)

Várias tentativas foram aplicadas anteriormente para realizar o crescimento da cultura do epitélio cervical normal ou do carcinoma cervical da cultura que se tornou indescritível. No entanto, as tentativas para cultivar as células do adenocarcinoma agressivo do colo do útero que tinham afetado Henrietta Lacks foram bem-sucedidos. Após 20 anos reexaminaram as lâminas de histopatologia da senhora Lacks, a biópsia cirúrgica e a autópsia levou a uma revisão do diagnóstico inicial, constatando que a paciente teve um adenocarcinoma agressivo. O carcinoma do colo do útero era muito agressivo e a paciente teve um agravamento clínico muito rápido. Embora o conceito do carcinoma do colo do útero ter sido rapidamente progressivo, este assunto tem sido muito questionado (Lucey et al., 2009).

#### Linha celular MCF-7

MCF-7 (**Figura 14**) é uma linha celular do cancro epitelial amplamente utilizada e é derivada do adenocarcinoma da mama, proveniente de *Homo sapiens*. Estas células foram estabelecidas a partir da fusão pleural de uma mulher de 69 anos de idade, caucasiana e com um carcinoma mamário metastático (após radioterapia e hormonoterapia) em 1970. As células MCF-7 mantêm as características diferenciais do epitélio mamário, incluindo a capacidade de processar o estradiol através de recetores de estrogénio citoplasmático.

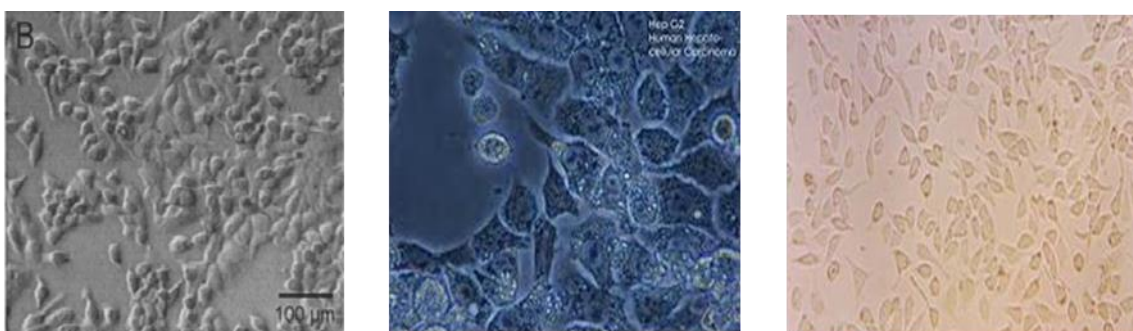
Embora sejam fáceis de propagar, as células são, de um modo geral, de crescimento lento e tem a capacidade de formar cúpulas.



**Figura 14.** Imagens microscópicas das diversas formas em que se podem transformar as células MCF-7. (Adaptado de celeromics)

### Linha celular HepG2

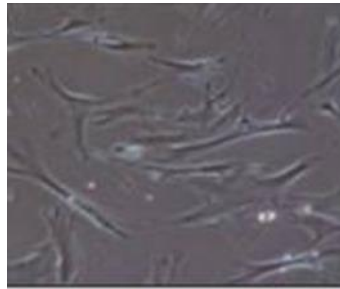
HepG2 (**Figura 15**) é uma linha celular perpétua proveniente de *Homo sapiens* constituída por células do carcinoma do fígado humano, estabelecidas a partir do tecido tumoral de um menino argentino de 15 anos de idade com um carcinoma hepatocelular bem diferenciado, em 1975. Esta linha celular é patenteada. O carcinoma hepatocelular é, em todo o mundo, o quinto cancro mais comum. Estas células possuem uma morfologia epitelial e tem 55 pares de cromossomas. As células HepG2 podem ser cultivadas com sucesso em grande escala e secretam muitas proteínas do plasma, tais como albumina, transferina, fibrinogénio e plasminogénio. Estas células são do tipo epiteliais aderentes com um crescimento semelhante a monocamadas e em pequenos agregados ([www.hepg2.com](http://www.hepg2.com)).



**Figura 15.** Imagens microscópicas das diversas formas em que se podem transformar as células HepG2. (Adaptado de celeromics)

#### 1.6.2.1. Linha celular NCI-H460

As células NCI-H460 (**Figura 16**) são provenientes de *Homo sapiens*, mais precisamente do carcinoma de pulmão e foram estabelecidas em 1982 a partir do fluido pleural de um paciente com carcinoma de células grandes de pulmão. Em relação á sua morfologia são células epiteliais com crescimento aderente e em monocamadas ([www.DSMZ.de](http://www.DSMZ.de)).



**Figura 16.** Imagem microscópica das células NCI-H460 (Choi et al., 2014).

## 2. Objetivos

As matrizes naturais estudadas no presente trabalho são dois produtos apícolas ainda pouco investigados, sobretudo em Portugal: pão de abelha e veneno de abelha ou apitoxina.

Assim, os principais objetivos foram:

- Caracterizar quimicamente amostras de pão de abelha (cinco amostras recolhidas em colmeias de *Apis mellifera iberiensis* localizadas em diferentes apiários da zona de Bragança, e uma amostra comercial) e avaliar a sua bioatividade em termos de citotoxicidade.
- Caracterizar quimicamente amostras de veneno de abelha (cinco amostras recolhidas em colmeias de *Apis mellifera iberiensis* localizadas em dois apiários diferentes da zona de Bragança) e avaliar a sua bioatividade em termos de propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas.

A caracterização química do pão de abelha foi realizada na sequência de um estudo prévio de caracterização das amostras, pelo que neste trabalho incidiu-se unicamente na caracterização da composição fenólica por HPLC-DAD-ESI/MS, após extração com metanol:água 80:20 (v/v). A capacidade de inibição do crescimento celular (citotoxicidade) foi avaliada em quatro linhas celulares humanas tumorais: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular), utilizando o método da sulforrodamina B (SRB). A citotoxicidade para células normais foi avaliada utilizando uma cultura primária estabelecida a partir de células de fígado de porco (PLP2).

A caracterização química das amostras de apitoxina incluiu a análise de três péptidos (MEL, PLA2 e APA) por LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>. A atividade antioxidante das soluções aquosas foi avaliada por diferentes ensaios *in vitro*: efeitos captadores de radicais livres (ensaio do DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), poder redutor (ensaio ferricianeto/azul da Prússia) e inibição da peroxidação lipídica (ensaio  $\beta$ -caroteno/linoleato e TBARS- espécies reativas do ácido tiobarbitúrico em homogeneizados cerebrais). A atividade anti-inflamatória foi avaliada numa linha celular de macrófagos de rato (RAW 264.7), através da inibição da produção de óxido nítrico. A citotoxicidade foi avaliada de forma idêntica à descrita para as amostras de pão de abelha.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Padrões e reagentes

O acetonitrilo de grau HPLC foi obtido na Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico e o ácido acético foram adquiridos na Prolabo (VWR Internacional, França). Os padrões dos compostos fenólicos provieram da Extrasynthese (Genay, França). O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi obtido a partir de Alfa Aesar (Ward Hill, EUA).

A apamina do VA (pureza 98,3%) foi obtida em Calbiochem (San Diego, Califórnia, EUA). A fosfolipase A2 do VA (atividade: 1775 unidades mg<sup>-1</sup> sólido), o citocromo C de coração de cavalo (pureza ≥ 95%), o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), o lipopolissacárido (LPS), a dexametasona, a sulforrodamina B, o azul de tripano, o ácido tricloroacético (TCA) e o Tris foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A melitina do VA (pureza: 67%) foi obtida na Latoxan (Valence, França).

As linhas celulares HeLa, HepG2, NCI-H460 e MCF-7 foram adquiridas na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), o soro fetal bovino (FBS), a L-glutamina, a tripsina-EDTA e a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respectivamente) foram obtidos na Gibco Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Califórnia, EUA). A água foi tratada através de um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA).

Os macrófagos RAW 264,7 foram adquiridos na ECACC (*European Collection of Animal Cell Culture*) (Salisbury, UK). O Kit Griess Reagent System foi obtido na Promega (Madison, WI, EUA).

## 3.2. Amostras

### 3.2.1. Pão de abelha

As amostras de PA foram recolhidas no ano 2012, em colónias de *Apis mellifera iberiensis* localizadas em diferentes apiários da zona de Bragança, Nordeste de Portugal. Mais precisamente, nos apiários de Santa Maria (PA1), Montesinho (PA2), Rio de Onor (PA3), Vinhais (PA4) e Castrelos (PA5). Uma sexta amostra comercial foi obtida na empresa *Bee Healthy Farms* (EUA).

As amostras foram liofilizadas (FreeZone 4,5 model 7750031, Labconco, EUA), desidratadas e reduzidas a um pó fino (20 mesh), sendo em seguida homogeneizadas, e armazenadas num exsiccador, protegidas da luz, até às análises subsequentes.

### 3.2.2. Veneno de abelha

Foram recolhidas cinco amostras de VA distintas entre Maio e Junho de 2014, em colónias de *Apis mellifera iberiensis* localizadas na região do Nordeste de Portugal em dois apiários diferentes próximos de Bragança. A distância entre os dois apiários (VA1-4 em Milhão; VA5 em Aveleda) é de cerca de 26 Km. Para recolher as amostras foi utilizado um coletor de VA denominado por BeeWhisper 0412 (IGK Electronics, Bulgária), colocado à entrada da colmeia. O processo de recolha do veneno requer a aplicação de um choque elétrico de impulso leve (1,8 V) quando a abelha pousa sobre os fios condutores do coletor. Como reação, as abelhas geram uma resposta imediata tentando picar a superfície da folha do coletor e libertando o veneno. O choque elétrico é reproduzido a cada 50 segundos, entre os quais o dispositivo realiza uma pausa de 10 segundos. Após 40 minutos de tempo de trabalho, o dispositivo desliga-se automaticamente, sendo esse o tempo máximo utilizado em cada sessão para a recolha de VA por amostra. No final da sessão, o veneno é recolhido do coletor por raspagem, liofilizado e armazenado a -18°C para análises posteriores.

### 3.3. Preparação das amostras

#### 3.3.1. Amostras de pão de abelha

A extração foi realizada em metanol: água (80:20, v/v) a partir do material liofilizado. Cada amostra (1 g) foi extraída duas vezes por agitação (25°C a 150 rpm) com 30 mL de metanol: água (80:20, v/v) durante 1h e, posteriormente, filtrada através de um papel de filtro Whatman nº4. O filtrado foi evaporado a 40°C (evaporador rotativo Buchi R-210, Flawil, Suíça) de forma a eliminar o metanol, sendo de seguida congelado e liofilizado, para remoção da água.

#### 3.3.2. Amostras de veneno de abelha

As amostras de VA foram utilizadas sem qualquer tratamento, tendo-se analisado soluções aquosas das diferentes amostras.

