

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS  
VERDE, DO ARTEPELIN C E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE  
A FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL EM CÉLULAS DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Marina Wajsenzon da Fonseca**

**2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS  
VERDE, DO ARTEPELIN C E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE  
A FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL EM CÉLULAS DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

**MARINA WAJSENZON DA FONSECA**

*Sob orientação do professor*

**Dr. Cristiano Jorge Riger**

*e Co-orientação das professoras*

**Dr<sup>a</sup>. Rosane Nora Castro**

**Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Pereira da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química.

SEROPÉDICA, RJ

Janeiro 2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F676e Fonseca, Marina Wajsenzon da, 1990-  
Estudo do potencial antioxidante da própolis verde, do artepelin C e do ácido rosmarínico sobre a funcionalidade mitocondrial em células de *Saccharomyces cerevisiae* / Marina Wajsenzon da Fonseca. – Seropédica, RJ: 2021. 90 f.: il.

Orientador: Cristiano Jorge Riger.  
Coorientadora: Rosane Nora Castro.  
Coorientadora: Ana Paula Pereira da Silva.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Própolis verde. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Artepelin C. 4. Ácido rosmarínico. I. Riger, Cristiano Jorge, 1972-, II. Castro, Rosane Nora, 1965-, III. Silva, Ana Paula Pereira da, 1976-. IV. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARINA WAJSENZON DA FONSECA**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/01/2021

**Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020**, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Cristiano Jorge Riger. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

Carmelita Gomes da Silva. Dr<sup>a</sup> IFRJ

Cristiane Martins Cardoso de Salles. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ

Arthur Eugen Kummerle. Dr. UFRRJ

Elis Cristina Araújo Eleutherio. Dr<sup>a</sup>. UFRJ



Emitido em 28/01/2021

**DELIBERAÇÃO Nº 21/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 23/02/2021 10:11)*  
CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DBQ (11.39.00.24)  
Matrícula: 1681790

*(Assinado digitalmente em 23/02/2021 21:16)*  
CRISTIANO JORGE RIGER  
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO - TITULAR  
CHEFE DE UNIDADE  
CoordCGQ (12.28.01.00.00.58)  
Matrícula: 1844240

*(Assinado digitalmente em 26/02/2021 18:48)*  
CARMELITA GOMES DA SILVA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 074.918.587-24

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:  
**21**, ano: **2021**, tipo: **DELIBERAÇÃO**, data de emissão: **23/02/2021** e o código de verificação: **b2a5e967bb**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que sempre me incentivaram e acreditaram em minha capacidade de concluir o mestrado, em especial:

- Aos meus pais Ina Raquel e Marcelo, por proporcionar a melhor educação, por me ensinarem sempre a fazer o certo, por me apoiarem e me amarem incondicionalmente, por sempre acreditar em mim, me incentivar e me dar broncas quando necessário;
- A minha irmã Rachel, por me apoiar e me amar incondicionalmente, por ser a melhor amiga, por sempre estar ao meu lado, me incentivar e me dar broncas quando necessário;
- Ao meu marido Luís Felipe, pelo seu amor, por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado;
- Aos meus familiares, em especial meus avós maternos, Irene e Isack, minhas madrinhas Inês Júlia e Rosângela, ao meu padrinho Marcos César e a todos os meus primos por todo amor e carinho que sempre tiveram comigo;
- Aos familiares, *in memoriam*, em especial minha bisavó Julieta, minha avó Margarida e meu avô Manuel que não estão mais conosco, mas contribuíram para que me tornasse a pessoa que sou hoje;
- Ao meu orientador Dr. Cristiano Jorge Riger por me ensinar, orientar, e principalmente por me ajudar e dar o apoio necessário, além das broncas e puxões de orelha;
- Às minhas co-orientadoras Dr<sup>a</sup>. Rosane Nora Castro e Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Pereira da Silva, por me ensinar, orientar, e principalmente por me ajudar;
- Aos amigos e amigas do laboratório por sempre me ajudar e me dar apoio e por todas as risadas
- Aos membros da Banca Examinadora pelo interesse, disponibilidade e contribuições para o trabalho
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001
- Por último, mas não menos importante, à Deus pela minha própria vida.

## RESUMO

FONSECA, Marina Wajsenzou da. **Estudo do potencial antioxidante da própolis verde, do artepelin C e do ácido rosmarínico sobre a funcionalidade mitocondrial em células de *Saccharomyces cerevisiae*: Seropédica, RJ. 2021.75p** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas coletadas pelas abelhas melíferas de quaisquer partes do tecido vegetal, à qual as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a obtenção do produto final. As substâncias fenólicas que estão presentes na própolis são provenientes do metabolismo secundário das plantas e correspondem a aproximadamente 50% de seus constituintes. A própolis produzida na região sudeste (própolis verde) possui como principal fonte vegetal a resina coletada de botões e folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* L., conhecida popularmente como alecrim-do-campo. Esta planta nativa do Brasil fornece altos níveis do ácido fenólico artepelin C, que é considerado um marcador químico para este tipo de própolis. As propriedades antioxidantes da própolis podem estar associadas a constituintes fenólicos presentes em seus extratos, como o ácido rosmarínico e o artepelin C. Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antioxidante de extratos de própolis verde e de dois de seus constituintes sobre a atividade mitocondrial utilizando como modelo biológico a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente pelo fato de possuir organização celular semelhante às demais células eucarióticas, serem anaeróbicas facultativas e um organismo modelo para a compreensão de mecanismos moleculares associados a doenças mitocondriais. Os resultados mostram que tanto os extratos etanólico e hexânico, como as substâncias puras artepelin C e ácido rosmarínico mostraram um bom potencial antioxidante; aumentando a viabilidade celular em meio fermentativo (YPD) e não fermentativo (YPGly) quando comparados às células estressadas. O extrato hexânico na concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , além de não ser capaz de proteger as células, apresentou uma certa disfunção mitocondrial. O tratamento com as substâncias isoladas e os extratos foram capazes de não só proteger as membranas celulares, diminuindo a peroxidação lipídica, como também de se igualar estatisticamente às células controle. O extrato etanólico da própolis em  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi o único a contribuir positivamente na cadeia transportadora de elétrons aumentando o consumo de oxigênio durante a respiração máxima. A ação antioxidante das substâncias presentes na própolis demonstra que a introdução destes produtos na dieta, pode ser benéfico devido aos resultados aqui apresentados, em modelo celular eucariótico.

**Palavras-chaves:** *Saccharomyces cerevisiae*, própolis verde, artepelin C, ácido rosmarínico, mitocôndria

## ABSTRACT

FONSECA, Marina Wajsenzon da. **Study of the antioxidant potential of green propolis, artepillin C and rosmarinic acid on mitochondrial functionality in *Saccharomyces cerevisiae* cells: Seropédica, RJ. 2021.75p** Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Propolis is a complex mixture of resinous, gummy and balsamic substances collected by honeybees from any part of the plant tissue, to which bees are found that feature salivary secretions, wax and pollen for the display of the final product. The phenolic substances that are present in propolis come from the secondary metabolism of plants and refer to approximately 50% of their constituents. Political propolis in the southeastern region (green propolis) has as its main vegetable source the resin collected from buds and young leaves of *Baccharis dracunculifolia* L., popularly known as rosemary-of-the-field. This plant native to Brazil provides high levels of artepillin C phenolic acid, which is considered a chemical marker for this type of propolis. The antioxidant properties of propolis may be associated with phenolic constituents present in its extracts, such as rosmarinic acid and artepillin C. This work aims to evaluate the antioxidant potential of extracts of green propolis and two of its constituents on a mitochondrial activity such as biological model the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mainly due to the fact that it has cellular organization similar to eukaryotic cells, is facultative anaerobic and a model organism for the understanding of molecular mechanisms associated with mitochondrial diseases. The results show that both ethanolic and hexane extracts, as well as pure artepillin C substances and strong rosmarinic acid have a good antioxidant potential; Protect cell viability in fermentative (YPD) and non-fermentative (YPGly) media when compared to stressed cells. The hexane extract at a concentration of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , in addition to not being able to protect the cells, presented a certain mitochondrial dysfunction. Treatment with chemicals and extracts was able to not only protect cell membranes, reducing lipid peroxidation, but also to statistically match control cells. The ethanol extract of propolis in 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was the only one that contributed positively to the electron transport chain, increasing oxygen consumption during maximum breathing. The antioxidant action of the substances present in propolis demonstrates that the introduction of these products in the diet, can be beneficial due to the results obtained here, in a eukaryotic cell model.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, green propolis, artepillin C, rosmarinic acid, mitochondria

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ATP	Adenosina Trifosfato
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
nDNA	DNA nuclear
mtDNA	DNA Mitocondrial
GPX	Glutationa Peroxidase
TRAP	Capacidade Antioxidante
SM	Síndrome Metabólica
CoQ	Coenzima Q
DIC	Doença Isquêmica do Coração
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
Pi	Fosfato Inorgânico
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
LDH	Lactato Desidrogenase
PKA1	Proteína Quinase A
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
EHP	Extrato Hexânico de Própolis
AR	Ácido Rosmarínico
AC	Artepelin C
YPD	Meio composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose
YPGly	Meio composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 4% de glicerol
TCA	Ácido Tricloroacético

TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
MDA	Malonaldialdeído
FCCP	Cianeto de Carbonila 4-(Trifluorometoxi) fenil-hidrazona
TP	Teores de fenóis totais
TF	Flavonoides totais
FRAP	Redução do íon férrico
ABTS	Captura do radical-cátion
DPPH	Sequestro do radical livre
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
GSH	Glutationa Reduzida
CAPE	Éster Fenetílico do Ácido Cafeico

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Propriedades biológicas avaliadas na própolis verde. ....	22
Tabela 2 – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos (EEP) apresentados em suas médias e desvios padrão.....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis reações de compostos antioxidantes como doadores de elétrons.....	2
Figura 2: Esquema da cadeia respiratória de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
Figura 3: Reações de formação de EROs .....	5
Figura 4: Etapas da redução incompleta do O <sub>2</sub> molecular.....	6
Figura 5: Representação esquemática da cadeia respiratória de <i>S. cerevisiae</i> . Em vermelho estão assinalados locais de formação de EROs e em azul, interações metabólicas com proteínas antioxidativas; Cit C, CTT 1, GDP, GPX, Q, SOD.....	7
Figura 6: Etapas da peroxidação lipídica.....	8
Figura 7: Integração de alguns sistemas de defesa enzimáticos.....	10
Figura 8: Ativação dos fatores de transcrição NF-kB e Nrf2.....	11
Figura 9: Gráfico representando as fases do crescimento celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> . .....	14
Figura 10: Cadeia transportadora de elétrons da levedura <i>S. cerevisiae</i> . .....	16
Figura 11: Formação de EROs e mecanismos de defesa antioxidante celular. ....	17
Figura 12: ATPase acoplada a cadeia transportadora de elétrons.. .....	18
Figura 13: Estruturas básicas de ácidos fenólicos (A – derivados de ácido cinâmico e B - derivados de ácido benzoico) e de flavonoides (C).....	19
Figura 14: Estruturas de ressonância de estabilização de radical por doação de um átomo de hidrogênio de grupo hidroxila. ....	20
Figura 15: Representação dos locais de ligação dos flavonoides aos metais de transição	21
Figura 16: Abelha na planta alecrim-do-campo. ....	21
Figura 17: Estrutura química das substâncias majoritariamente encontradas na própolis verde. ....	24
Figura 18: Estrutura química do artepelin C. ....	24
Figura 19: Foto ilustrativa do alecrim-do-campo ( <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.).....	25
Figura 20: Estrutura química do ácido rosmarínico. ....	26
Figura 21: Foto ilustrativa do alecrim-da-horta ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.). ....	26
Figura 22: Metodologia do tratamento inicial. ....	32
Figura 23: Redução da resazurina em resorufina. ....	33
Figura 24: Metodologia da toxidez e vitalidade celular. ....	34
Figura 25: Produto formado a partir da reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído. ....	35