### 3.4. Caracterização química das amostras

#### 3.4.1. Caracterização das amostras de pão de abelha por HPLC-DAD-ESI/MS

Os compostos fenólicos foram analisados usando um cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) com uma bomba quaternária e um detetor de díodos (DAD) acoplado a uma estação Chem HP (rev. A.05.04), para tratamento de dados. Utilizou-se uma coluna Waters Sherisorb S3 ODS-2 C-18, 3µm (4,6 mm × 150mm) termoestabilizada a 35°C. Os solventes usados foram: (A) ácido fórmico a 0,1% em água e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição isocrático foi estabelecido a 15% durante 15min, sendo ele de 15-20% de B ao longo de 5min, 20-25% de B ao longo de 10min, 25-35% de B ao longo de 10min, 35-50% durante 10min e reequilíbrio da coluna, usando uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A deteção dupla em linha foi realizada utilizando o DAD com um comprimento de onda pré-definido a 280nm e 370nm e num espetrofotómetro de massa (MS) ligado a um sistema de HPLC através da saída de células do DAD. A deteção por MS foi realizada numa API 3200

Qtrap (Applied Biosystems, Darmstad, Alemanha) equipado com uma fonte de ESI e um analisador de massas com uma tripla armadilha de iões quadruplo, controlado pelo software Analyst 5.1. Os zeros graus do ar serviram de gás nebulizadores (30 psi) e de turbo para a secagem do solvente (400°C, 40 psi). O azoto serviu de cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). Os quadripolos foram fixados em resolução da unidade. A tensão de pulverização iónica foi fixada em -4500V no modo negativo. O detetor de MS foi programado para gravar em dois modos consecutivos: MS avançado e MS reforçado por uma análise de produto do ião (EPI). O primeiro foi usado para obter os espectros completos de varrimento, de modo a ter uma visão geral de todos os iões presentes na amostra. As definições usadas foram: potencial de deutério (DP) -450V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. O modo de EPI foi realizado para obter o padrão de fragmentação do ião mãe no varrimento anterior, utilizando os seguintes parâmetros: DP -50V, EP -6V, CE -25V e espalhar a energia de colisão 0V. Os espectros foram registrados no modo de iões negativos entre  $m/z$  100 e 1000.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com o seu espectro UV, espectros de massa e tempo de retenção, em comparação com os padrões quando disponíveis. Para a análise quantitativa dos compostos fenólicos, foi obtida uma curva de calibração de nível por injeção de concentrações padrão conhecidas (2,5-100 µg/mL) de diferentes compostos: isoramnetina-3-*O*-glucósido ( $y=218,26x-0,98$ ;  $R^2=0,999$ ); isoramnetina-3-*O*-rutinósido ( $y=284,12x+67,055$ ;  $R^2=0,999$ ); canferol-3-*O*-glucósido ( $y=288,55x-4,05$ ;  $R^2=1$ ); canferol-3-*O*-rutinósido ( $y=182,94x+96,644$ ;  $R^2=1$ ); quercetina-3-*O*-glucósido ( $y=236,33x+70,006$ ;  $R^2=0,999$ ) e quercetina-3-*O*-rutinósido ( $y=280,87x+0,37373$ ;  $R^2=1$ ). Os resultados foram expressos em µg por g de extrato.

#### 3.4.2. Caracterização das amostras de veneno de abelha por LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>

A análise LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> dos péptidos foi realizada no Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, EUA) equipado com um detetor de díodos e acoplado a um detetor de massas. O sistema cromatográfico consistia numa bomba quaternária, um amostrador automático mantido a 5°C, um desgaseficador, um detetor de díodos e um compartimento automático de coluna termostático. A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna XSelect CSH130 C18, 100mm×2,1 mm ID, 2,5µm (Waters,

Milford, MA) e a temperatura foi mantida a 30°C. A fase móvel era composta por (A) 0,1% (v/v) ácido fórmico em água e (B) 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrilo, previamente degaseificados (com ajuda dos ultrassons) e filtrados. O gradiente do solvente começou a 100% de A, atingindo 60% de B em 12min, 100% de B em 15 minutos e retornando às condições iniciais. A taxa de fluxo foi de 0,3 mL/min, com um volume de injeção de 40 µL. Os dados de todos os picos do espectro foram acumulados na gama dos 190-500 nm. O Citocromo C, utilizado como padrão interno (PI), foi preparado em água desionizada a uma concentração de 25 µg/mL. Para a realização da análise, dissolveu-se o VA liofilizado (3 mg) em 10 mL de PI. Cada amostra foi filtrada através de uma membrana de *nylon* com 0,2 µm (Whatman). A quantificação dos péptidos do VA foi realizada através da utilização das retas de calibração da apamina (2-60 µg/mL;  $y = 0,032x + 0,012$ ;  $R^2 = 0,9988$ ), fosfolipase A2 (4-120 µg/mL;  $y = 0,042x + 0,045$ ;  $R^2 = 0,999$ ) e melitina (21-335 µg/mL;  $y = 0,032x + 0,133$ ;  $R^2 = 0,9992$ ). As soluções padrão foram preparadas por dissolução de modo a obter as concentrações desejadas.

O espectrômetro de massas foi usado em modo de iões positivos utilizando o espectrofotômetro de massas Linear Ion Trap LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte de ESI. As condições típicas da ESI foram um revestimento de azoto 35 psi, a tensão de pulverização de 3,5 kV, uma fonte de temperatura a 300°C, uma tensão capilar de 20V e o tubo da lente de deslocamento foi mantida a uma tensão de 74V. O varrimento total abrange uma gama de massa de  $m/z$  50 a 2000. A energia de colisão usada foi de 30 (unidades arbitrárias). A recolha de dados foi realizada com o sistema de dados Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA).

### 3.5. Avaliação das propriedades bioativas

#### 3.5.1. Avaliação da atividade antioxidante das amostras de veneno de abelha

##### Geral

Foram aplicados quatro ensaios (Barros et al., 2009) para avaliar a atividade antioxidante de todas as amostras de VA. As amostras de VA foram dissolvidas em água a 5 mg/mL, sendo em seguida submetidas a diluições sucessivas entre 5 e 0,02 mg/mL. Os resultados foram expressos em valores de EC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração da amostra que providencia 50% da atividade antioxidante ou a absorção de 0,5 na avaliação do poder redutor.

##### Atividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada utilizando uma Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) seguindo o método descrito por Hatano em 1988. A mistura da reação, em cada um dos 96 poços, consistiu nas diferentes soluções dos extratos (30 µL) às quais se adicionou uma solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro (Pinela, 2012). A redução do radical de DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (RSA) foi calculada como percentagem de descoloração da solução de DPPH, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_S)/A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

onde  $A_S$  é a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato que leva a 50% da atividade captadora de radicais (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico de percentagem RSA em função da concentração de extrato. Utilizou-se o trolox como padrão (Fernandes, 2010).

### Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente seguindo o método de Oyaizu em 1986 (Pinela, 2012). As diferentes concentrações de extrato (0,5 mL) foram misturadas com o tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) com a adição de ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1% w/v, 0,16 mL), medindo-se a absorvância a 690 nm. A concentração de extrato que fornece 0,5 de absorvância (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Utilizou-se o trolox como padrão (Fernandes, 2010).

### Inibição da descoloração do β-caroteno

Esta metodologia foi realizada seguindo o método descrito por Mi-Yae em 2003 (Pinela, 2012). Preparou-se uma solução por dissolução de β-caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40°C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) e agitou-se vigorosamente. Transferiu-se uma alíquota (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados a 50°C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo, mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero. A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Descoloração} = [(A_{470} \text{ após } 2\text{h} / A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$$

onde ( $A_{470}$  após 2h) é a absorvância do β-caroteno após 2h de ensaio e ( $A_{470}$  inicial) é a absorvância inicial. A concentração de extrato que leva a 50% de atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração de extrato. Utilizou-se o trolox como padrão (Fernandes, 2010).

### Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Esta metodologia foi baseada nos trabalhos descritos por Ohkawa em 1979 e Bird & Draper em 1984 (Pinela, 2012). Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*) com cerca de 150 kg de peso, dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL), FeSO<sub>4</sub> (10 µM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37°C durante 1h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80°C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min para remoção de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (% Inibição) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = [(A - B)/A] \times 100\%$$

onde A era a absorvância do controlo e B era a absorvância da solução com o extrato. A concentração de extrato que leva a 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Utilizou-se o trolox como padrão (Fernandes, 2010).

#### 3.5.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória das amostras de veneno de abelha

As amostras de VA foram dissolvidas em água a 4 mg/mL e, em seguida, foram submetidas a diluições consecutivas de 4 a 0,0325 mg/mL. A linha celular de macrófagos de rato RAW264,7 foi cultivada em meio DMEM suplementado com soro fetal de bovino a 10% inativado pelo calor e glutamina a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>, em ar humidificado. Para cada análise, as células foram desprendidas com ajuda de um raspador de células. A densidade das células foi 5 × 10<sup>5</sup> células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 1%, de acordo com os testes de exclusão com o corante azul de tripano. As células foram colocadas em placas de 96 poços, contendo assim cada poço 150'000 células e deixou-se a placa durante uma noite dentro da câmara de incubação. Em seguida, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de cada uma das amostras durante 1h. A

dexametasona (50  $\mu\text{M}$ ) foi usada como controlo positivo na experiência. O passo seguinte foi a estimulação com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 18h. Também foi avaliado o efeito das amostras testadas na ausência de LPS, de modo a observar se elas induziam mudanças nos níveis de NO basais. No controlo negativo foi adicionado LPS. Todas as amostras e LPS foram dissolvidas em DMEM suplementado. Para determinar a concentração de NO, foi utilizado um *kit* de reagentes de Griess que continha sulfanilamida, di-hidroclorato de N-(1-naftil)etilenediamina (NED) e uma solução nítrica. Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da cultura de células para uma placa em duplicado, misturando-lhe a sulfanilamida e a solução de NED, respetivamente, e deixando repousar 5-10 minutos cada uma, à temperatura ambiente. A produção de nitrito foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm, no leitor de placas acima referido, e foi comparada com a curva de calibração do padrão. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da produção de NO em comparação com o controlo negativo (100%) e os valores de  $\text{EC}_{50}$  (concentração da amostra que providencia 50% da inibição da produção de NO), também foram estimados.

### 3.5.3. Avaliação da citotoxicidade das amostras de veneno e pão de abelha

Os extratos de PA foram dissolvidos em água a 8  $\text{mg}/\text{mL}$  e, em seguida, submetidos a outras diluições 400-1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As amostras de VA foram dissolvidas em água a 4  $\text{mg}/\text{mL}$ , sendo de seguida submetidas a sucessivas diluições 4-0,0625  $\text{mg}/\text{mL}$ .

Foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma do pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas como uma cultura de células aderentes em meio RPMI-1460, que continha 10% de FBS e 2 mM de glutamina inativada por calor a 37°C, numa incubadora com ar humidificado, contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Cada linha celular foi plaqueada a uma densidade adequada ( $7,5 \times 10^3$  células/poço para as linhas celulares MCF-7 e NCI-H460 ou  $1,0 \times 10^4$  células/poço para as linhas celulares HeLa e HepG2) em placas de 96 poços. O ensaio da sulforodamina B foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Barros et al. (2013). Neste teste, adicionou-se a cada poço TCA frio (10%; 100  $\mu\text{L}$ ), incubando-se de seguida durante 60 min a 4°C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada durante 30 min à temperatura

ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µL, pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (referido anteriormente).

Para a avaliação da citotoxicidade em células não tumorais, foi preparada uma cultura de células a partir de fígado de porco recém-colhido e obtido a partir de um matadouro local, de acordo com o procedimento descrito por Abreu et al. (2011), sendo denominada por PLP2. Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com FBS (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o teste SRB descrito anteriormente.

A elipticina foi usada como controlo positivo. Os resultados das amostras de PA foram expressos em valores de GI<sub>25</sub> (concentração que inibe 25% do crescimento celular). No caso das amostras de VA, os valores foram expressos em GI<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular.

### **3.6. Análise estatística**

Para cada um dos produtos apícolas foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios ± desvio padrão (DP). As diferenças entre as amostras foram analisadas usando a análise de variância (ANOVA), seguida por diferenças significativas do teste de Tukey post hoc com  $\alpha=0,05$ , juntamente com a análise estatística de Welch. A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS v. 22,0.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Composição fenólica e citotoxicidade das amostras de pão de abelha

#### 4.1.1. Composição fenólica das amostras de pão de abelha

O perfil cromatográfico da amostra PA1 foi analisado a 370 nm e pode ser observado na **Figura 17**; as características dos picos obtidos, a sua identificação experimental e a quantificação de todas as amostras estão representadas na **Tabela 1**. Os principais compostos fenólicos encontrados no PA são derivados de flavonoides, principalmente quercetina, canferol, miricetina, isoramnetina e derivados glucosídicos de herbacetina. A composição fenólica do PA tem sido pouco estudada, tendo sido apenas descrita por alguns autores (Isidorov et al., 2009; Markiewicz-Zukowska et al., 2013; Tavdidishvili et al., 2014), que utilizaram diferentes abordagens analíticas. Tavdidishvili et al. (2014) utilizaram um sistema de HPLC-UV-vis para analisar amostras de PA Georgianas, descrevendo a presença de três flavonoides nomeadamente, naringina, rutina e quercetina. Isidorov et al. (2009), utilizaram GC-MS e identificaram quatro ácidos fenólicos (ácidos 4-hidroxibenzoico, *p*-cumárico, ferúlico e cafeico) e seis flavonoides (crisina, naringenina, canferol, isoramnetina, apigenina e quercetina), enquanto Markiewicz-Zukowska et al. (2013), igualmente por GC-MS, registraram a presença de apenas dois flavonoides, canferol e apigenina.

Nas nossas amostras, foram detetados 32 flavonoides diferentes (**Tabela 1**). Miricetina-3-*O*-glucósido (pico 7), quercetina-3-*O*-rutinósido (pico 10), canferol-3-*O*-rutinósido (pico 18), quercetina 3-*O*-glucósido (pico 19), isoramnetina-3-*O*-rutinósido (pico 25) e isoramnetina-3-*O*-glucósido (pico 28), de acordo com o seu de tempo de retenção, a sua massa e as suas características de UV-vis por comparação com padrões comerciais. Entre eles, os picos 10,18 e 19 foram encontrados em todas as amostras estudadas, enquanto os compostos 7 (PA3), 25 (PA1) e 28 (PA1, PA3, PA5 e PAC) foram detetados apenas em algumas amostras de PA.

O pico 1 apresentou um ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  para  $m/z$  a 625, libertando um fragmento de  $MS^2$  para  $m/z$  a 317 ( $[M-H-308]^-$  perdendo um fragmento de desoxi-hexosil-hexósido), correspondendo à miricetina. A presença de quercetina, canferol e

isoramnetina 3-*O*-rutinósidos pode apontar para que o pico 1 seja um 3-*O*-rutinósido, propondo-se a identificação como miricetina-3-*O*-rutinósido. Este composto foi encontrado em quatro amostras de PA (PA1, PA3, PA5 e PAC).

Os picos 2, 4, 8, 9 e 26 foram identificados como derivados da quercetina, devido ao íão produto que se pode observar a  $m/z$  301 e pelo espectro UV ( $\lambda_{\text{max}}$  à volta dos 350-358 nm). Os picos 2 e 9 apresentam o mesmo íão pseudomolecular  $[M-H]^-$  para  $m/z$  a 771. O pico 2, revelou como alternativa ao fragmento  $MS^2$  a perda dos resíduos de hexosil ( $m/z$  a 609; -162 u) e de desoxi-hexosil-hexósido ( $m/z$  a 463; -308 u), indicando assim a localização de cada resíduo em posições diferentes da aglicona. No entanto, para o pico 9, observou-se apenas um fragmento de  $MS^2$  sugerindo que os três açúcares se ligavam entre si. Não existe informação sobre a identidade das frações de açúcares e da sua localização na aglicona, por isso, os compostos foram identificados como quercetina-*O*-hexosil-*O*-(desoxi-hexosil-hexósido) e quercetina-*O*-hexosil-desoxi-hexosil-hexósido, respetivamente. Contudo, nas amostras analisadas, foram identificados diferentes rutinósidos, incluindo a quercetin-3-*O*-rutinósido, o que pode sugerir uma identidade rutinose para o resíduo desoxi-hexosil-hexose presente no pico. As características de massa do pico 4 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  625) indicam que corresponde a um derivado de quercetina que produz dois resíduos de hexosilo. A observação dos fragmentos de  $MS^2$  a  $m/z$  463 (-162 u) e 301 (-162 u), também indicou a perda alternativa de cada um dos fragmentos de hexosilo, respetivamente, apontando para a sua localização em diferentes posições da aglicona. Assim, foi proposta a identificação deste composto como quercetina-*O*-hexosil-*O*-hexósido. Este composto representa a maioria dos flavonoides na amostra comercial (PAC) analisada e encontra-se presente em todas as amostras, à exceção da PA3.

Os picos 8 ( $[M-H]^-$  para  $m/z$  595) e 26 ( $[M-H]^-$  para  $m/z$  447) demonstraram um padrão de fragmentação semelhante ao do pico 9, apresentando apenas a libertação de um fragmento para  $m/z$  301, a partir das correspondentes perdas dos fragmentos de pentosil-hexósido (294 u) e desoxi-hexose (146 u), sendo assim, foi atribuída a identificação como quercetina-*O*-pentosil-hexósido e quercetina-*O*-desoxi-hexósido. Este último composto foi registado em todas as amostras, sendo o maior flavonoide encontrado nas amostras PA3 e PA5. Apesar da análise de MS não permitir uma conclusão acerca da natureza e da posição do açúcar de substituição, devido à sua elevada abundância nas amostras analisadas, o pico 26 pode especular-se como correspondendo à quercitina (isto é, quercetina-3-*O*-ramnósido), um flavonoide de presença generalizada em plantas.

Os picos 3, 12, 15, 27 e 30 foram identificados como glucósidos de canferol com base nos seus espectros de UV ( $\lambda_{\text{max}}$  à volta de 348 nm) e produção de um fragmento de  $\text{MS}^2$  para  $m/z$  285. De modo semelhante, os picos 5, 16, 17, 20, 21, e 31 foram identificados como isoramnetina glucósido ( $\lambda_{\text{max}}$  à volta de 356 nm, fragmento de  $\text{MS}^2$  para  $m/z$  315). A tentativa de identificação destes compostos foi atribuída com base nos seus iões pseudomoleculares, usando um raciocínio semelhante ao que foi seguido para os derivados de quercetina. Assim os picos 3 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  755) e 5 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  785) podem corresponder a canferol-*O*-hexosil-*O*-(dioxi-hexosil-hexósido) e isoramnetina-*O*-hexosil-*O*-(dioxi-hexosil-hexósido), enquanto que os picos 15 e 17, com os mesmos iões pseudomoleculares que 3 e 5, devem corresponder a canferol-*O*-hexosil-dioxi-hexosil-hexósido (pico 15) e isoramnetina-*O*-hexosil-dioxi-hexosil-hexósido (pico 17). Tal como assumido para os derivados da quercetina, a identificação positiva do canferol e da isoramnetina 3-*O*-rutinósido permite especular que os picos 3 e 5 correspondem a canferol-*O*-hexosil-*O*-rutinósido e isoramnetina-*O*-hexosil-*O*-rutinósido, respetivamente. O composto 5 foi o flavonoide maioritário na amostra PA1 e o composto 15 nas amostras PA2 e PA4. Os picos 12 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  609), 27 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  563) e 30 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  431) poderiam ser assumidos como canferol-*O*-di-hexósido, canferol-*O*-pentosil-dioxi-hexósido e canferol-*O*-dioxi-hexósido, respetivamente. Este último poderia ser canferol-3-*O*-ramnósido, com base em considerações idênticas às que foram feitas para o pico 26.

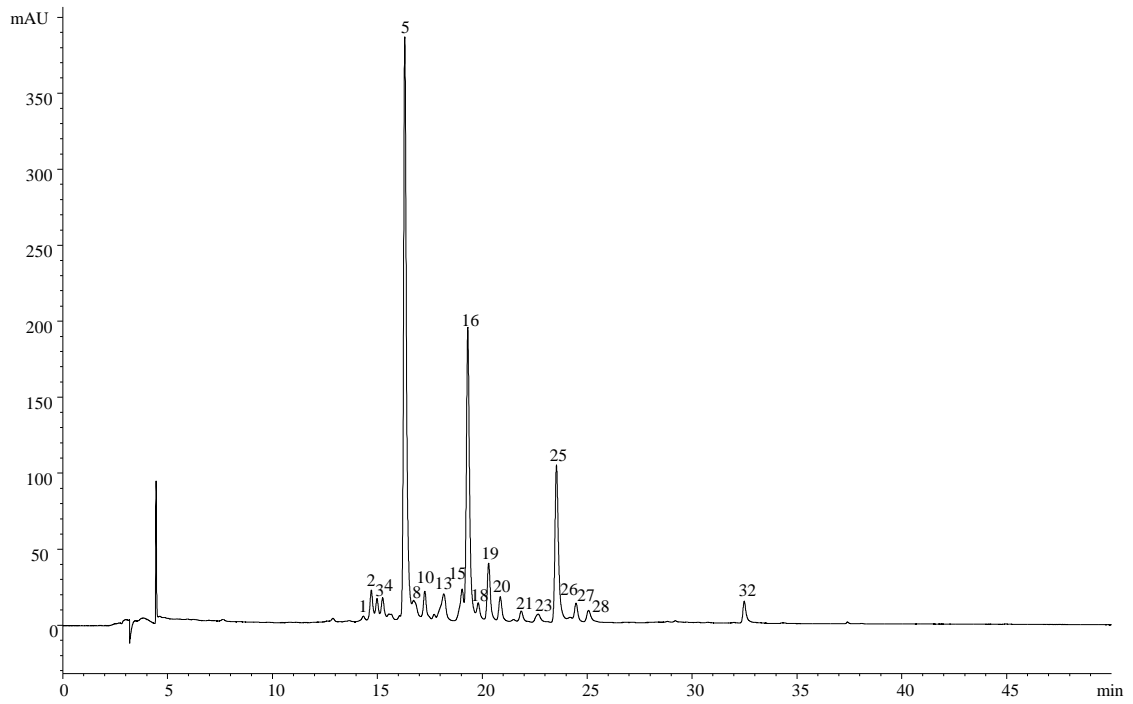
Os picos 16, 20 e 21, principalmente identificados na amostra PA1, demonstraram o mesmo ião pseudomolecular ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  609) indicando que podem corresponder a diferentes isómeros da isoramnetina-*O*-pentosil-hexósido. O pico 31 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  461), tendo também -146 u (perde um fragmento de dioxi-hexosilo) pode especular-se como correspondendo a um isoramnetina-*O*-dioxi-hexósido, possivelmente isoramnetina-3-*O*-ramnósido.