Figura 26: Vitalidade das células de levedura expostas a diferentes concentrações dos extratos etanólico (EEP) e hexânico (EHP) por 1 hora. a) Resultado da coloração obtida no experimento. b) Gráficos obtidos pelos valores, em porcentagem, das leituras de fluorescência. ....	40
Figura 27: Peroxidação lipídica nas células de levedura expostas a diferentes concentrações dos extratos com posterior estresse.. ....	43
Figura 28: Peroxidação lipídica nas células de levedura expostas a diferentes concentrações dos extratos com posterior estresse com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20 mM). ....	45
Figura 29: Reações envolvidas na inibição da peroxidação lipídica, onde $\alpha$ -T é $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). ....	46
Figura 30: Viabilidade celular das leveduras expostas na avaliação da toxicidade dos extratos (A) e das suas atividades antioxidantes (B). ....	48
Figura 31: Toxicidade dos extratos etanólicos (EEP) e hexânicos (EHP) sobre a atividade mitocondrial. ....	51
Figura 32: Análise antioxidante dos extratos etanólicos (EEP) e hexânicos (EHP) sobre a atividade mitocondrial em células de <i>S. cerevisiae</i> sob estresse oxidativo. ....	52
Figura 33: Gráfico de consumo de oxigênio em tempo real. ....	54
Figura 34: Consumo de oxigênio das leveduras na respiração basal (A) e com a adição do desacoplador (FCCP) (B). ....	55
Figura 35: Resultado qualitativo do ensaio de toxidez das substâncias ácido rosmarínico (colunas 1-3) e artepelin C (colunas 6-8) isoladas da própolis verde. Linha D – células em meio de cultura; Linha F – meio de cultura sem células. ....	57
Figura 36: Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> após tratamento com artepelin C (AC) e ácido rosmarínico (AR), ambas as substâncias na concentração de 10 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> . ....	58
Figura 37: Viabilidade celular da levedura após a adição do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2,0 mM) nas células pré-incubadas com artepelin C (AC) e ácido rosmarínico (AR). ....	60
Figura 38: Peroxidação lipídica das células de levedura expostas a diferentes tratamentos com posterior estresse. AC - artepelin C; AR - ácido rosmarínico; controle - controle negativo; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20 mM) - controle positivo para estresse. ....	61
Figura 39: Disfunção mitocondrial das células tratadas com as substâncias artepelin C (AC) e ácido rosmarínico (AR) e posteriormente estressadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2,0 mM). ....	63
Figura 40: Consumo de oxigênio das leveduras na respiração basal (A) e respiração máxima na presença de FCCP (B). ....	64

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1.	Estresse Oxidativo .....	4
2.1.1.	Espécies Reativas de Oxigênio .....	4
2.1.2.	Respiração Celular e Fatores Exógenos .....	5
2.1.3.	Danos Oxidativos Celulares .....	8
2.1.4.	Defesas Celulares .....	9
2.1.5.	Patologias Relacionadas ao Estresse Oxidativo .....	11
2.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
2.3.	Mitocôndria .....	14
2.3.1.	Cadeia Respiratória em <i>S. cerevisiae</i> .....	15
2.3.2.	Fosforilação Oxidativa .....	17
2.4.	Própolis .....	18
2.4.1.	Própolis Verde .....	21
2.4.2.	Propriedades Biológicas da Própolis Verde .....	22
2.4.3.	Artepelin C .....	24
2.4.4.	Ácido Rosmarínico .....	26
3.	OBJETIVO .....	28
3.1.	Objetivos Específicos .....	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1.	Meios de Cultura .....	29
4.2.	Microrganismo e Condição de Cultivo .....	29
4.2.1.	Repique .....	29
4.2.2.	Inóculo .....	30
4.3.	Fator de Conversão de Absorvância para Concentração .....	30
4.4.	Amostras Avaliadas .....	30
4.5.	Tratamento Inicial .....	31
4.5.1.	Extratos de Própolis .....	31
4.5.2.	Substâncias puras da Própolis Verde .....	32
4.6.	Toxidez e Vitalidade Celular dos Extratos de Própolis .....	33
4.7.	Peroxidação Lipídica .....	34
4.8.	Sobrevivência por Viabilidade Celular .....	35

4.9	Atividade Antioxidante por Disfunção Mitocondrial.....	36
4.10	Consumo de Oxigênio .....	36
4.11	Toxidez e Vitalidade Celular com as Substâncias Puras da Própolis.....	37
4.12	Análise Estatística .....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1	Toxidez e Vitalidade Celular.....	39
5.2	Atividade Antioxidante pelo Método TBARS .....	42
5.3	Avaliação da Atividade Antioxidante por Viabilidade Celular.....	47
5.4	Proteção Antioxidante sobre as Mitocôndrias .....	49
5.5	Análise da Influência dos Extratos Sobre o Consumo de Oxigênio.....	53
5.6	Toxidez e Vitalidade Celular das Substâncias Artepelin C e Ácido Rosmarínico 57	
5.7	Toxicidade por Viabilidade Celular de Artepelin C e Ácido Rosmarínico.....	58
5.8	Atividade Antioxidante por Viabilidade Celular das Substâncias Artepelin C e Ácido Rosmarínico .....	59
5.9	Atividade Antioxidante por TBARS com as Substâncias Puras .....	60
5.10	Avaliação Antioxidante dos Isolados dos Extratos por Disfunção Mitocondrial 62	
5.11	Consumo de Oxigênio pelas Células sob Estresse na Presença dos Isolados ....	63
6.	CONCLUSÕES .....	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças crônicas não transmissíveis estão associadas à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como diabetes, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson e câncer. Dentre as EROs algumas são radicais livres, cujas moléculas possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, permitindo a transferência de elétrons a moléculas vizinhas. Alguns exemplos são os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxila ( $\cdot OH$ ), que é uma das mais perigosas espécies radicalares nas células devido ao seu tempo de meia vida muito pequeno ( $7 \times 10^{-4}$  seg); sendo o radical livre mais responsável pela produção de danos oxidativos. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) mesmo não sendo um radical é uma espécie com alto potencial reativo, participando da geração do radical hidroxila. Esta molécula é diferente das demais espécies reativas, uma vez que possui a capacidade de atravessar as membranas celulares através de aquaporinas, proteínas que facilitam a passagem de água pelas mitocôndrias, e o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar por alguns desses canais.

Os processos de maior geração das EROs geralmente ocorrem nas mitocôndrias, possuindo um papel importantíssimo em diversos eventos celulares, como crescimento e sinalização, mediadores de processos inflamatórios e a consequente reparação celular. A mitocôndria é a principal geradora de radicais livres, pois é na cadeia transportadora de elétrons que é metabolizado 85% a 90% do oxigênio consumido. Diversos estudos demonstram que o envelhecimento celular está associado à redução da integridade funcional das mitocôndrias e, conseqüentemente, ao aumento da produção de radicais livres e espécies reativas.

Diversos estudos chegaram à conclusão de que o acúmulo de danos no DNA mitocondrial (mtDNA) está relacionado com doenças crônicas não transmissíveis. Este acúmulo de danos pode ser também proveniente do aumento do número de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias. Mutações ocorridas no genoma mitocondrial podem reduzir a produção de ATP, predispondo a célula ao envelhecimento e às diversas doenças associadas; ao ponto que a longevidade estaria interligada à manutenção da estrutura e função adequadas das mitocôndrias.

No organismo saudável há um equilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, que são produzidas pelas células e possuem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados por essas espécies reativas, atuando de diversas formas no meio intra e

extracelular; impedindo a formação de quaisquer espécies reativas, diminuindo a ação dessas ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas. O sistema de defesa é dividido em enzimático e não-enzimático, sendo que o primeiro inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O sistema de defesa não-enzimático é constituído de substâncias endógenas, como a glutathione e a coenzima Q; e as substâncias exógenas, as quais ingerimos na dieta, como vitaminas e compostos fenólicos, e que atuam mobilizando ou reduzindo as espécies reativas (Figura 1).

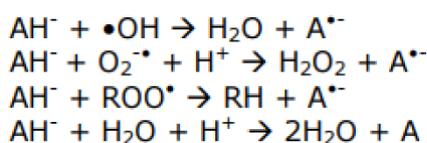


Figura 1: Possíveis reações de compostos antioxidantes como doadores de elétrons (MOSCA *et al.*, 2017).

O número de estudos com produtos naturais que possuem substâncias antioxidantes vem crescendo desde a década de 80, e em sua maioria estas substâncias são encontradas em vegetações. A própolis é uma mistura complexa de substâncias que é produzida pelas abelhas a partir do material orgânico que recolhem dos brotos das plantas, cascas de árvores ou de quaisquer outras partes do tecido vegetal; o qual é transportado até a colmeia onde as abelhas adicionam secreções próprias como cera e saliva.

O interesse pelo consumo da própolis aumentou no Brasil e no mundo. Estudos relatam seu potencial terapêutico com diferentes propriedades biológicas, como ações antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anticarcinogênica e antiviral. Diversas substâncias foram identificadas em diferentes amostras de própolis, dentre elas destacam-se os polifenóis; além de outras substâncias como aminoácidos, proteínas, terpenos e cumarinas.

Estudos indicam que a classe mais importante de substâncias encontradas na própolis são os polifenóis; incluindo flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres, aos quais são atribuídas grande parte de suas atividades biológicas e correspondem a aproximadamente 50% de seus constituintes, sendo capazes de sequestrar os radicais livres e reduzir elementos como o ferro em ensaios *in vitro*.

Para a verificação das atividades biológicas das substâncias presentes na própolis são feitos ensaios *in vivo*. Um dos modelos muito utilizado no estudo biológico é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por ser organismo eucarioto e por possuir propriedades adequadas

aos estudos biológicos, inclusive relacionadas à respiração celular, visto que é um organismo aeróbico facultativo.

As cadeias transportadoras de elétrons ficam localizadas na membrana interna da mitocôndria e são compostas por enzimas redox que transferem seus elétrons até o oxigênio molecular, onde o bombeamento de prótons gera uma diferença de potencial que será utilizada pela enzima ATP sintase para sintetizar o ATP. A cadeia respiratória clássica de fungos possui os 4 complexos proteicos (Figura 2); contudo, *S. cerevisiae* não possui o complexo I, substituindo-o por 3 isoformas da enzima, NADH desidrogenase na membrana interna: duas voltadas para o espaço intermembranar e uma voltada para a matriz mitocondrial. Entretanto, esta levedura possui os complexos II, III e IV e não possui uma oxidase alternativa que outros fungos possuem. Desta forma, se houver alguma inibição nos complexos III e IV a cadeia transportadora de elétrons desta levedura é bloqueada, interferindo drasticamente na síntese de ATP mitocondrial e no consumo de oxigênio pela mitocôndria; assim como ocorre em mamíferos superiores.

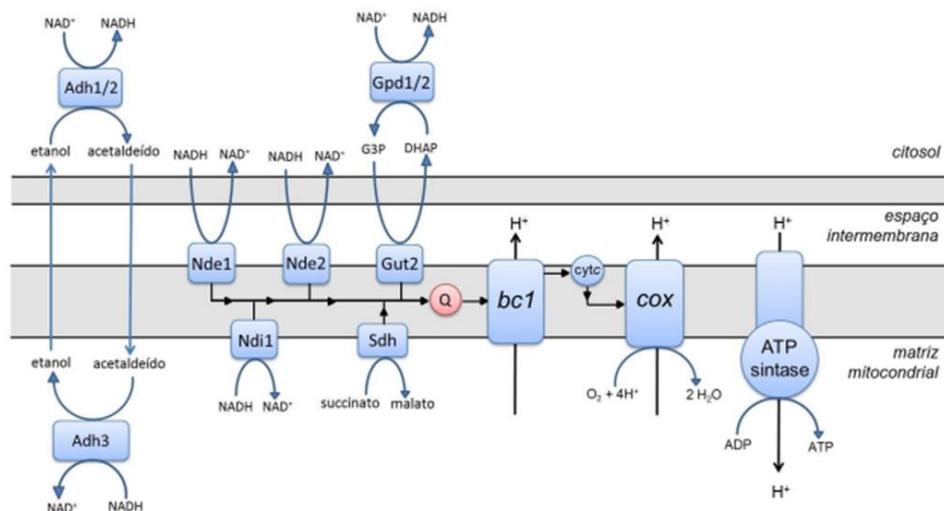


Figura 2: Esquema da cadeia respiratória de *Saccharomyces cerevisiae* (GOMES, 2012).

Devido à semelhança com organelas e sistemas de defesa antioxidantes de células de mamíferos superiores, estes microrganismos são ferramentas úteis na avaliação do potencial antioxidante de substâncias que possam interferir na homeostase redox intracelular das leveduras.

Com isso, neste trabalho serão investigadas as propriedades antioxidante de dois extratos (etanólico e hexânico) de própolis verde e de dois de seus isolados puros (ácido rosmarínico e artepelin C) sobre estruturas celulares da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como as membranas celulares e mitocôndrias, em células sob estresse oxidativo pelo agente oxidante peróxido de hidrogênio.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade da célula de se defender contra elas, podendo ser resultado de um aumento excessivo na produção das EROs, uma diminuição da capacidade de defesa celular antioxidante, ou por ambos; favorecendo a oxidação de biomoléculas e a consequente perda de suas funções biológicas (GEMELLI *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo contribui para o envelhecimento celular por meio de diversos e complexos mecanismos celulares e moleculares. A obesidade, a hiperlipidemia e a hiperglicemia, por exemplo, estão relacionadas com a diminuição da capacidade antioxidante. A restrição calórica junto com uma dieta rica em antioxidantes pode contribuir com o aumento da expressão antioxidante e reduzir o estresse. Silva e Ferrari (2011) citam um exemplo de quando ratos alimentados com dietas menos calóricas exibem maiores quantidades de vitamina E e coenzima Q o que poderá reduzir os danos oxidativos em proteínas, lipídios e DNA.

#### 2.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é basicamente um biradical, pois apresenta dois elétrons desemparelhados nos orbitais p antiligantes e ambos com mesmo giro, sendo assim uma molécula pouco reativa, impedida pela restrição de spin de reagir com a maioria das moléculas por não possuírem configuração eletrônica semelhante. Entretanto, a absorção de energia e/ou processo de transferência de elétrons pode acarretar na formação de EROs (SALVADOR e HENRIQUES 2004).

A geração de EROs pode desencadear eventos patológicos como problemas cardiovasculares, carcinogênese e danos neurodegenerativos, os quais estão sendo associados às doenças crônicas não transmissíveis (PRUDÊNCIO, 2016; BARBOSA *et al.*, 2010; SÁ *et al.*, 2013). As espécies reativas podem alterar estruturas celulares, como membranas, ácidos nucleicos e peptídeos (ALMEIDA G. , 2014; BARBOSA *et al.*, 2010). Alguns compostos gerados durante a respiração celular, como peróxido de hidrogênio, são mais estáveis do que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas próximas. Como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem a capacidade de atravessar camadas lipídicas, podem ocorrer reações de oxidação numa grande variedade de tecidos. Sua toxicidade é muito mais elevada na presença de alguns metais, como o ferro, devido à ocorrência das reações de Fenton e de Haber-Weiss (PRUDÊNCIO, 2016; ALMEIDA M. B., 2014; MARTINS N. , 2007); tornando-o muito mais perigoso devido à possibilidade de formação do radical hidroxila (Figura 3).

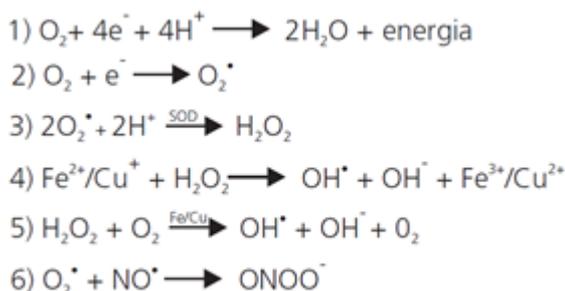


Figura 3: Reações de formação de EROs (BARBOSA *et al.*, 2010).

Tanto o peróxido de hidrogênio como o radical hidroxila podem ser gerados através do íon radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), sendo este o radical mais comum e abundante nas células. Estas espécies também são formadas durante a respiração celular em todas as células ou na defesa bactericida pela ação das células fagocitárias do organismo humano. Curiosamente, o radical superóxido atua na maioria das vezes como agente redutor (SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

### 2.1.2. Respiração Celular e Fatores Exógenos

Responsáveis pela respiração celular e manutenção da vida dos seres aeróbicos, as mitocôndrias também são as principais geradoras de radicais livres, onde cerca de 90% do oxigênio é metabolizado para ser convertido em água; podendo ocorrer redução incompleta do

oxigênio por transferência de elétrons de maneira não eficiente (Figura 4) (SILVA, 2011; ALMEIDA, 2014).

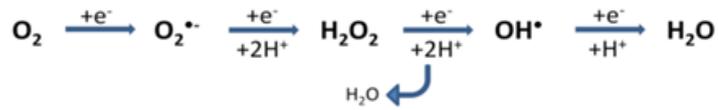


Figura 4: Etapas da redução incompleta do O<sub>2</sub> molecular (ALMEIDA, 2014).

Organismos aeróbicos precisam lidar constantemente com os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio, que são formadas naturalmente pelo metabolismo (Figura 5). Essas espécies reativas são produzidas por processos contínuos e fisiológicos, cumprindo funções biológicas relevantes como sinalização de processos inflamatórios e sinalização celular (BARBOSA *et al.*, 2010). A etapa de sinalização se inicia através de sistemas redox, podendo ter seu início ativado por estímulos extracelulares ou pelo aumento da produção destas espécies reativas na mitocôndria. Uma vez no citosol ou na mitocôndria, estas espécies oxidam proteínas chaves, desencadeando uma sinalização para que o processo de transcrição necessário ocorra. Este processo envolve várias moléculas de sinalização, como por exemplo fatores de transcrição, que são enviadas para o núcleo, DNA nuclear (nDNA), e/ou para DNA mitocondrial (mtDNA) e, dependendo da diferenciação celular, cada órgão ou tecido terá uma resposta diferente (VISSERS *et al.*, 2018).

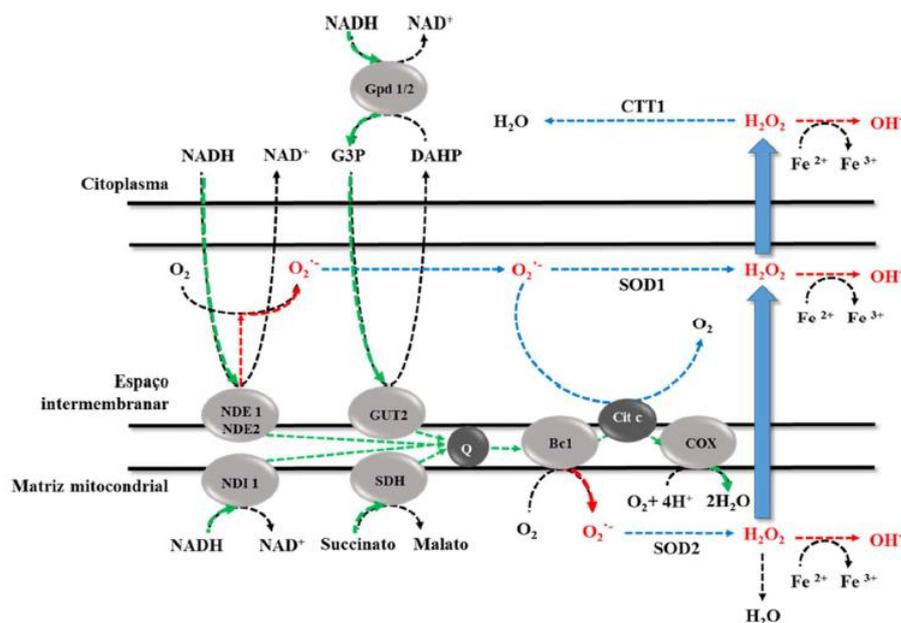


Figura 5: Representação esquemática da cadeia respiratória de *S. cerevisiae*. Em vermelho estão assinalados locais de formação de EROs e em azul, interações metabólicas com proteínas antioxidativas; Cit C, CTT 1, GDP, GPX, Q, SOD (PIRES, 2017).

Também ocorre a formação das espécies reativas em situações como a exposição à radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas excessivamente calóricas, excesso de exercícios físicos, pesticidas e solventes industriais.

A radiação UV, por exemplo, gera fotoprodutos na molécula de DNA, podendo formar dímeros que ao se encontrarem distorcem a dupla hélice impedindo o pareamento correto e/ou a replicação do próprio DNA (SILVA, 2009). O cigarro e solventes orgânicos atuam de forma diferente da radiação UV. Na fumaça do cigarro foram detectadas diversas espécies radiculares, entre elas o radical hidroxila e o ânion radical superóxido, além de estarem presentes também substâncias orgânicas como quinonas, podendo formar radical semiquinona e assim reagir com outras moléculas e formar peróxido de hidrogênio. Já os solventes orgânicos são danosos devido à geração de radicais livres durante a conversão desses compostos orgânicos pelo citocromo P-450, podendo sofrer oxidação e gerar semiquinonas. Os solventes podem também ocasionar lesões em células hepáticas através da peroxidação lipídica induzida por seus radicais (SALVADOR e HENRIQUES, 2004).