Os picos 22 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  635) e 32 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  519) possuem uma massa molecular 42 u mais elevada que os picos 18 e 28, apontando para a existência de um resíduo adicional de acetilo, sendo assim tentativamente identificado como acetilo de canferol-*O*-dioxi-hexosil-hexósido e acetilo de isoramnetina-*O*-hexósido, respetivamente. Do mesmo modo, o pico 29 ( $[\text{M-H}]^-$  para  $m/z$  489) foi apontado como acetilo de canferol-*O*-hexósido.

Os picos 6, 11, 13, 14 e 23 foram identificados como, possivelmente, glucósidos de metil-herbacetrina, com base nos seus espectros de UV e na produção de dois fragmentos de  $MS^2$  a  $m/z$  315 e 300. Esta atribuição foi suportada pela identificação prévia de compostos semelhantes em amostras de pólen (Campos et al., 1997; Markham & Campos, 1996; Markham et al., 1997). A identificação dos compostos foi realizada com base nos seus iões pseudomoleculares, como metil-herbacetrina-*O*-dioxi-hexosil-hexósido (pico 13), metil-herbacetrina-*O*-hexósido (pico 23), metil-herbacetrina-*O*-hexosil-dioxi-hexosil-hexósido (pico 11) e dois isómeros de metil-herbacetrina-*O*-di-hexósido (picos 6 e 14). Os picos 13 e 23, podemos especular que correspondem, respetivamente, a metil-herbacetrina-3-*O*-rutonósido e metil-herbacetrina-3-*O*-glucósido, tendo em consideração a presença nas amostras de glucósidos equivalentes derivados de outros flavonoides. Com exceção do pico 11, que foi apenas encontrado na amostra PA9, os restantes derivados de metil-herbacetrina foram detetados na maior parte das amostras analisadas.

Por fim, o pico 24 ( $[M-H]^-$  para  $m/z$  477), apenas detetado na amostra PA3, apresenta um padrão de fragmentação similar aos derivados de metil-herbacetrina, libertando neste caso dois fragmentos  $MS^2$  a  $m/z$  331 e 315, e foi tentativamente identificado como um derivado de metilmiricetina, possivelmente a laricitrina (isto é, 3'-*O*-metilmiricetina). De acordo com o seu ião pseudomolecular seria um laricitrina-*O*-dioxi-hexósido, e também se pode especular que corresponde à laricitrina-*O*-dioxi-hexósido devido à deteção de outros ramnósidos na amostra (picos 26 e 30).

No total, foram identificados trinta e dois compostos nas seis amostras de pão de abelha, sendo as amostras PA1 (**Figura 17**) e PA3 as que apresentaram o maior teor e a maior diversidade de compostos identificados (19 compostos). Pelo que conhecemos da revisão da literatura, este foi o primeiro estudo detalhado sobre a presença de derivados glucosídicos de flavonoides em pão de abelha.



**Figura 17.** Perfil individual da composição fenólica na amostra PA1, registrado a 370 nm.

**Tabela 1:** Tempo de retenção (Tr), comprimento de onda máximo com absorção na zona do visível ( $\lambda_{\max}$ ), dados do espectro de massas, identificação e quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de pão de abelha (PA).

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Íon Molecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Proposta de identificação	Quantificação (µg/g de extrato)					
						PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PAC
1	14,3	358	625	317(100)	Miricetina-3- <i>O</i> -rutinósido	41±3	nd	322±7	nd	38±4	118±4
2	14,7	350	771	609(100),463(9), 301(23)	Quercetina- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -rutinósido	156±8	nd	nd	nd	nd	nd
3	14,9	346	755	593(100),447(21), 285(34)	Canferol- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -rutinósido	69±1	nd	nd	nd	nd	nd
4	15,3	350	625	463(100),301(48)	Quercetina- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -hexósido	129±5	211±6	nd	127±4	74±3	1580±31
5	16,3	350	785	623(100),477(16), 315(30)	Isoramnetina- <i>O</i> -hexosil- <i>O</i> -rutinósido	2615±54	nd	nd	nd	nd	nd
6	16,3	350	639	315(18),300(21)	Metil-herbacetrina- <i>O</i> -di-hexósido	nd	622±25	70±3	460±3	192±1	nd
7	16,5	354	479	317(100)	Miricetina-3- <i>O</i> -glucósido	nd	nd	36±2	nd	nd	nd
8	16,7	358	595	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido	100±5	nd	nd	nd	nd	139±1
9	16,8	356	771	301(100)	Quercetina- <i>O</i> -hexosil-rutinósido	nd	314±6	106±9	367±1	nd	nd

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Ião Molecular [M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> ( <i>m/z</i> )	Proposta de identificação	Quantificação (µg/g de extrato)					
						PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PAC
10	17,3	358	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	158±3	88±5	312±5	105±6	91±2	377±7
11	17,4	350	785	315(32),300(20)	Metil-herbacetrina- <i>O</i> -hexosil-rutinósido	nd	nd	nd	nd	217±1	nd
12	17,7	348	609	285(100)	Canferol- <i>O</i> -di-hexósido	nd	91±6	246±8	83±4	108±1	1167±30
13	18,2	352	623	315(36),300(22)	Metil-herbacetrina-3- <i>O</i> -rutinósido	186±25	nd	71±1	435±5	225±7	nd
14	18,4	350	639	315(29),300(14)	Metil-herbacetrina- <i>O</i> -di-hexósido	nd	nd	39±3	164±13	268±11	105±5
15	19,0	350	755	285(100)	Canferol- <i>O</i> -hexosil-rutinósido	212±10	3597±69	403±0	3755±46	nd	130±2
16	19,3	356	609	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido	1448±37	nd	nd	nd	nd	nd
17	19,6	354	785	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -hexosil-rutinósido	nd	103±1	nd	43±3	nd	nd
18	19,8	348	593	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -rutinósido	62±7	94±21	355±10	56±4	815±16	1627±32
19	20,3	356	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	248±5	52±8	236±1	53±3	177±3	72±1
20	20,9	354	609	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido	94±8	nd	nd	nd	nd	nd
21	21,9	356	609	315(100)	Isoramnetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido	30±2	nd	47±3	nd	nd	nd
22	22,6	350	635	285(100)	Acetilcanferol- <i>O</i> -desoxi-hexosil-hexósido	nd	nd	20±1	nd	11±1	nd

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Ião Molecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Proposta de identificação	Quantificação (µg/g de extrato)					
						PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PAC
23	22,7	346	477	315(50),300(33)	Metil-herbacetrina-3- <i>O</i> -glucósido	tr	32±4	53±6	224±10	138±17	nd
24	23,2	356	477	331(19),315(32)	Laricitrina-3- <i>O</i> -ramnósido	nd	nd	125±5	nd	nd	nd
25	23,5	356	623	315(100)	Isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinósido	836±35	nd	nd	nd	nd	nd
26	24,2	350	447	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido	tr	280±22	3029±72	168±19	2001±17	190±7
27	24,5	348	563	285(100)	Canferol- <i>O</i> -pentosil-desoxi-hexósido	82±6	nd	nd	nd	nd	nd
28	25,1	356	477	315(100)	Isoramnetina 3- <i>O</i> -glucósido	140±1	nd	199±1	nd	118±4	64±2
29	26,7	350	489	285(100)	Acetilcanferol- <i>O</i> -hexósido	nd	nd	nd	nd	nd	22±3
30	28,8	346	431	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -ramnósido	nd	nd	141±12	nd	29±10	nd
31	29,9	350	461	315(100)	Isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnósido	nd	73±10	670±44	nd	232±14	nd
32	32,5	356	519	315(100)	Acetilisoramnetina- <i>O</i> -hexósido	197±12	nd	nd	nd	nd	nd
Total de flavonoides						6802±204 <sup>a</sup>	5557±179 <sup>d</sup>	6480±128 <sup>b</sup>	6040±76 <sup>c</sup>	4733±106 <sup>e</sup>	5593±118 <sup>d</sup>

nd- não detetado; tr- resíduos. Na linha do total de flavonoides, letras diferentes significam diferenças estatisticamente entre amostras (p <0,05).

#### 4.1.2. Citotoxicidade das amostras de pão de abelha

Os resultados de citotoxicidade das amostras de pão de abelha estão apresentados na **Tabela 2**. Todas as amostras demonstraram alguma toxicidade contra linhas celulares tumorais humanas. No entanto, nas concentrações em que foram testadas, as amostras inibiram menos de 50% do crescimento das células tumorais, tendo sido os resultados expressos em termos dos valores de  $GI_{25}$  (concentração de amostra responsável por 25% da inibição do crescimento celular). A amostra PAC foi seletiva para a linha celular HeLa, enquanto a PA3 inibiu o crescimento de todas as linhas celulares tumorais humanas testadas, sendo a única capaz de inibir o crescimento da linha celular HepG2. Para além dos dados mencionados anteriormente, a amostra PA1 e, principalmente, PA2, foram também ativas contra a linha celular tumoral MCF-7, enquanto as amostras PA4 e PA5 foram ativas contra a linha celular NCI-H460, e as amostras PA1, PA5 e, principalmente, PA4 foram ativas contra a linha celular HeLa. Realça-se que nenhuma das amostras de PA demonstrou toxicidade para as células normais (cultura primária de células não tumorais de fígado de porco), pois os valores de  $GI_{25}$  desta cultura primária foram sempre superiores a 400  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 2.** Atividade citotóxica (valores de GI<sub>25</sub>, µg/mL) das amostras de pão de abelha.