### 2.1.3. Danos Oxidativos Celulares

A baixa estabilidade das EROs garante às mesmas uma elevada reatividade e seu poder deletério, aumentando a probabilidade de ocorrerem reações com diversas biomoléculas, como lipídios, proteínas e DNA; com a consequente perda de suas funções biológicas. Estes danos prejudicam o funcionamento de tecidos e órgãos, podendo originar ou acelerar o quadro bioquímico relacionado às diversas patologias (DALVI, 2014; PRUDÊNCIO, 2016). Todos estes processos estão diretamente relacionados ao elevado número de radicais livres gerados durante o estresse oxidativo, gerando um desequilíbrio na homeostase celular com baixa eficiência das defesas antioxidantes endógenas em reverter este processo. Tal desequilíbrio afeta o correto funcionamento das células, além de poder causar mutações genéticas (LI *et al.*, 2014).

Quando ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares são atacados pelas espécies reativas, há formação de radicais livres iniciando uma série de reações em cadeia (Figura 6); visto que este radical pode atacar outras cadeias adjacentes dando início à peroxidação lipídica. O término ocorre quando os radicais produzidos nas etapas anteriores reagem entre si, desfazendo as espécies radicalares. Na lipoperoxidação a membrana tem suas propriedades físico-químicas alteradas, levando a perda de seletividade nas trocas iônicas e permitindo a troca de substâncias entre o citosol e o meio extracelular, como o conteúdo das organelas, onde a soma desses fatores pode levar a morte celular (ENGERS *et al.*, 2011).

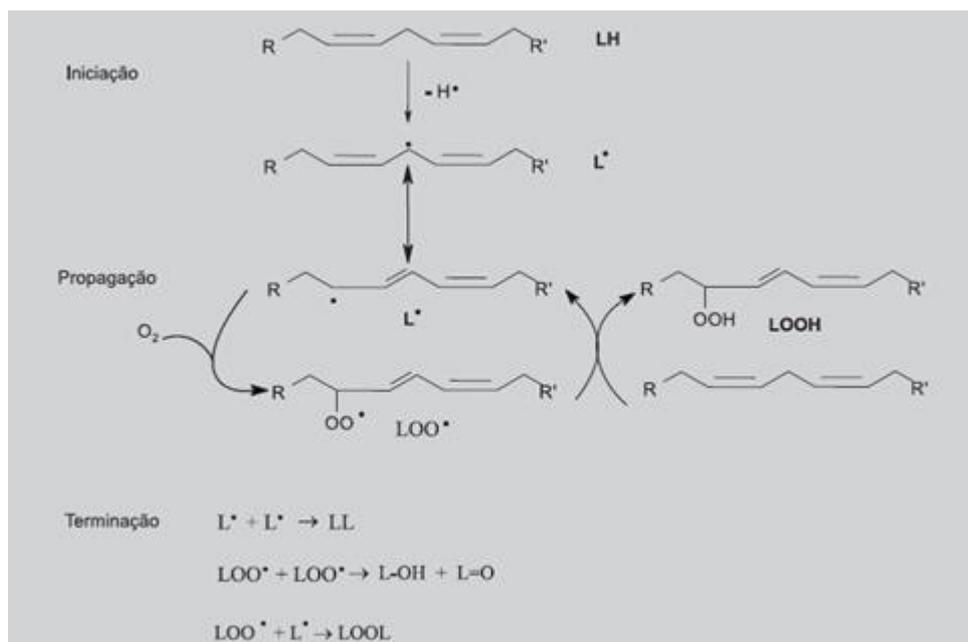


Figura 6: Etapas da peroxidação lipídica (AKAMINE, 2011).

A oxidação de proteínas pode ocorrer pela formação de um radical em algum ponto da estrutura proteica, onde este evento pode ser iniciado por um ataque de algum radical livre ao carbono da ligação peptídica ou pela reação com metais de transição ligados à proteína, com o  $H_2O_2$  gerando o radical hidroxila nestes locais. Seja como for o processo de formação do radical no sítio da proteína, a carbonilação é similar à peroxidação lipídica dando início a uma cascata de reações, onde quaisquer aminoácidos podem ser oxidados, principalmente os aromáticos. Além das reações que ocorrem na estrutura da proteína carbonilando cadeias laterais de aminoácidos, as proteínas podem oxidar outras proteínas e iniciar uma sequência de sinais levando a degradação de tais proteínas (BUSSO, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A molécula de DNA pode ser danificada tanto nas bases purínicas e pirimidínicas, quanto nos açúcares ou na ligação fosfodiéster; principalmente pelo radical hidroxila. Este radical reage com a fita de DNA podendo se adicionar a ela ou retirar átomos de hidrogênio ocorrendo assim uma oxidação endógena. Como possui uma alta reatividade, reage com componentes celulares rapidamente como na peroxidação lipídica e seus intermediários podem reagir com o DNA, acredita-se também que seja formado próximo a molécula de DNA através da reação entre o peróxido de hidrogênio e um íon metálico (Figura 3). A modificação permanente do material genético e o seu não reparo por sistemas específicos representa o primeiro passo envolvido em mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (MARNETT, 2000; VARELA-LÓPEZ *et al.*, 2015).

#### **2.1.4. Defesas Celulares**

As células respondem ao estresse de diferentes formas, seja através de sinalização redox de algumas proteínas, onde aminoácidos específicos são oxidados, seja pela regulação da atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo, ou pelo nível transcricional capaz de disparar cascatas de proteção celular. O sistema defensivo enzimático (Figura 7) envolve, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX). A SOD age catalisando a reação na qual o radical superóxido é consumido e há a produção de peróxido de hidrogênio, enquanto que as duas últimas enzimas citadas agem impedindo o acúmulo de  $H_2O_2$  (ALMEIDA M. B., 2014; BARBOSA *et al.*, 2010; DALVI 2014).

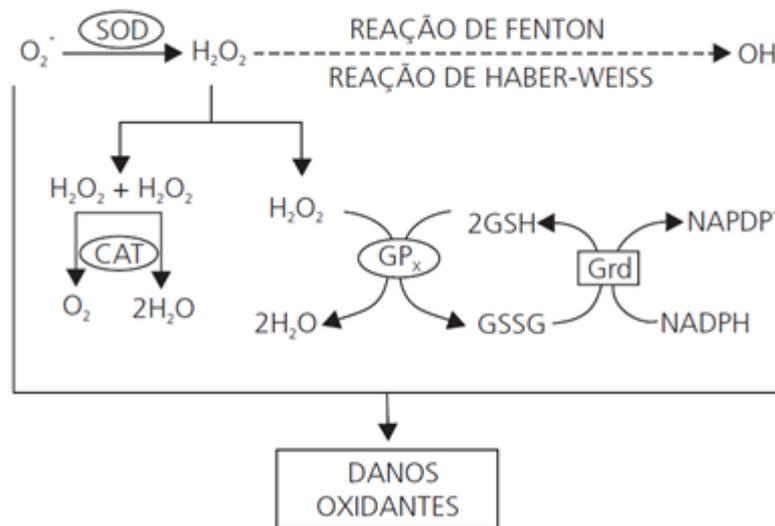


Figura 7: Integração de alguns sistemas de defesa enzimáticos (BARBOSA *et al.*, 2010).

Enzimas e moléculas antioxidantes estão presentes simultaneamente no interior das células e suas concentrações indicam o estado redox intracelular. Um exemplo é a presença da glutathiona redutase e da glutathiona e da tiorredoxina redutase e da tiorredoxina; auxiliando na manutenção da estabilidade dos complexos Nrf2/Keap1 e NF-kB/IkB (SÉFORA-SOUSA & DE ANGELIS-PEREIRA, 2013). A figura 8 demonstra como funciona os fatores de transcrição sensíveis às variações do ambiente redox intracelular, como Nrf2 e NF-kB. O primeiro induz a sinalização de um conjunto de enzimas antioxidantes e de desintoxicação, já o segundo está envolvido em respostas inflamatórias e imunológicas. As ativações funcionam de forma semelhante, onde em condições de estresse, IkB e/ou Keap1 possuem suas cadeias laterais oxidadas pela presença de  $H_2O_2$ , o que leva a dissociação dos fatores NF-kB e Nrf2, respectivamente. Os fatores então chegam à periferia nuclear, e ao entrar no núcleo ligam-se em locais específicos na fita de DNA e ativam as expressões dos genes envolvidos em suas respectivas funções (SIES *et al.*, 2017; SÉFORA-SOUSA & DE ANGELIS-PEREIRA, 2013).

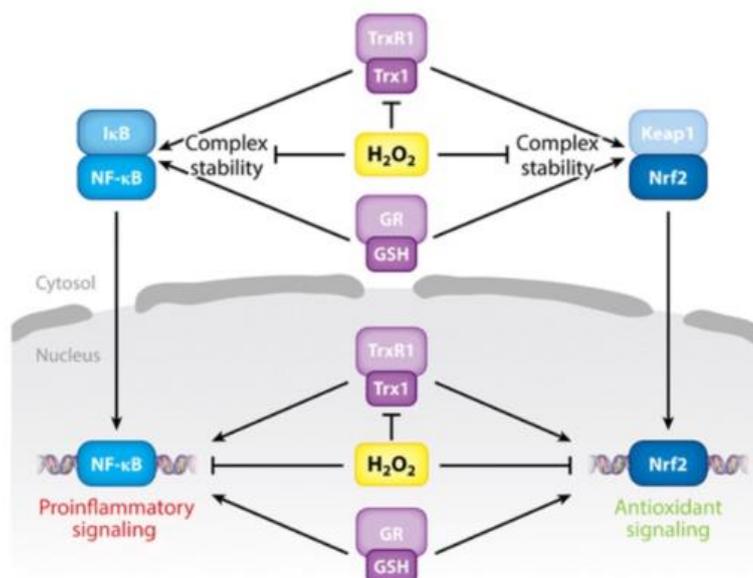


Figura 8: Ativação dos fatores de transcrição NF-κB e Nrf2 (SIES *et al.*, 2017).

O sistema de defesa não-enzimático é constituído de quaisquer substâncias que desempenham papel antioxidante, podendo ser complementares às enzimas (como o tripeptídeo glutaciona utilizado como poder redutor de enzimas) ou possuindo estruturas químicas que favoreçam a proteção contra as EROs interagindo diretamente com essas espécies reativas minimizando seus efeitos. Os alimentos de origem vegetal e seus derivados saudáveis incluem grande número de substâncias possuindo atividade biológica como função antioxidante, em particular os compostos fenólicos (BAYLIAK *et al.*, 2016; GOTTLIEB *et al.*, 2011).

### 2.1.5. Patologias Relacionadas ao Estresse Oxidativo

Gottlieb e colaboradores (2011) citam alguns exemplos de como o estresse oxidativo está associado com a causa de doenças crônicas: indivíduos com câncer apresentam, de uma maneira geral, aumento do nível de estresse e baixa atividade de enzimas antioxidantes; aqueles que apresentam doenças cardiovasculares tanto o estresse oxidativo como a atividade enzimática estavam com níveis aumentados; a síndrome metabólica está associada ao estresse e à níveis mais baixos de moléculas antioxidantes, como vitamina C; em pacientes com doenças neurodegenerativas há um aumento de marcadores de estresse oxidativo como o produto da peroxidação lipídica, menor capacidade antioxidante e altos níveis de SOD.

Produtos do DNA oxidado são mutagênicos e induzem mutações observadas em humanos, em oncogenes mutados e genes supressores de tumores, contribuindo no desenvolvimento do câncer (MARNETT, 2000). As células possuem um sistema de reparo, mas se a célula apresentar o mecanismo de reparo defeituoso pelo dano oxidativo causado pelas EROs pode não conseguir remover as bases mutadas aumentando as chances do DNA oxidado ou mutado se replicar.

Em seu estudo, Serra et al (2001) coletaram amostras de sangue de pacientes com Parkinson, Alzheimer e doença vascular, além de um grupo controle com pessoas saudáveis. Foram feitos cinco experimentos, determinando as atividades das enzimas SOD e CAT, sistema glutaciona, peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante total através de TRAP (capacidade antioxidante), verificando a capacidade de reação com moléculas radiculares. Nos 3 grupos houve uma elevada atividade da enzima SOD, onde os autores discutiram que em baixas concentrações esta enzima possui um caráter protetor antioxidante, mas em elevados níveis perde este caráter protetor e aumenta os danos de peroxidação lipídica. Outro resultado em comum entre os indivíduos com as três doenças é a baixa capacidade antioxidante quando comparados com o grupo saudável (SERRA *et al.*, 2001).

Síndrome metabólica (SM) está relacionada com o excesso de peso, hipoglicemia, elevada pressão arterial, entre outras anormalidades fisiológicas ou antropométricas. Essas pessoas apresentam alto risco de desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares, e seu desenvolvimento pode estar ligado ao estresse oxidativo. Ford et al (2003) coletaram amostras de sangue de dois grupos, com e sem síndrome metabólica a fim de verificar se há diferenças nos níveis de vitaminas e outros componentes com característica antioxidante. O grupo com a SM apresentou níveis mais baixos de vitamina C (40%) e carotenoides (27%).

No estudo de Yen et al (2013) verificou-se que os níveis de coenzima Q, vitamina E e de enzimas antioxidantes. Os resultados revelaram que os indivíduos com SM apresentaram níveis mais elevados de CoQ e vitamina E enquanto as atividades das enzimas SOD, CAT e GPx nos indivíduos com síndrome metabólica são mais baixas do que nos indivíduos saudáveis. De acordo com os autores, àqueles que apresentaram atividades enzimáticas mais altas possuíam menor risco de desenvolver a SM; entretanto, obesos e indivíduos com a síndrome estão sob elevado estresse oxidativo, e como as enzimas são a primeira linha de defesa contra as EROs elas podem diminuir sua eficácia com o tempo e o contínuo estresse.

Maharjan et al (2008) em seu estudo verificou os níveis de estresse em indivíduos com doença isquêmica do coração (DIC) através da peroxidação lipídica, onde os mesmos foram significativamente maiores no grupo com a doença. Surpreendentemente, não houve diferença significativa entre os grupos com relação aos valores de atividade antioxidante, mas no grupo dos indivíduos com DIC o resultado tendeu a uma diminuição. O perigo de possuir defesas antioxidantes enzimáticas insuficientes e/ou não ter alimentação saudável com nutrientes antioxidantes é que com o aumento de espécies reativas circulando no organismo há uma maior chance de moléculas de colesterol serem oxidadas e, uma vez oxidado o colesterol acumula-se em macrófagos formando parte das placas ateromatosas contribuindo para os casos de infarto do miocárdio.

## 2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em experimentos como modelo biológico por possuir organização celular semelhante às demais células eucarióticas; sendo o primeiro destes a ter seu genoma totalmente sequenciado, com a possibilidade do uso de técnicas para a manipulação genética. Estes microrganismos são facilmente cultivados e possuem tempo de geração curto, permitindo alta disponibilidade de indivíduos para a realização de experimentos, além de um baixo custo para seu cultivo (PAULELA, 2017; GOMES, 2012).

A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas, ou seja, obtém energia por meio de fermentação de hexoses ou por meio de respiração celular, sendo expostas continuamente pelas EROs oriundas do metabolismo aeróbico. Como possuem ortologia com os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de mamíferos superiores, elas tornam-se um modelo para a avaliação da atividade biológica relacionada a extratos e moléculas naturais que sejam expostas a este tipo celular (PRUDÊNCIO, 2016).

A preponderância do metabolismo utilizado pela levedura é dependente da concentração de açúcares no meio extracelular. Na presença de concentrações superiores a 0,2% de açúcares fermentáveis ocorre o metabolismo anaeróbico (Figura 9 - fases A e B, metabolismo fermentativo); enquanto que abaixo deste valor ocorre ativação das enzimas que participam da biossíntese de moléculas responsáveis pelo funcionamento da mitocôndria e ativação de genes (Figura 9 - fase C, troca diáuxica) necessários ao metabolismo aeróbico (Figura 9 - fase D,

metabolismo respiratório). O crescimento celular, portanto, é influenciado pelo ambiente em que a levedura se encontra, existindo fases que descrevem cada etapa de seu crescimento (Figura 9) (SILVA, 2009; OSORIO, 2018).

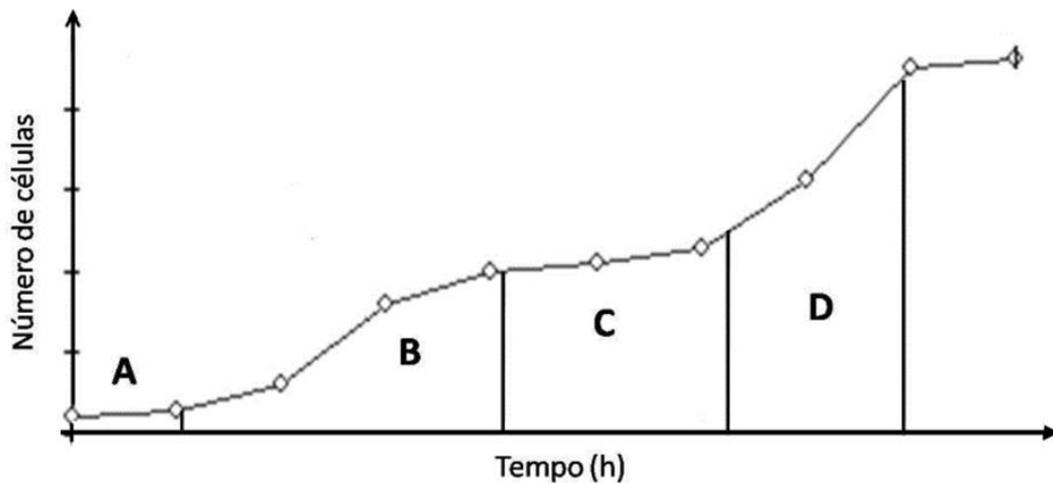


Figura 9: Gráfico representando as fases do crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* (modificado de SILVA, 2009).

Por ser um organismo aeróbico facultativo, esta levedura é um modelo amplamente utilizado em estudos sobre biogênese mitocondrial, permitindo nosso melhor entendimento sobre diversas funções de uma célula eucariótica. *S. cerevisiae* tornou-se excelente organismo modelo para a compreensão dos mecanismos moleculares que conduzem às doenças mitocondriais. O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção e transmissão do mtDNA na levedura poderá auxiliar no entendimento em eucariotos superiores, já que a maioria dos genes que codificam proteínas mitocondriais são altamente conservados entre os eucariotos (PAULELA, 2017; GOMES, 2012).

### 2.3. Mitocôndria

A mitocôndria é a organela responsável pelo metabolismo oxidativo em eucariotos, possuindo quatro compartimentos: membrana externa, membrana interna, espaço intermembranar e matriz mitocondrial (SOUZA C. F., 2005; VOET e VOET, 2013). Esta organela está presente no citoplasma de todas as células eucarióticas dos animais, plantas superiores e alguns microrganismos e algas. A mitocôndria humana é geralmente elipsoide, seu

comprimento e diâmetro variam entre 0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$  e seu número dentro das células pode variar de acordo com a demanda do substrato e a utilização do oxigênio por uma determinada célula ou tecido.

A mitocôndria exerce algumas funções fundamentais no nosso organismo: respiração celular, através da cadeia transportadora de elétrons; a síntese de adenosina trifosfato (ATP); a mediação da morte celular programada (apoptose); e a produção de calor; além de possuir seu próprio DNA (mtDNA). Para essa organela funcionar é necessária uma perfeita coordenação entre os genomas mitocondrial e nuclear, uma vez que a síntese das proteínas utilizadas na organela ocorre parte pelo DNA nuclear (nDNA) e parte pelo mtDNA (GUEDES, 2006; VOET e VOET, 2013).

O DNA mitocondrial apresenta uma certa vulnerabilidade devido à sua proximidade com a cadeia respiratória e com a contínua geração das espécies reativas. Mutações ocorridas no genoma mitocondrial alteram seu metabolismo reduzindo a produção de ATP e predispondo a célula ao envelhecimento e às doenças associadas, além de aumentar a produção de radicais livres favorecendo a ocorrência de apoptose.

O cérebro consome cerca de 20% do total de oxigênio consumido por um adulto. As mitocôndrias são encontradas em corpos celulares neuronais, dendritos, axônios e botões sinápticos. As doenças degenerativas podem ter atividade dos radicais livres como mediadores, não se sabe ao certo se a produção elevada das espécies reativas são a causa ou a consequência dessas doenças (PÔRTO, 2001; SILVA e FERRARI, 2011; GEMELLI *et al.*, 2013).

O alto grau de similaridade entre mitocôndrias de levedura e mamíferos promoveu o uso de *S. cerevisiae* como modelo funcional, permitindo a identificação de genes nucleares envolvidos em doenças neurodegenerativas; como por exemplo, pacientes portadores de doenças como Parkinson e Alzheimer que apresentam baixas concentrações de Coenzima Q (GOMES, 2012), molécula necessária na cadeia transportadora de elétrons.

### **2.3.1. Cadeia Respiratória em *S. cerevisiae***

A cadeia transportadora de elétrons (CTE) é composta por 4 complexos proteicos, que entre outras funções possui a capacidade de transferência de elétrons aoceptor final na cadeia, o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), que é obtido através da respiração. O bombeamento de prótons ( $\text{H}^+$ )

através dos complexos I, III e IV cria uma diferença de potencial entre a matriz e o espaço intermembranar, sendo utilizada para a síntese de ATP.