	Linhas celulares tumorais humanas				Células normais de fígado de porco
	MCF-7	NCI-H460	HeLa	HepG2	PLP2
<b>PA1</b>	186±6 <sup>a</sup>	>400	345±13 <sup>a</sup>	>400	>400
<b>PA2</b>	84±3 <sup>c</sup>	>400	>400	>400	>400
<b>PA3</b>	164±4 <sup>b</sup>	253±10 <sup>a</sup>	225±12 <sup>bc</sup>	67±1	>400
<b>PA4</b>	>400	85±5 <sup>b</sup>	209±21 <sup>c</sup>	>400	>400
<b>PA5</b>	>400	68±8 <sup>b</sup>	276±18 <sup>b</sup>	>400	>400
<b>PAC</b>	>400	>400	366±7 <sup>a</sup>	>400	>400

Valores de GI<sub>25</sub>: concentração de amostra que permite a inibição de 25% do crescimento em linhas celulares tumorais humanas ou na cultura primária de células de fígado de porco (PLP2). Valores de GI<sub>25</sub> da Elipticina: 0,45 ± 0,02 µg/mL (MCF-7), 0,74 ± 0,01 µg/mL (NCI-H460), 0,55 ± 0,03 µg/mL (HeLa), 1,61 ± 0,07 µg/mL (HepG2) e 1,06 ± 0,02 µg/ml (PLP2).

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre amostras (p <0,05).

## 4.2. Composição peptídica e bioatividade das amostras de veneno de abelha

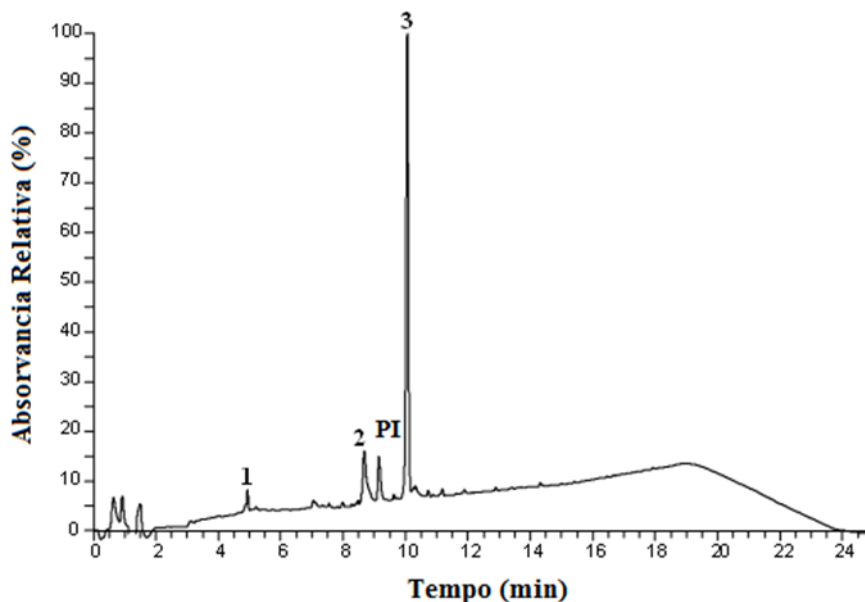
### 4.2.1. Caracterização química das amostras de veneno de abelha

Os compostos químicos identificados nas cinco amostras de VA estudadas são apresentados na **Tabela 3**. A melitina foi o composto mais abundante em todas as amostras, enquanto a apamina foi o composto encontrado em concentração mais baixa (**Tabela 3, Figura 18**). Na verdade, a melitina é descrita por diversos autores como o principal constituinte do VA (Cho et al., 2013; Park et al., 2012). A amostra VA2 foi a que apresentou níveis mais elevados de melitina ( $86,72 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$ ), de fosfolipase A2 ( $11,36 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ ) e de apamina ( $1,80 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ), seguida da amostra VA4. Pelo contrário, as amostras VA5 e, principalmente, VA1 apresentaram as menores concentrações de todos os compostos. Em relação a dados descritos na literatura, a composição do VA inclui sete categorias de moléculas. No entanto, no presente trabalho só se identificou quimicamente a fosfolipase A2 (categoria das enzimas, que se encontra presente no VA 10-12%), a melitina e a apamina (ambas pertencentes à categoria das proteínas e péptidos, que se encontram presentes no VA 40-50% e 1-3%, respetivamente) (Gajski & Garaj-Vrhovac, 2013). Tendo em conta que a amostra VA2 foi a que apresentou os níveis mais elevados em relação os três compostos, os seus correspondentes em percentagem na amostra são 86,72% de melitina, 11,36% de fosfolipase A2 e 1,80% de apamina.

**Tabela 3.** Caracterização química das amostras de veneno de abelha (VA) por LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>.

	VA 1	VA 2	VA 3	VA 4	VA 5
Apamina (µg/mL)	0,94±0,01 <sup>d</sup>	1,80±0,03 <sup>ab</sup>	1,61±0,17 <sup>b</sup>	1,95±0,02 <sup>a</sup>	1,25±0,04 <sup>c</sup>
Fosfolipase A2 (µg/mL)	4,98±0,01 <sup>d</sup>	11,36±0,18 <sup>a</sup>	9,02±0,62 <sup>c</sup>	10,08±0,34 <sup>b</sup>	5,98±0,11 <sup>d</sup>
Melitina (µg/mL)	35,64±0,09 <sup>e</sup>	86,72±0,50 <sup>a</sup>	70,58±3,99 <sup>c</sup>	80,74±0,34 <sup>b</sup>	52,20±0,66 <sup>d</sup>

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre amostras ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18.** Representação do perfil cromatográfico a 220 nm de veneno de *A. mellifera iberiensis*: 1- apamina; 2- fosfolipase A2; PI- padrão interno (citocromo C, 25 µg/mL); 3- melitina.

#### 4.2.2. Atividade antioxidante e anti-inflamatória das amostras de veneno de abelha

Todas as amostras revelaram atividade antioxidante e anti-inflamatória e, aparentemente, não existe relação com nenhum dos componentes individuais identificados e quantificados nessas amostras. A amostra VA5 revelou ter a maior atividade captadora de radicais livres DPPH, o maior poder redutor, bem como a maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica e da produção de NO (óxido nítrico) (**Tabela 4**). Entre as amostras de VA estudadas, a amostra VA5 foi a única a ser recolhida num apiário diferente (Aveleda). Deve ainda realçar-se que a atividade anti-inflamatória de todas as amostras de VA (valores de  $EC_{50} < 8 \mu\text{g/mL}$ ) foi mais elevada do que a observada para o controlo positivo, que foi a dexametasona (valores de  $EC_{50} = 15,5 \pm 1,96 \mu\text{g/mL}$ ; **Tabela 4**).

A falta de correlação entre a concentração de melitina, fosfolipase A2 e apamina, e os resultados *in vitro* das atividades antioxidante e anti-inflamatória, evidencia que há concentrações específicas em que estes compostos se tornam mais ativos. As concentrações mais elevadas ou mais baixas, as atividades anteriormente mencionadas diminuem, provavelmente, devido a efeitos antagonistas. Curiosamente, ocorreu um efeito pró-inflamatório nas amostras VA3, VA4 e VA5 que pode ser observado nas concentrações mais baixas testadas (aumento dos níveis de NO em relação ao controlo negativo:  $> 100\%$  a  $1 \mu\text{g/mL}$ ; **Figura 19**). Pelo que pudemos consultar, este tipo de efeito não foi previamente descrito em nenhum trabalho, estando apenas documentada a inibição da formação de NO em células RAW 264,7 para amostras de VA na gama de  $0,1\text{-}2 \mu\text{g/mL}$  (Lee et al., 2009),  $0,5\text{-}2 \mu\text{g/mL}$  (Moon et al., 2007),  $0,5\text{-}5 \mu\text{g/mL}$  (Park et al., 2007) e  $1\text{-}20 \mu\text{g/mL}$  (Jang et al., 2005), tal como no presente estudo (concentrações testadas:  $1\text{-}15 \mu\text{g/mL}$ ). Foram também desenvolvidos testes *in vivo* com ratos Lewis que suportam os efeitos anti-inflamatórios de amostras de VA (Amin & Abdel-Raheem, 2014; Chang & Bliven, 1979). Em relação aos efeitos antioxidantes de amostras de VA, têm sido descritos resultados relacionados com a sua capacidade para inibir o processo de peroxidação lipídica (Rekka et al., 1990) e para aumentar a superóxido dismutase (SOD) (Han et al., 2010).

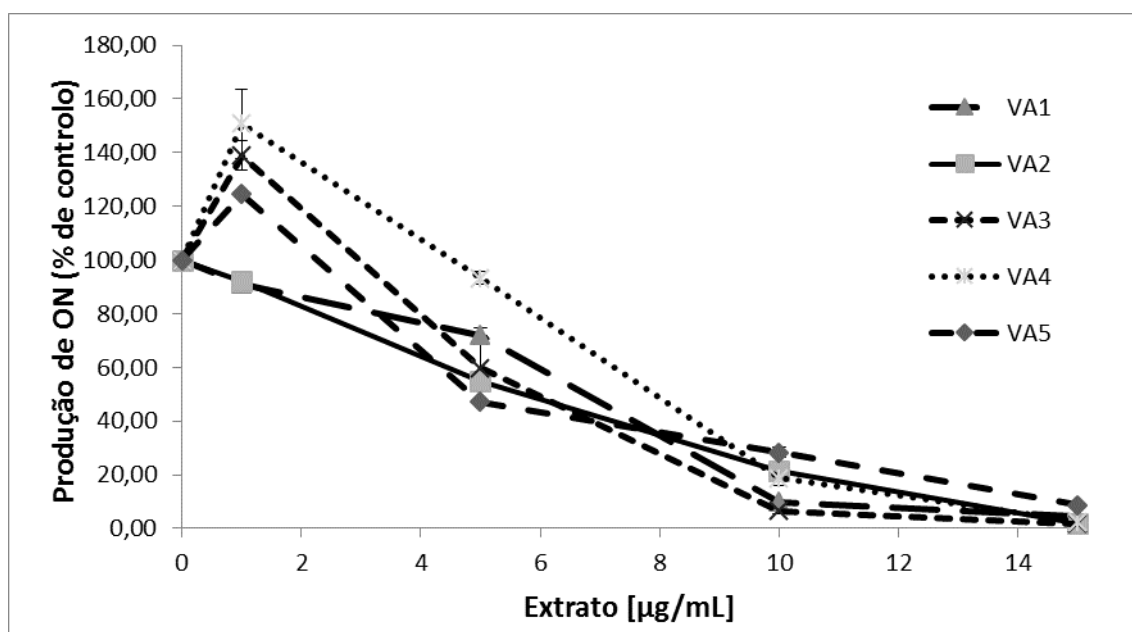
**Tabela 4.** Atividade antioxidante e anti-inflamatória, *in vitro*, de amostras de veneno de abelha.

	VA1	VA2	VA3	VA4	VA5	Valores dos padrões
Atividade antioxidante (valores de EC <sub>50</sub> , µg/mL)						
Atividade captadora de radicais DPPH	487±7 <sup>b</sup>	451±6 <sup>c</sup>	491±1 <sup>b</sup>	512±16 <sup>a</sup>	346±4 <sup>d</sup>	42
Poder redutor	326±16 <sup>a</sup>	238±10 <sup>d</sup>	306±1 <sup>b</sup>	291±2 <sup>c</sup>	225±5 <sup>e</sup>	41
Inibição da descoloração do β-caroteno	710±10 <sup>b</sup>	545±9 <sup>d</sup>	826±9 <sup>a</sup>	666±23 <sup>c</sup>	435±15 <sup>e</sup>	18
Inibição de TBARS	1,45±0,08 <sup>c</sup>	1,22±0,05 <sup>d</sup>	2,38±0,20 <sup>a</sup>	1,70±0,03 <sup>b</sup>	1,07±0,10 <sup>e</sup>	23
Atividade anti-inflamatória (valores de EC <sub>50</sub> , µg/mL)						
Produção de NO	6,77±0,13 <sup>b</sup>	5,76±0,06 <sup>c</sup>	5,81±0,94 <sup>c</sup>	7,91±0,17 <sup>a</sup>	4,85±0,02 <sup>d</sup>	15,5±1,96

Valores de EC<sub>50</sub> para a atividade antioxidante: concentração da amostra que providencia 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no poder redutor. Para a qual utilizamos como padrão o Trolox.

Valores de EC<sub>50</sub> para a atividade anti-inflamatória: concentração da amostra que providencia 50% da inibição da produção de NO em relação ao controlo negativo (100 %). Para a qual se utilizou como padrão a dexametasona.

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre amostras (p < 0,05).



**Figura 19.** Produção de óxido nítrico em função da concentração de veneno de *A. mellifera iberiensis* (VA 1-5). A produção de óxido nítrico é proporcional ao processo inflamatório; uma diminuição da concentração de óxido nítrico corresponde a uma potencial atividade anti-inflamatória.

#### 4.2.3. Citotoxicidade das amostras de veneno de abelha

As amostras de VA estudadas demonstraram citotoxicidade semelhante para todas as linhas celulares tumorais testadas: carcinoma de mama (MCF-7), pulmão (NCI-H460), cervical (HeLa) e hepatocelular (HepG2) (**Tabela 5**). As linhas celulares MCF-7 e HeLa foram as mais suscetíveis à ação das amostras de VA, tendo em conta os valores de  $GI_{50}$  obtidos ( $< 5 \mu\text{g/mL}$ ). No caso da linha celular HeLa, o mesmo valor de  $GI_{50}$  foi obtido por Orsolíć (2009) para VA proveniente da Eslovénia ( $3 \mu\text{g/mL}$ ). Por outro lado, amostras comerciais de VA revelaram menor atividade contra a linha celular HeLa ( $GI_{50} = 9,7 \mu\text{g/mL}$ , Kim et al., 2015) e  $\sim 20\%$  da viabilidade celular para  $60 \mu\text{g/mL}$ , (Gajski et al., 2014). Os efeitos antitumorais das amostras de VA também foram demonstradas em experiências *in vivo* (Liu et al., 2002; Orsolíć et al., 2003).

Deve realçar-se a existência de toxicidade das amostras de VA em relação às células de fígado não tumorais (PLP2; **Tabela 5**) e que apenas para as NCI-H460 as concentrações de  $GI_{50}$  obtidas (valores entre  $16,00 \pm 2,34$  e  $19,68 \pm 1,80 \mu\text{g/mL}$ ) foram superiores às observadas nas PLP2 (valores de  $GI_{50}$  entre  $10,11 \pm 0,91$  e  $15,03 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$ ). Portanto, as amostras estudadas parecem não ser adequadas para o tratamento do carcinoma de mama, hepatocelular e cervical, e em relação ao carcinoma do pulmão, estas devem ser aplicadas a baixo da concentração tóxica para as células não tumorais. A toxicidade do VA para células não tumorais não é novidade, tendo sido já descrita em linfócitos por diferentes autores (Gajski & Garaj-Vrhovac, 2008; Lee et al., 2007; Garaj-Vrhovac & Gajski, 2009).

**Tabela 5.** Atividade citotóxica *in vitro* das amostras de veneno de abelha.

	VA 1	VA 2	VA 3	VA 4	VA 5	Valores de GI <sub>50</sub> da elipticina
Para linhas celulares tumorais (valores de GI <sub>50</sub> , µg/mL)						
<b>MCF-7</b>						
(carcinoma de mama)	4,16±0,49 <sup>a</sup>	4,44±0,43 <sup>a</sup>	4,02±0,38 <sup>a</sup>	4,51±0,21 <sup>a</sup>	4,49±0,42 <sup>a</sup>	1,21
<b>NCI-H460</b>						
(carcinoma de pulmão)	16,00±2,34 <sup>a</sup>	17,68±0,53 <sup>a</sup>	18,18±0,86 <sup>a</sup>	19,68±1,80 <sup>a</sup>	17,98±0,86 <sup>a</sup>	1,03
<b>HeLa</b>						
(carcinoma cervical)	4,54±0,22 <sup>ab</sup>	2,83±0,41 <sup>c</sup>	4,41±0,01 <sup>ab</sup>	3,51±0,81 <sup>bc</sup>	4,80±0,15 <sup>a</sup>	0,91
<b>HepG2</b>						
(carcinoma hepatocelular)	10,6±1,89 <sup>a</sup>	12,19±1,40 <sup>a</sup>	5,43±0,08 <sup>c</sup>	6,55±0,11 <sup>bc</sup>	9,85±0,36 <sup>ab</sup>	1,10
Para células de fígado não tumorais (valores de GI <sub>50</sub> , µg/mL)						
<b>PLP2</b>						
(cultura primária de células de fígado de porco)	15,03±0,28 <sup>a</sup>	13,86±0,10 <sup>a</sup>	10,11±0,91 <sup>b</sup>	12,94±1,21 <sup>ab</sup>	14,66±0,66 <sup>a</sup>	2,29

Valores de GI<sub>50</sub>: concentração de amostra para atingir 50% de inibição do crescimento em linhas celulares tumorais humanas ou na cultura primária de células de fígado (PLP2).

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre amostras ( $p < 0,05$ ).

## 5. Conclusão

Com a realização deste trabalho pretendeu-se efetuar um estudo de bioatividade e a caracterização química de dois produtos apícolas, sendo eles o pão de abelha (PA) e o veneno de abelha (VA), dois dos produtos apícolas menos estudados.

O pão de abelha é uma mistura fermentada de pólen, mel e secreções salivares das abelhas que sofre diversas alterações químicas, após ser armazenado no interior da colmeia. As abelhas obreiras usam o PA como alimento para as larvas e para que as abelhas jovens produzam geleia real. O PA é considerado por muitos autores como sendo o alimento mais completo da natureza, visto ser constituído por néctar, fonte de energia, e por pólen que nos fornece proteínas, lípidos, vitaminas e minerais. No presente trabalho, foram estudadas cinco amostras de PA recolhidas em colmeias de *Apis mellifera iberiensis* de diferentes apiários de Bragança, e uma amostra de PA comercial. Todas as amostras foram caracterizadas por HPLC-DAD-ESI/MS em termos de compostos fenólicos e testou-se a sua citotoxicidade em diferentes linhas celulares tumorais humanas (MCF-7, HeLa, NCI-H460 e HepG2), bem como em células de fígado de porco não tumorais (PLP2).

O veneno de abelha ou apitoxina é produzido na glândula de veneno das abelhas obreiras, sendo uma mistura complexa composta por pelo menos 18 compostos com atividade biológica descrita. Os compostos ativos do veneno de abelha incluem proteínas, péptidos, enzimas, assim como compostos não peptídicos, tais como aminas fisiologicamente ativas, aminoácidos, açúcares e compostos voláteis. Os principais compostos são a histamina, catecolaminas, poliaminas, melitina e fosfolipase A2, mas a melitina, o péptido desgranulador de mastócitos e a apamina são os componentes mais estudados do VA. No presente trabalho, analisaram-se quimicamente cinco amostras de VA recolhidas em colónias de *Apis mellifera iberiensis* em dois apiários do concelho de Bragança, avaliando-se também as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas.

Os principais compostos fenólicos encontrados no PA foram derivados de flavonoides, principalmente quercetina, canferol, miricetina, isoramnetina e derivados glucósidos de herbacetina. No total, foram identificados trinta e dois compostos nas seis amostras de PA, apresentando as amostras PA1 (19 compostos) e PA3 (19 compostos) o

teor mais elevado e uma maior diversidade de compostos identificados. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação ente os flavonoides presentes nas amostras estudadas e a sua baixa a moderada citotoxicidade. De qualquer modo, demonstrou-se o potencial bioativo do pão de abelha, com a caracterização das amostras em termos de flavonoides glucosilados (miricetina-3-*O*-rutinósido, quercetina-*O*-hexosil-*O*-(desoxi-hexosil-hexósido), canferol-*O*-di-hexósido, herbacetina-3-*O*-rutinósido, laricitrina-*O*-desoxi-hexósido e isoramnetina-3-*O*-rutinósido), contribuindo para o conhecimento das características químicas deste produto apícola menos estudado.

Os resultados obtidos para as amostras de VA evidenciam a existência de concentrações específicas em que os seus compostos são mais ativos (e.g., presentes na amostra VA5). As amostras de VA demonstraram citotoxicidade semelhante para todas as linhas tumorais testadas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), sendo a MCF-7 e a HeLa as mais suscetíveis. No entanto, estas amostras não parecem ser adequadas para o tratamento do carcinoma da mama, hepatocelular e cervical, porque nas concentrações ativas, as amostras também foram tóxicas para as células não tumorais (PLP2). Relativamente ao carcinoma do pulmão, o VA poderá ser utilizado abaixo da concentração tóxica para as células não tumorais.

Concluindo, em relação às amostras de pão de abelha, apesar da existência de literatura relacionada com propriedades antitumorais de diferentes compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, não foi possível estabelecer uma correlação positiva entre a concentração de flavonoides em cada amostra e a sua citotoxicidade. Por conseguinte, estas propriedades poderão ser atribuídas a flavonoides individuais específicos, às dinâmicas de sinergismo/antagonismo das amostras e, também, à presença de outros compostos bioativos, para além dos flavonoides. No entanto, este é o primeiro trabalho de caracterização exaustiva dos flavonoides glucosilados em amostras de PA, contribuindo assim para a caracterização química deste produto apícola ainda pouco estudado.

No que se refere ao veneno de abelha, apesar da identificação das moléculas peptídicas mais abundantes no VA (melitina, fosfolipase A2 e apamina), alguns outros componentes minoritários em conjunto com efeitos antagonistas/sinérgicos dos compostos em concentrações específicas, podem ser responsáveis pelas bioatividades observadas, contribuindo assim para os diferentes resultados obtidos nas amostras de VA estudadas. Este trabalho demonstrou o seu amplo potencial bioativo incluindo

propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas, sendo o primeiro trabalho realizado com amostras Portuguesas.