O complexo I em *S. cerevisiae* é substituído por três isoformas da NADH desidrogenase localizadas na membrana mitocondrial interna, sendo duas voltadas para o espaço intermembranar, responsáveis pela oxidação do NADH gerado no citosol, e uma voltada para a matriz mitocondrial, que oxida o NADH da matriz (Figura 10). Nessas enzimas ocorre a oxidação do NADH à  $\text{NAD}^+$  e a redução da coenzima Q (ubiquinona) (MONTEIRO, 2017; PRADO, 2016). O complexo II (succinato: ubiquinona redutase) desempenha papel no ciclo do ácido cítrico, promovendo a oxidação do succinato à fumarato, com os elétrons sendo transferidos à ubiquinona. Esta transfere os elétrons para o complexo III (ubiquinol-citocromo c redutase), que os transfere para a proteína citocromo c, acoplado ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar. A partir do citocromo c os elétrons fluem para o complexo IV (citocromo c oxidase), e finalmente para o oxigênio, a etapa final da cadeia de transporte de elétrons (VOET e VOET, 2013; MONTEIRO, 2017).

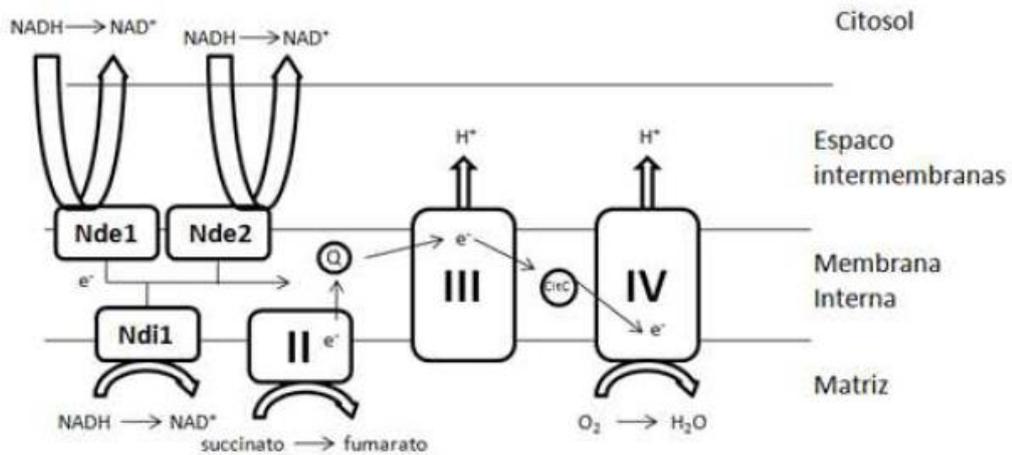


Figura 10: Cadeia transportadora de elétrons da levedura *S. cerevisiae*, onde Q representa a coenzima Q na sua forma oxidada; e CitC representa o citocromo c (MONTEIRO, 2017).

A formação de espécies reativas de oxigênio pode acontecer no complexo IV se a transferência de elétrons para o oxigênio não for feita de forma correta e controlada, ou quando a Coenzima Q transfere parcialmente seus elétrons para o  $\text{O}_2$  (Figura 11).

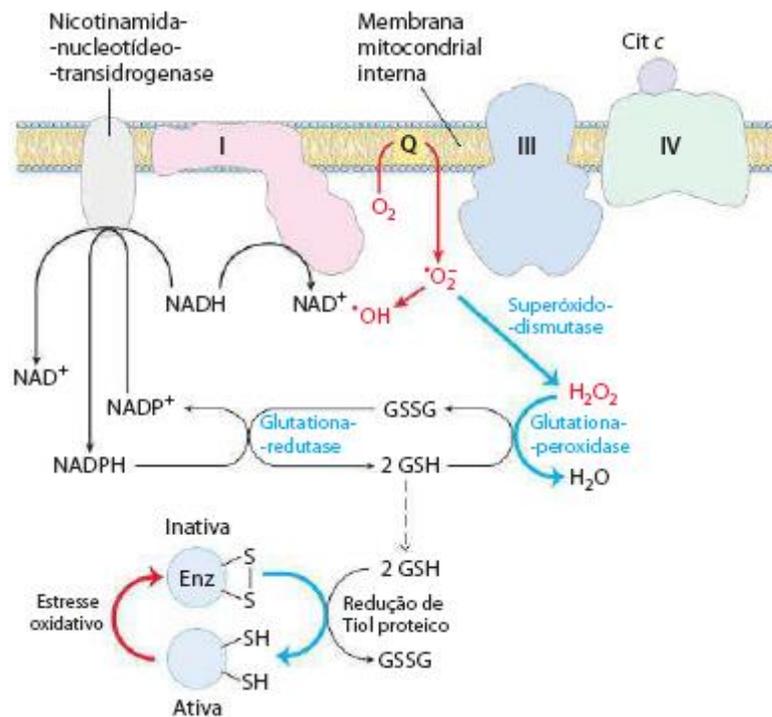


Figura 11: Formação de EROs e mecanismos de defesa antioxidante celular (NELSON E COX, 2014).  
O complexo I em *S. cerevisiae* é substituído por três enzimas desidrogenases.

### 2.3.2. Fosforilação Oxidativa

A mitocôndria é a responsável pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário para a manutenção de funções e estruturas celulares através da fosforilação oxidativa (MARTINS N. , 2007; MARTINS V. d., 2007).

O bombeamento de prótons, associado a transferência de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, gera um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. A energia potencial armazenada no gradiente de prótons é posteriormente utilizada para promover a síntese de ATP através do complexo da ATP sintase, também chamada de complexo V, o qual é constituído de dois domínios funcionais, Fo e F1 (Figura 12). Esse complexo enzimático presente na membrana interna da mitocôndria catalisa a formação de ATP a partir de ADP e Pi, impulsionada pelo fluxo de prótons do lado positivo (externo) para o lado negativo (interno) da membrana (VOET e VOET, 2013; NELSON e COX, 2014).

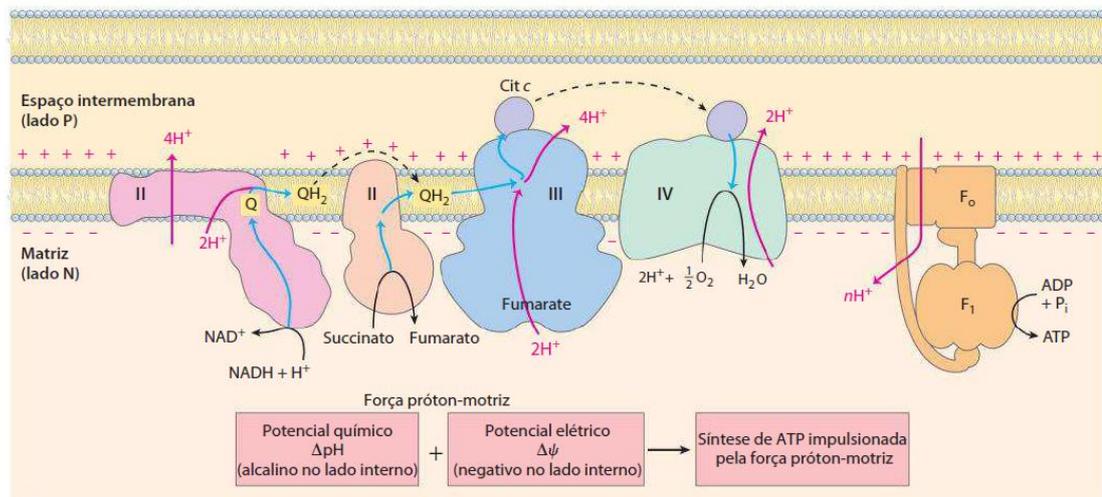


Figura 12: ATPase acoplada a cadeia transportadora de elétrons.  
O complexo I em *S. cerevisiae* é substituído por três enzimas desidrogenases.

Desde a sua descoberta, em 1959, as pesquisas sobre doenças mitocondriais vêm se tornando fruto de interesse assim como a própria mitocôndria. A fosforilação oxidativa é necessária para produção de ATP, já que é o estágio final de diversas vias de degradação. A disfunção de algum complexo da cadeia respiratória pode ser a causa de doenças que afetem tecidos que requerem grande quantidade de ATP como o cérebro, músculos esqueléticos e cardíacos (BARCELOS e HASS, 2018; NASSEH *et al.*, 2001).

## 2.4. Própolis

A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (LUSTOSA *et al.*, 2008). A própolis na colmeia atende basicamente a duas funções: mecânica (por evitar perda de calor por convecção) e química (ao garantir a assepsia, principalmente na região das crias). A própolis também protege a colônia de doenças, devido à sua eficácia antisséptica e propriedades antimicrobianas (SALGUEIRO, 2016).

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas coletadas pelas abelhas melíferas (a mais conhecida é a abelha *Apis mellifera* Lineau) de quaisquer partes do tecido vegetal, aos quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para o produto final. De modo geral a sua composição é constituída de resinas e bálsamos (50-60%), ceras (30-40%), óleos essenciais (5-10%), grãos de pólen (5%), outras substâncias

orgânicas (5%), microelementos (alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês) e vitaminas (B1, B2, B6, C e E) (CEDIKOVA *et al.*, 2014; SALGUEIRO, 2016).

Devido à grande diversidade de espécies vegetais brasileiras visitadas pelas abelhas, tem-se uma elevada variação das substâncias constituintes da própolis, conseqüentemente dos seus princípios ativos e sua coloração. Há um aumento nas pesquisas envolvendo as propriedades e a sua composição química, já que por depender da vegetação, suas propriedades antioxidantes podem variar de acordo com a localização, a vegetação, o clima, época da colheita, e até mesmo de uma colmeia para outra. Mais de 300 substâncias foram identificadas em diferentes amostras de própolis, sendo destacadas as substâncias fenólicas, tais como os ácidos fenólicos e os flavonoides, que são em grande parte responsáveis pelas atividades biológicas descritas para a própolis (SILVA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2002).

As substâncias fenólicas correspondem a aproximadamente 50% dos constituintes da própolis, mas pode ocorrer uma variação deste percentual de acordo com a região de coleta do produto. A própolis oriunda de zonas temperadas (Europa e China) possui maior teor de flavonoides do que a própolis de zonas tropicais (Brasil), que possuem maiores quantidades de substâncias fenólicas, como os fenilpropanoides prenilados e derivados do ácido cinâmico (SALGUEIRO, 2016; PEREIRA *et al.*, 2002).

Os flavonoides e ácidos fenólicos são substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas. Os ácidos fenólicos são uma classe de substâncias que se caracterizam pela presença de um anel aromático, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula. Já os flavonoides são caracterizados por um esqueleto de 15 átomos de carbono arranjado em três anéis (C6-C3-C6) (SOARES, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006). A Figura 13 mostra as estruturas básicas de ácidos fenólicos e flavonoides.

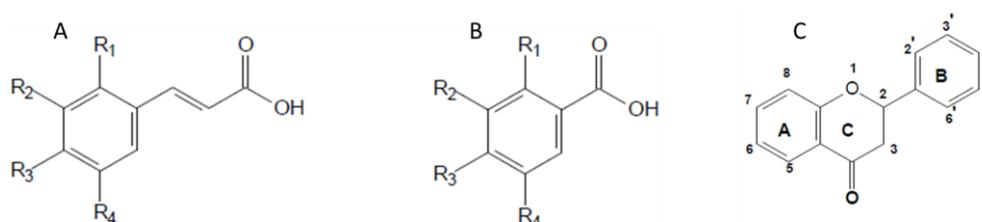


Figura 13: Estruturas básicas de ácidos fenólicos (A – derivados de ácido cinâmico e B - derivados de ácido benzoico) e de flavonoides (C).

A capacidade antioxidante das substâncias fenólicas está relacionada a fatores estruturais como o número e a posição das hidroxilas ligadas no anel aromático. O efeito de ressonância do anel aromático facilita a retirada do átomo de hidrogênio do grupamento hidroxila, tornando-se radicais relativamente estáveis formando um radical fenoxil, que não deve iniciar novas reações radiculares (Figura 14). Um segundo substituinte, grupo doador de elétrons como outra hidroxila ou um grupo metoxila, aumenta a eficiência antioxidante, diminuindo a força da ligação com o hidrogênio ácido da molécula; além de aumentar a estabilidade do radical formado (CARRÃO, 2015, OLIVEIRA *et al.*, 2006, SOARES, 2002, NEVES, 2015, PIRES, 2019; ANGELO e JORGE, DEGASPARI; GREGORIS; STEVANATO, 2010).

Derivados do ácido cinâmico apresentam capacidade antioxidante superior aos derivados correspondentes do ácido benzoico devido a dupla ligação presente neste primeiro, ajudando a estabilizar o radical, formando ressonância pelo deslocamento do elétron desemparelhado. Da mesma forma, a ação antioxidante dos flavonoides também depende dos substituintes dos anéis presentes em sua estrutura.

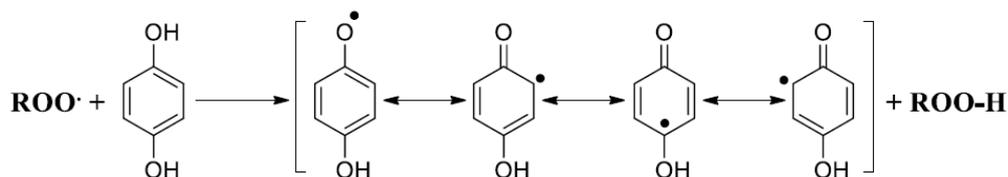


Figura 14: Estruturas de ressonância de estabilização de radical por doação de um átomo de hidrogênio de grupo hidroxila (PIRES, 2019).

Outro mecanismo que contribui para a atuação antioxidante de substâncias fenólicas é a possibilidade de atuar como quelante de metais ferro e cobre, que são catalisadores das reações de formação de radicais livres, reações de Fenton e Waber-Heiss. A figura 15 apresenta os possíveis locais de quelação dos íons metálicos na estrutura de um composto fenólico.

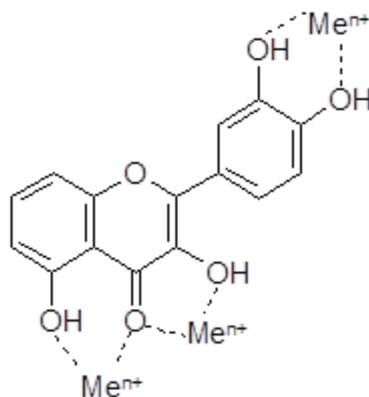


Figura 15: Representação dos locais de ligação dos flavonoides aos metais de transição (NEVES, 2015)

### 2.4.1. Própolis Verde

A existência de uma rica flora no Brasil oferece às abelhas um elevado número de plantas resiníferas de onde são coletadas as substâncias para a produção da própolis. A principal fonte vegetal para a produção da própolis da região Sudeste do Brasil é a resina coletada de botões e folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* L., conhecida popularmente como alecrim-do-campo (Figura 16). Esta planta cresce naturalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia. Esta espécie pode estar presente em diversos tipos de vegetações, e é devido a ela que a própolis verde apresenta tal coloração (GUIMARÃES *et al.*, 2012; LEMOS *et al.*, 2007).



Figura 16: Abelha na planta alecrim-do-campo (FLORIOS, 2017).

Esta planta nativa do Brasil fornece altos níveis de diferentes substâncias fenólicas, como artepelin C, que é considerado um marcador químico para este tipo de própolis. Esta molécula é muito utilizada em pesquisas por apresentar propriedades farmacológicas efetivas no tratamento do câncer. A própolis verde possui alto valor terapêutico, como também um

elevado valor comercial em relação à própolis marrom no mercado nacional e internacional (SILVA *et al.*, 2018). Seu valor por quilograma no mercado asiático, Estados Unidos e Europa é em média R\$250,00, e a produção de própolis verde (no Brasil) é de mais de 100 toneladas ao ano (Valverde, 2020).

#### **2.4.2. Propriedades Biológicas da Própolis Verde**

O interesse no estudo da própolis verde, seus fitoquímicos e as propriedades biológicas associadas aos seus extratos brutos, frações e constituintes têm sido exploradas por pesquisadores de várias áreas. Os estudos iniciais de suas propriedades datam de mais de 50 anos, contudo diferentes abordagens sobre as atividades biológicas deste tipo de própolis ainda carecem de pesquisas pormenorizadas. As propriedades biológicas da própolis brasileira têm sido amplamente investigadas nos últimos anos, atraindo principalmente o interesse de produtores e consumidores do produto natural em todo o mundo.

Mais recentemente, estudo utilizando a própolis verde em células de neuroblastoma humano demonstrou reduzir a concentração de espécies reativas e o estresse oxidativo, aumentando a expressão dos fatores críticos de eficiência da sinapse nos neurônios, fator neurotrófico (KOCOT *et al.*, 2018). Além disso, também evidenciou-se em outro estudo com este mesmo tipo celular a diminuição das espécies reativas de oxigênio provenientes de danos mitocondriais e de danos ao DNA destas células (NI *et al.*, 2017).

Também foi verificado em outros trabalhos que a própolis verde afeta o estresse oxidativo em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), agindo na consequência e não na causa da doença já que a própolis verde não exerce impacto significativo no metabolismo da glicose. Indivíduos com DM2 sofrem com o aumento da produção de EROs e danos oxidativos, indicando que as funções antioxidantes naturais estão prejudicadas. Foi observado neste trabalho, que após a ingestão da própolis verde percebeu-se eficácia em marcadores antioxidantes como carbonilas reduzidas e a quantidade da enzima LDH, significativamente menor (ZHAO *et al.*, 2016). Esta enzima lactato desidrogenase é encontrada em quase todos os tecidos, sua detecção alta no sangue é indício de algum dano celular.

Com relação à atividade antioxidante foi demonstrado que o extrato hidroalcolico de própolis verde promoveu um aumento dos níveis de RNA mensageiros associados à resposta contra o estresse oxidativo e à resposta anti-inflamatória (ZACCARIA *et al.*, 2017). Já a

atividade antibacteriana foi verificada sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa) utilizando extrato de própolis obtido por extração etanólica e por fluido supercrítico (MACHADO *et al.*, 2016). A Tabela 1 apresenta algumas das propriedades biológicas atribuídas a própolis verde.

**Tabela 1-** Propriedades biológicas avaliadas na própolis verde (PIRES, 2019).

Propriedade Biológica	Referências
Antimicrobiana	Aguiar et al., 2014; Cardoso et al., 2016;
Anti-inflamatória	Szliszka et al., 2013; Machado et al., 2014;
Anticâncer	Szliszka et al., 2011; Chan et al., 2012;
Antiparasitária	Salomão et al., 2011;
Imunomoduladora	Cheung et al., 2011; Figueiredo et al., 2014;
Antiviral	Urushisaki et al., 2011;
Laxante	Kakino et al., 2012;
Adjuvante em vacinas	Fischer et al., 2010;
Antifúngica	Dota et al., 2011; Ngatu et al., 2011;
Anti-hipertensiva	Maruyama et al., 2009;
Antioxidante	Simões-Ambrosio et al., 2010; Mello et al., 2012; Salgueiro e Castro, 2016;

Há estudos que mostram a relação diretamente proporcional entre o potencial antioxidante e a presença das substâncias fenólicas, como o flavonoide canferide, e os ácidos 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepelin C), rosmarínico e *p*-cumárico, em alimentos de origem vegetal e presentes na própolis (Figura 17) (OLIVEIRA *et al.*, 2006; ARRUDA, 2019; SALGUEIRO, 2016; SOARES, 2002; SOUZA M. L., 2017; SILVA S. M., 2018).

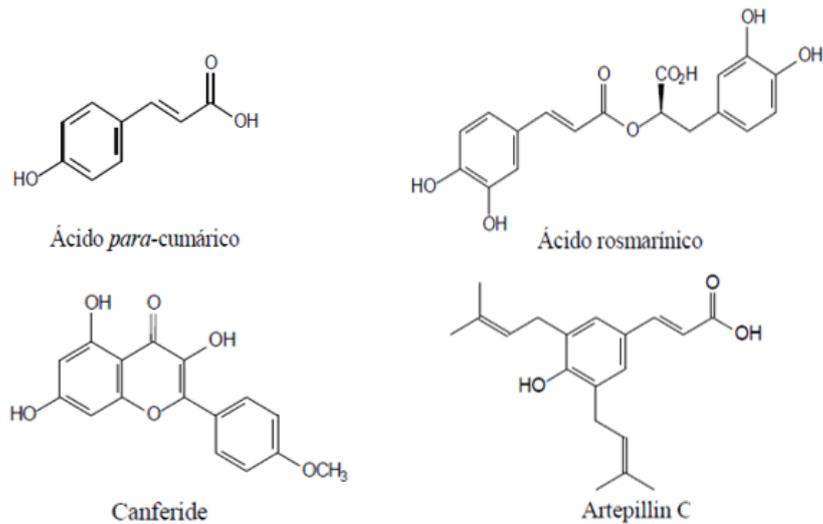


Figura 17: Estrutura química das substâncias majoritariamente encontradas na própolis verde.

### 2.4.3 Artepelin C

O artepelin C (Figura 18), o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, pode ser encontrado em diversos tipos de própolis, como a própolis produzida pelas abelhas *Frieseomelitta varia* (Lep.) (CAMPOS *et al.*, 2011), abelha sem ferrão, possuindo coloração mais amarelada; e *Apis mellifera* (BASTOS *et al.*, 2011), conhecida como abelha africanizada, com ferrão, possuindo coloração mais esverdeada. A variedade de espécies vegetais também caracteriza a porcentagem desse constituinte na própolis, contudo a *Baccharis dracunculifolia* (DC.) (alecrim-do-campo) (Figura 19) é a principal fonte botânica da própolis verde (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

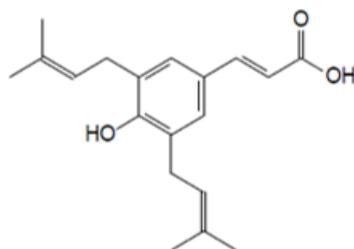


Figura 18: Estrutura química do artepelin C.



Figura 19: Foto ilustrativa do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC.).