Para o futuro e continuidade deste trabalho será importante determinar os restantes componentes do VA, estudar os mecanismos de ação envolvidos nas bioatividades determinadas e desenvolver ensaios *in vivo* de avaliação da atividade anti-inflamatória e citotóxica para poder comparar com os resultados obtidos em cultura de células.

No âmbito deste trabalho foram preparadas:

#### Duas publicações em revistas científicas

- Filipa Sobral, Ricardo C. Calhelha, Lillian Barros, Montserrat Dueñas, Andreia Tomás, Maria João R.P. Queiroz, Celestino Santos-Buelga, Miguel Vilas-Boas, Isabel C.F.R. Ferreira. “Phenolic composition and antitumour activity of bee bread collected in Northeast Portugal”. A submeter.
- Filipa Sobral, Ricardo C. Calhelha, Soraia Falcão, Maria João R.P. Queiroz, Miguel Vilas-Boas, Isabel C.F.R. Ferreira. A submeter. “Chemical characterization and bioactive properties of bee venom collected in Northeast Portugal”. A submeter.

#### Uma publicação em ata

- Filipa Sobral, Ricardo C. Calhelha, Soraia Falcão, Miguel Vilas-Boas, Isabel C.F.R. Ferreira. “Caracterização química e propriedades bioativas de amostras de veneno de abelha obtidas no Nordeste de Portugal”, I Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias, a realizar a 2 e 3 de dezembro de 2015 em Bragança.

#### Duas apresentações em congressos

- Filipa Sobral, Lillian Barros, Ricardo C. Calhelha, Andreia Tomás, Montserrat Dueñas, Celestino Santos-Buelga, Miguel Vilas-Boas, Isabel C.F.R. Ferreira. “Composição fenólica e citotoxicidade de amostras de pão de abelha obtidas no Nordeste de Portugal”, III Encontro de Jovens Investigadores, Instituto Politécnico de Bragança, 11 a 13 de novembro de 2015, Bragança.

- Filipa Sobral, Ricardo C. Calhela, Soraia Falcão, Miguel Vilas-Boas, Isabel C.F.R. Ferreira. “Caracterização química e propriedades bioativas de amostras de veneno de abelha obtidas no Nordeste de Portugal”, I Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias, a realizar a 2 e 3 de dezembro de 2015 em Bragança.

## 6. Referências

- Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., Ahami, M. T. 2011. The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Res. J. of Microbiol.*, 6, 376-384.
- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., Chaves, R., Queiroz, M. J. R. 2011. Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno [3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: *In vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 5800-5806
- Akhmetova, R., Sibgatullin, J., Garmonov, S., Akhmetova, L. 2012. Technology for extraction of bee-bread from the honeycomb. *Procedia Engineering*, 42, 1822-1825.
- Al-Jaber, N. A., Awaad, A. S., Moses, J. E. 2011. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 293-307.
- Alizadehnohi, M., Nabiuni, M., Nazari, Z., Safaeinejad, Z., Irian, S. 2012. The synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on human ovarian cancer cell line A2780cp. *Journal of venom research*. 3, 22-27.
- Alves E. A., Guimarães A. C. R. – Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Capítulo 5- Cultivo Celular; 2010
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, 84, 551-562.
- Amin, M. A. & Abdel-Raheem, I. T. 2014. Accelerated wound healing and anti-inflammatory effects of physically cross linked polyvinyl alcohol–chitosan hydrogel containing honey bee venom in diabetic rats. *Arch.f Pharmacol Res.* 37, 1016-1031.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Araneda Durán, X., Quezada Mardones, I., Martínez Gutiérrez, M., Morales Ulloa, D. 2014. Polifenoles totales en pan de abeja (*Apis mellifera* L.) de colmenas de la Región de La Araucanía. *Idesia (Chile)*, 32, 107-111.

- Baek, Y. H., Huh, J. E., Lee, J. D., Choi D. O., Park, D. S. 2006. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Brain research*. 1073-1074, 305-310.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., Čeksterytė, V. 2007. Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Food Technol. Biotechnol.*, 45, 201-208.
- Banks, B. E. C., Dempsey, C. E., Vernon, C. A., Warner, J. A., Yamey, J. 1990. Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulation *in vivo*. *British J. Pharmacol.*, 99, 350-354.
- Barbarić, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M. B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Ž., Medić-Šarić, M. 2011. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J. Ethnopharmacol.*, 135, 772-778
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. 2013. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Functional Foods*. 5, 1732-1740.
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2009). Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum Vulgare* Mill from Portugal. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 2458-2464.
- Blanck, M. 2008. Fisiopatologia das Feridas. Capítulo 14. [www.ice-mac.org](http://www.ice-mac.org), acesso a 03/08/2015
- Borawska, M. H., Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S. K., Moskwa, J., Bartosiuk, E., Socha, K., Surazyński A., Kochanowicz J., Mariak, Z. 2014. The Interaction of Bee Products With Temozolomide in Human Diffuse Astrocytoma, Glioblastoma Multiforme and Astroglia Cell Lines. *Nutrition and cancer*, 66, 1247-1256.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K. 2013. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J. Ethnopharmacol.*, 146, 495-504.

- Burda, S. & Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779.
- Buttstedt, A., Moritz, R. A. F., Erler, S. 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the *yellow* gene family. *Biological Reviews*, 89, 255-269.
- Campos, M., Markham, K. R., Mitchell, K. A., Cunha, A. P. 1997. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem. Anal.*, 8, 181-185.
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apicultural Res. Bee World*, 47, 156-163.
- Carocho, M. & Ferreira, I. C. F. R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.*, 51, 15-25.
- Chang, Y.-H. & Bliven, M. L. 1979. Anti-arthritis effect of bee venom. *Agents and actions*. 9, 205-211.
- Cho, H.-J., Kang, J.-H., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Park, Y.-Y., Moon, Y.-S., Chung, I.-K., Chang, H.-W., Kim, C.-H., Choi, Y.-H., Kim, W.-J., Moon, S.-K., Chang, Y.-C. 2013. Comparative proteome analysis of Tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated human Vascular Smooth Muscle Cells in response to melittin. *Proteome science*. 11, 20.
- Choi, K. E., Hwang, C. J., Gu, S. M., Park, M. H., Kim, J. H., Park, J. H., Ahn Y. J., Kim J. Y., Song M. J., Song H. S., Han S.-B., Hong, J. T. 2014. Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. *Toxins*, 6, 2210-2228.
- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., Young, A. J. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 430, 37-48.
- Escrig, V., Ubeda, A., Ferrandiz, M. L., Darias, J., Sanchez, J. M., Alcaraz, M. J., Paya, M. 1997. Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 123-131.

- Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Kačániová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., Stričík, M. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *J. Environ. Sci. Health., Part B*, 48, 133-138.
- Ferguson, E. L. & Duncan, R. 2009. Dextrin-Phospholipase A2: Synthesis and Evaluation as a Bioresponsive Anticancer Conjugate. *Biomacromolecules*. 10, 1358-1364.
- Fernandes, Â. 2010. Propriedades nutricionais, nutracêuticas e antioxidantes de espécies silvestres condimentares utilizadas na gastronomia tradicional do nordeste transmontano
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C., Estevinho, L. M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.*, 114, 1438-1443.
- Ferreira, I. C. F. R., & Abreu, R. 2007. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 32-39.
- Gajski, G., Čimbora-Zovko, T., Rak, S., Rožman, M., Osmak, M., Garaj-Vrhovac, V. 2014. Combined antitumor effects of bee venom and cisplatin on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. *J. Appl. Toxicol.* 34, 1332-1341.
- Gajski, G., & Garaj-Vrhovac, V. 2008. Genotoxic potential of bee venom (*Apis mellifera*) on human peripheral blood lymphocytes in vitro using single cell gel electrophoresis assay. *J. Environ. Sci. Health., Part A*, 3, 1279-1287.
- Gajski, G., & Garaj-Vrhovac, V. 2013. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 697-705.
- Garaj-Vrhovac, V., & Gajski, G. 2009. Evaluation of the cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to a high concentration of bee venom *in vitro*. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, 60, 27-34.
- Gilliam, M., 1979. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10, 43-53.

- Giroud, B., Vauchez, A., Vulliet, E., Wiest, L., Buleté, A. 2013. Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1316, 53-61.
- Han, S. M., Lee, G. G., Park, K. K. 2012 <sup>(1)</sup>. Acute Dermal Toxicity Study of Bee Venom (*Apis mellifera* L.) in Rats. *Toxicol. Res.*, 28, 99-102.
- Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Oh, B. Y., Kim, B. S., Lee, W., Baek H. J., Kim S. T., Hwang S. J., Pak, S. C. 2010. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. *Poultry science*. 89, 2396-2400.
- Han, S. M., Lee, G. G., Park, K. K. 2012 <sup>(2)</sup>. Skin Sensitization Study of Bee Venom (*Apis mellifera* L.) in Guinea Pigs. *Toxicol. Res.*, 28, 1-4.
- Haro, A., López-Aliaga, I., Lisbona, F., Barrionuevo, M., Alférez, M. J. M., Campos, M. S. 2000. Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5715-5722.
- Hu, H., Chen, D., Li, Y., Zhang, X. 2006. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 83-89.
- Huh, J.-E., Kang, J. W., Nam, D., Baek, Y.-H., Choi, D.-Y., Park, D.-S., Lee, J.-D. 2012. Melittin suppresses VEGF-A-induced tumor growth by blocking VEGFR-2 and the COX-2-mediated MAPK signaling pathway. *J. Nat. Prod.*, 75, 1922-1929.
- Ip, S.-W., Chu, Y.-L., Yu, C.-S., Chen, P.-Y., Ho, H.-C., Yang, J.-S., Huang H.-Y., Chueh F.-S., Lai T.-Y., Chung, J.-G. 2012. Bee venom induces apoptosis through intracellular Ca<sup>2+</sup>-modulated intrinsic death pathway in human bladder cancer cells. *Int. J. Urol.*, 19, 61-70.
- Isidorov, V. A., Bakier, S., Grzech, I. 2012. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly. *J. Chromatogr. B*, 885, 109-116.

- Isidorov, V. A., Isidorova, A. G., Szczepaniak, L., Czyżewska, U. 2009. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem.*, 115, 1056-1063.
- Jagua-Gualdrón, A. 2012. Cáncer y terapéutica con productos de la colmena. Revisión sistemática de los estudios experimentales. *Rev. Fac. Med.*, 60, 79.
- Jang, H. S., Kim, S. K., Han, J. B., Ahn, H. J., Bae, H., Min, B. I. 2005. Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW264.7 macrophage cell line. *J. Ethnopharmacol.*, 99, 157-160.
- Janik, J. E., Wania-Galicia, L., Kalauokalani, D. 2007. Bee stings—A remedy for postherpetic neuralgia? A case report. *Reg. Anaesth. Pain Med.*, 32, 533-535.
- Joo, T., Sowndhararajan, K., Hong, S., Lee, J., Park, S. Y., Kim, S., Jhoo, J. W. 2014. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi J. Biological Scien.*, 21, 427-435.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods*, 2, 41-60.
- Karimzadeh, L., Nabiuni, M., Kouchesfehiani, H. M., Adham, H., Bagheri, A., Sheikholeslami, A. 2013. Effect of bee venom on IL-6, COX-2 and VEGF levels in polycystic ovarian syndrome induced in Wistar rats by estradiol valerate. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 19, 1-8.
- Kawasaki-Oyama, R. S., Braile, D. M., Caldas, H. C., Leal, J. C. F., Goloni-Bertollo, E. M., Pavarino-Bertelli, E. C., Filho M. A., Santos, I. 2008. Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, 23, 29-34.
- Kim, H.-W., Kwon, Y.-B., Ham, T.-W., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Lee, H.-J., Han H.-J., Yang I.-S., Beitz A.-J., Lee, J.-H. 2003. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 65, 349-355.
- Kim, Y. W., Chaturvedi, P. K., Chun, S. N., Lee, Y. G., Ahn, W. S. 2015. Honeybee venom possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer cell line. *Oncology reports*. 33, 1675-1682.

- Kim, M. J., Kadayat, T., Kim da E., Lee E.S., Park, P. H. 2014. TI-I-174, a synthetic chalcone derivative, suppresses nitric oxide production in murine macrophages via heme oxygenase-1 induction and inhibition of AP-1. *Biomolecules & therapeutics*, 22, 390-399.
- Kwon, Y.-B., Lee, J.-D., Lee, H.-J., Han, H.-J., Mar, W.-C., Kang, S.-K., Beitz A. J., Lee, J.-H. 2001. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain*. 90, 271-280.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.*, 46, 244-282.
- Lee, K.-G., Cho, H.-J., Bae, Y.-S., Park, K.-K., Choe, J.-Y., Chung, I.-K., Kim M., Yeo J.-H., Park K.-H., Lee Y.-S., Kim C.-H., Chang, Y.-C. 2009. Bee venom suppresses LPS-mediated NO/iNOS induction through inhibition of PKC- $\alpha$  expression. *J. Ethnopharmacol.*, 123, 15-21.
- Lee, Y. J., Kang, S. J., Kim, B. M., Kim, Y. J., Woo, H. D., Chung, H. W. 2007. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.*, 169, 189-197.
- Lercker, G., Capella, P., Conte, L. S., Ruini, F., Giordani, G. 1981. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. *Lipids*, 16, 912-919.
- Liu, C. C., Yang, H., Zhang, L. L., Zhang, Q., Chen, B., Wang, Y. 2014. Biotoxins for Cancer Therapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15, 4753-4758.
- Liu, X., Chen, D., Xie, L., Zhang, R. 2002. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1083-1089.
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., Hutchins, G. M. 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 133, 1463-1467.
- Margaoan, R., Mărghitaş, L. A., Dezmiorean, D., Mihai, C. M., Bobis, O. 2010. Bee collected pollen-general aspects and chemical composition. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Sci. Biotechnol.*, 67, 254-259.

- Markham, K.R. & Campos, M. 1996. 7- and 8-O-Methylherbacetin-3-o-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochemistry*, 43, 763-767.
- Markham, K.R., Mitchell, K.A., Campos, M. 1997. An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. *Phytochemistry*, 45, 203-204.
- Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S. K., Bartosiuk, E., Moskwa, J., Isidorov, V., Soroczyńska, J., Borawska, M. H. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG). *J. Apic. Sci.*, 57, 147-157.
- Marques, A. 2014. Avaliação da bioatividade de quatro lenhinas técnicas: Alcell, Indulin-AT, Sarkanda e Curan 27-11P.
- Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants— A review. *Biotechnol. Adv.*, 26, 548-560.
- Mohammadi, E., Vatanpour, H., Shirazi, F. H. 2015. Immunomodulatory Effects of Bee Venom in Human Synovial Fibroblast Cell Line. *Iranian J. Pharmaceutical Res.*, 14, 313-320.
- Moon, D.-O., Park, S.-Y., Lee, K.-J., Heo, M.-S., Kim, K.-C., Kim, M.-O., Lee J.-D., Choi Y.-H., Kim, G.-Y. 2007. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int. J. Immunopharmacol.*, 7, 1092-1101.
- Moon, D.-O., Park, S.-Y., Heo, M.-S., Kim, K.-C., Park, C., Ko, W. S., Choi Y. H., Kim, G.-Y. 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int. J. Immunopharmacol.*, 6, 1796-1807.
- Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T., Inoue, R., 2004. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung/Food*, 48, 226-229.
- Nam, K. W., Je, K. H., Lee, J. H., Han, H. J., Lee, H. J., Kang, S. K., Mar, W. 2003. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Arch. Pharmacol. Res.* 26, 383-388.

- Niki, E. 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.*, 47, 469-484.
- Noor, N., Sarfraz, R. A., Ali, S., Shahid, M. 2014. Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. *Food Chem.*, 143, 362-366.
- Oršolić, N. 2012. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 31, 173-194.
- Oršolić, N. 2009. Potentiation of Bleomycin lethality in HeLa and V79 cells by bee venom. *Arch. Hig. Rad. Taksikol*, 60, 317-326.
- Oršolić, N., Šver, L., Verstovšek, S., Terzić, S., Bašić, I. 2003. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicon*. 41, 861-870.
- Park, J.-H., Kim, K.-H., Kim, S.-J., Lee, W.-R., Lee, K.-G., Park, K.-K. 2010. Bee venom protects hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$  and actinomycin D. *Arch. Pharmacol. Res.*, 33, 215-223.
- Park, H. J., Lee, H. J., Choi, M. S., Son, D. J., Song, H. S., Song, M. J., Lee J. M., Han S. B., Kim Y., Hong, J. T. 2008. JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappaB activation by melittin. *J. Inflamm.*, 5, 1-13.
- Park, H. J., Son, D. J., Lee, C. W., Choi, M. S., Lee, U. S., Song, H. S., Lee J. M., Hong, J. T. 2007. Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with I $\kappa$ B kinase. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 237-247.
- Park, J. H., Kim, K.-H., Lee, W.-R., Han, S.-M., Park, K.-K. 2012. Protective effect of melittin on inflammation and apoptosis in acute liver failure. *Apoptosis*, 17, 61-69.
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., Estevinho, L. M. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem. Toxicol.*, 63, 233-239.
- Pereira, E., 2011. Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal.
- Pereira, C., Barreira, J. C., Calhelha, R. C., Lopes, M., Queiroz, M. J., Vilas-Boas, M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R. 2015. Is honey able to potentiate the antioxidant and

- cytotoxic properties of medicinal plants consumed as infusions for hepatoprotective effects? *Food Funct.*, 6, 1435-1442.
- Pinela, J., 2012. Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de plantas medicinais da família Fabaceae
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., Sabatini, A. G. 2007. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38, 306-311.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.
- Putz, T., Ramoner, R., Gander, H., Rahm, A., Bartsch, G., Thurnher, M. 2006. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3, 4)-bisphosphate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55, 1374-1383.
- Rao, A. V. & Rao, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.*, 55, 207-216.
- Rayahin, J. E., Buhrman, J. S., Gemeinhart, R. A. 2014. Melittin–glutathione S-transferase fusion protein exhibits anti-inflammatory properties and minimal toxicity. *Eur. J. Pharmaceutical Sci.*, 65, 112-121.
- Rekka, E., Kourounakis, L., Kourounakis, P. 1990. Antioxidant activity of and interleukin production affected by honey bee venom. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.*, 40, 912-913.
- Sadeghi-Aliabadi, H., Hamzeh, J., & Mirian, M. 2015. Investigation of Astragalus honey and propolis extract's cytotoxic effect on two human cancer cell lines and their oncogen and proapoptotic gene expression profiles. *Adv. Biomed. Res.*, 4.
- Snyder, L. M., Fortier, N. L., Trainor, J., Jacobs, J., Leb, L., Lubin, B., Chiu D., Shohet S., Mohandas, N. 1985. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J. Clin. Invest.*, 76, 1971-1977.

- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., Hong, J. T. 2007. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & therapeutics*. 115, 246-270.
- Srivastava, R. M., Srivastava, S., Singh, M., Bajpai, V. K., Ghosh, J. K. 2012. Consequences of alteration in leucine zipper sequence of melittin in its neutralization of lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in macrophage cells and interaction with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 287, 1980-1995.
- Tavididishvili, D., Khutsidze, T., Pkhakadze, M., Vanidze, M., Kalandia, A. 2014. Flavonoids in Georgian bee bread and bee pollen. *J. Chem.*, 8, 676-681.
- Uenojo, M., Marostica, M. R., Pastore, G. M. 2007. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim. Nova*, 30, 616-622.
- Varanda, E. A., Monti, R., Tavares, D. C. 1999. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct-and indirect-acting mutagens. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis*, 19, 403-413.
- Vasileiadou, K., Pantazidis, G., Papadopoulou, K., Ligoudistianou, C., Kourelis, A., Petrakis, S., Masmanidou E., Testa T., Kourounakis A. P., Hadjipetrou L., Papaconstantinou J., Yiangou, M. 2010.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein production in rat dorsal air pouch in response to inflammatory stimuli, dexamethasone and honey bee venom. *Exp. Mol. Pathol.*, 89, 63-71.
- Wu, L., Chen, L., Selvaraj, J. N., Wei, Y., Wang, Y., Li, Y., Zhao J., Xue, X. 2015. Identification of the distribution of adenosine phosphates, nucleosides and nucleobases in royal jelly. *Food Chem.*, 173, 1111-1118.
- Ximenes, R. M., Rabello, M. M., Araújo, R. M., Silveira, E. R., Fagundes, F. H. R., Diz-Filho, E. B. S., Buzzo S. C., Soares V. C. G., Toyama D. O., Gaeta H. H., Hernandez M. Z., Monteiro H. S. A., Toyama, M. H. 2012. Inhibition of neurotoxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities by harpalycin 2, an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliensis* benth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1-9.

- Yaacob, N. S., & Ismail, N. F. 2014. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity of 4-hydroxytamoxifen in combination with Tualang honey in MCF-7 and MCF-10A cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 106.
- Yoon, S. Y., Kwon, Y. B., Kim, H. W., Roh, D. H., Seo, H. S., Han, H. J., Lee H. J., Beitz A. J., Lee, J. H. 2008. Bee venom injection produces a peripheral anti-inflammatory effect by activation of a nitric oxide-dependent spinocoeruleus pathway. *Neuroscience letters*, 430, 163-168.
- Zhang, J., Xu, L. X., Xu, X. S., Li, B.-W., Wang, R., Fu, J.-J. 2014. Synthesis and effects of new caffeic acid derivatives on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 7, 1022-1027.