Existem inúmeras propriedades biológicas relacionadas ao artepelin C. Essa substância é caracterizada como um dos principais componentes da própolis verde, muitas vezes associada às propriedades biológicas desse composto às propriedades biológicas apresentadas pela própolis verde. Entre essas propriedades atribuídas ao artepelin C destaca-se a atividade antitumoral, seja de forma preventiva ou pela indução indireta de apoptose em células cancerígenas (SILVA *et al.*, 2018); além disso, pode bloquear a via de sinalização disparada pela proteína quinase A (PKA1), que é uma enzima associada ao desenvolvimento de tumores neurofibromatosos, impedindo seu crescimento e proliferação (ARRUDA *et al.*, 2019). Também já foram caracterizadas atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, aumentando a quantidade de citocinas anti-inflamatórias na corrente sanguínea (MACHADO *et al.*, 2012). Na proteção antioxidante verificou-se que este composto pode reagir diretamente com as EROs, ou inibir a peroxidação lipídica (UTO *et al.*, 2006).

Tem sido descrito também, que o artepelin C apresenta atividade antiparasitária contra *Leishmania* reduzindo significativamente sua viabilidade celular (ARRUDA *et al.*, 2019); visto que não há vacina ou medicamento totalmente eficaz ou específico contra este organismo, este estudo com artepelin C e outros compostos fenólicos são de crucial importância para combater esta doença infecciosa. É o caso do ácido rosmarínico, outro importante constituinte da própolis verde que pode promover a deformação da membrana celular deste parasita diminuindo seu tempo de vida (FALCÃO *et al.*, 2013).

#### 2.4.4 Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico (Figura 20) é um éster dos ácidos cafeico e do 3,4-diidroxifenil-lático, e possui este nome pois foi isolado pela primeira vez das folhas da espécie vegetal *Rosmarinus officinalis* L; entretanto está presente em diversas plantas, sendo abundante em espécies vegetais da família Lamiaceae, como *Mentha spicata* e *Melissa officinalis* L (Figura 21). A presença do ácido rosmarínico dá às diversas plantas atividades farmacológicas e biológicas, como, por exemplo, a capacidade antioxidante relacionada com sua ação neuroprotetora (SOODI, 2017; OLIVEIRA, 2010).

Soodi e colaboradores (2017) utilizaram em seu estudo células granulares cerebelares de camundongo e induziram toxidez por adição de peptídeos  $\beta$ -amiloide, indutor da doença de Alzheimer, e posteriormente tratadas com extrato de *M. officinalis*. O tratamento foi capaz de reverter a toxidez e aumentou a viabilidade celular, mostrando proteção aos neurônios, além de ação antioxidante diminuindo a peroxidação lipídica e a quantidade de EROs intracelular. O extrato também foi capaz de reduzir o número de células apoptóticas e diminuir a atividade da caspase-3.

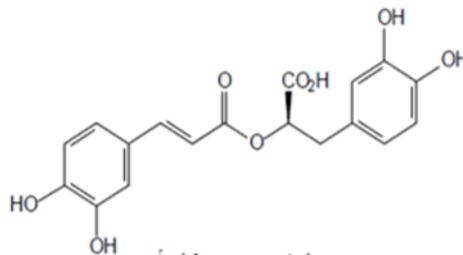


Figura 20: Estrutura química do ácido rosmarínico.



Figura 21: Foto ilustrativa do alecrim-da-horta (*Rosmarinus officinalis* L.).

Há estudos que citam outras propriedades biológicas do ácido rosmarínico, tais como atividades anti-inflamatória (XU *et al.*, 2020), anticâncer (SILVA *et al.*, 2018), bactericida (MACHADO *et al.*, 2016), antiviral e antialérgica (SWISLOCKA, 2019). Waer et al (2020) mostraram que o ácido rosmarínico pode ajudar a inibir a proliferação e o crescimento de células cancerígenas, enquanto para células saudáveis houve baixíssima toxicidade, revelando que esta substância é promissora em pesquisas voltadas para ação antitumoral, uma vez que o tratamento com ácido rosmarínico foi capaz de induzir o aumento de enzimas antioxidantes. Células cancerígenas apresentam altas quantidade de EROs como  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ , e após a incubação o ácido rosmarínico foi observada uma diminuição da quantidade de peróxido produzida, além de diminuir o óxido nítrico, outra espécie reativa.

### 3. OBJETIVO

Avaliar o potencial antioxidante de extratos de própolis verde e de dois de seus constituintes sobre a atividade mitocondrial em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Determinar concentrações não citotóxicas dos extratos etanólico e hexânico de própolis verde e de dois de seus constituintes (artepelin C e ácido rosmarínico) em modelo biológico eucarioto;
- Quantificar o potencial redox dos extratos de própolis verde, do artepelin C e do ácido rosmarínico em células de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Verificar alterações na função mitocondrial causadas pelos extratos de própolis verde, do artepelin C e do ácido rosmarínico em um modelo biológico eucarioto sob estresse oxidativo;
- Verificar uma possível correlação entre o potencial antioxidante dos extratos de própolis verde, do artepelin C e do ácido rosmarínico com a atividade mitocondrial das células de *S. cerevisiae*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Meios de Cultura

Para este estudo foram utilizados diferentes meios de cultivo:

- YPD líquido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco, EUA), 2% de peptona (Difco, EUA) e 2% de glicose (Vetec, Brasil);
- YPD sólido, composição idêntica ao YPD líquido com adição de 2% de ágar (Difco, EUA) para solidificar o meio;
- YPGly líquido, composto de 1% de extrato de levedura (Difco, EUA), 2% de peptona (Difco, EUA) e 4% de glicerol (Vetec, Brasil);
- YPGly sólido, composição idêntica ao YPGly líquido com adição de 2% de ágar (Difco, EUA) para solidificar o meio.

Os erlenmeyers contendo os meios líquidos foram preparados obedecendo a razão de 5/1 de volume do frasco/meio de cultura no frasco. Os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm por 15 minutos. Os meios sólidos eram vertidos em placas de Petri estéreis no ambiente de fluxo laminar (Cabine horizontal com filtro ULPA, Marca Esco®).

### 4.2 Microrganismo e Condição de Cultivo

Utilizou-se a cepa BY4741 de *S. cerevisiae* com seu genoma íntegro; adquirida da companhia Euroscarf (<http://www.euroscarf.de/>), em Frankfurt, na Alemanha; e armazenada em meio sólido YPD 2% a 4 °C.

#### 4.2.1 **Repique**

Os repiques foram preparados através da transferência de alçada de cultura estoque de *S. cerevisiae* para um tubo *vial* contendo YPD 2% sólido inclinado. Este tubo foi incubado a 30 °C por 24 horas em estufa incubadora refrigerada (BOD, Marca SOLAB®) para ter sempre células filhas viáveis e metabolicamente ativas, evitando leveduras que se encontram no processo de envelhecimento.

#### **4.2.2 Inóculo**

Para o preparo do inóculo, uma alçada com células do repique fresco foi transferida para erlenmeyer contendo 100 mL de meio YPD líquido. O inóculo foi incubado a 28 °C por 22 horas sob agitação de 160 rpm em incubadora tipo shaker (Incubadora orbital refrigerada, Marca NOVATECNICA<sup>®</sup>). Após o crescimento das células, a concentração das mesmas foi determinada através da medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Vis, Marca Biospectro<sup>®</sup>) a 570 nm de uma suspensão celular convertida em massa de célula (mg de peso seco de célula/mL de meio de cultura).

A fim de se trabalhar com as células na fase diáuxica ou na segunda fase de crescimento exponencial, para que as células já tenham os genes mitocondriais expressos, ou seja, metabolismo respiratório ativado; os inóculos eram retirados para as subseqüentes análises quando a densidade óptica do meio de cultivo correspondia a concentrações entre 2,0 e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.3 Fator de Conversão de Absorvância para Concentração**

Preparou-se o inóculo com concentração desconhecida através da inoculação de alçada de repique fresco em 100 mL de meio YPD líquido estéril. Após 24 h de incubação sob agitação a 160 rpm em shaker a 28 °C, uma alíquota de 10 mL foi retirada e transferida para tubo tipo falcon previamente pesado e reservou-se. Efetuaram-se diluições 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:250 do inóculo crescido. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 570 nm.

A alíquota de 10 mL reservada foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com água destilada estéril. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o tubo de ensaio foi colocado em estufa a 60 °C por 72 h. Através da massa de células contida nos 10 mL de meio foi calculada a concentração do inóculo inicial; e, com as absorvâncias das diluições, foi estabelecido uma curva padrão e o fator de conversão de absorvância em concentração (mg.mL<sup>-1</sup>).

#### **4.4 Amostras Avaliadas**

As amostras analisadas neste trabalho compreenderam dois diferentes extratos de própolis verde (hexano e etanol), além de duas substâncias encontradas na própolis verde

(artepelin C e ácido rosmarínico), que foram selecionadas dentre uma série de compostos fenólicos e flavonoides identificados. Os extratos de própolis e as amostras puras foram cedidas pela professora Rosane Nora Castro do Laboratório de Química Medicinal e Laboratório de Química do Mel da UFRRJ.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados extrato etanólico de própolis verde (EEP) e extrato hexânico de própolis verde (EHP). Os extratos foram todos preparados em extrator Soxhlet, partindo-se de 3,0 g da amostra de própolis verde bem triturada compactadas em cartucho de celulose. As amostras foram extraídas separadamente por 6 h com 150 mL de etanol P.A. (96%) e 150 mL de *n*-hexano (P.A.) (PIRES, 2019). Após o tempo de extração, os solventes foram removidos com auxílio de evaporador rotativo e os extratos brutos secos foram solubilizado em etanol P.A. (95%), obtendo soluções na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

As substâncias presentes na própolis que foram escolhidas para desenvolver este trabalho foram o ácido rosmarínico (produto comercial, 98% pureza) e o artepelin C (isolado da própolis com 98% de pureza; PIRES, 2019). Estas substâncias foram preparadas nas concentrações de 2,5 µg.mL<sup>-1</sup> e 1,9 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente; em uma mistura de etanol e água destilada na proporção 1:1. O artepelin C foi isolado do extrato hexânico da própolis verde com 98% de pureza (PIRES, 2019) e o ácido rosmarínico utilizado nos experimentos foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich, com 98% de pureza.

A concentração de etanol que começa a ser tóxica para as leveduras é de 5% (SCHIAVONE *et al.*, 2016; STANLEY *et al.*, 2010); e a concentração atingida nas culturas celulares durante os ensaios foi de no máximo 2%.

## **4.5 Tratamento Inicial**

### **4.5.1 Extratos de Própolis**

Um volume da suspensão celular contendo 20 mg de células foi transferido para erlenmeyers de 50 mL e os extratos etanólico de própolis (EEP) e o extrato hexânico de própolis (EHP) foram adicionados nas concentrações de 25 µg.mL<sup>-1</sup>, 50 µg.mL<sup>-1</sup>, 100 µg.mL<sup>-1</sup> e 200 µg.mL<sup>-1</sup>. O volume da cultura celular nestes erlenmeyers sempre foi de aproximadamente 10,0 mL. A fim de comparação foi adicionado o mesmo volume de células em um erlenmeyer para ser o controle negativo e um outro erlenmeyer com 2,0 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

para ser o controle positivo para estresse. Todos foram mantidos no shaker por 1 hora a 28 °C/160 rpm, como ilustrado na Figura 22.

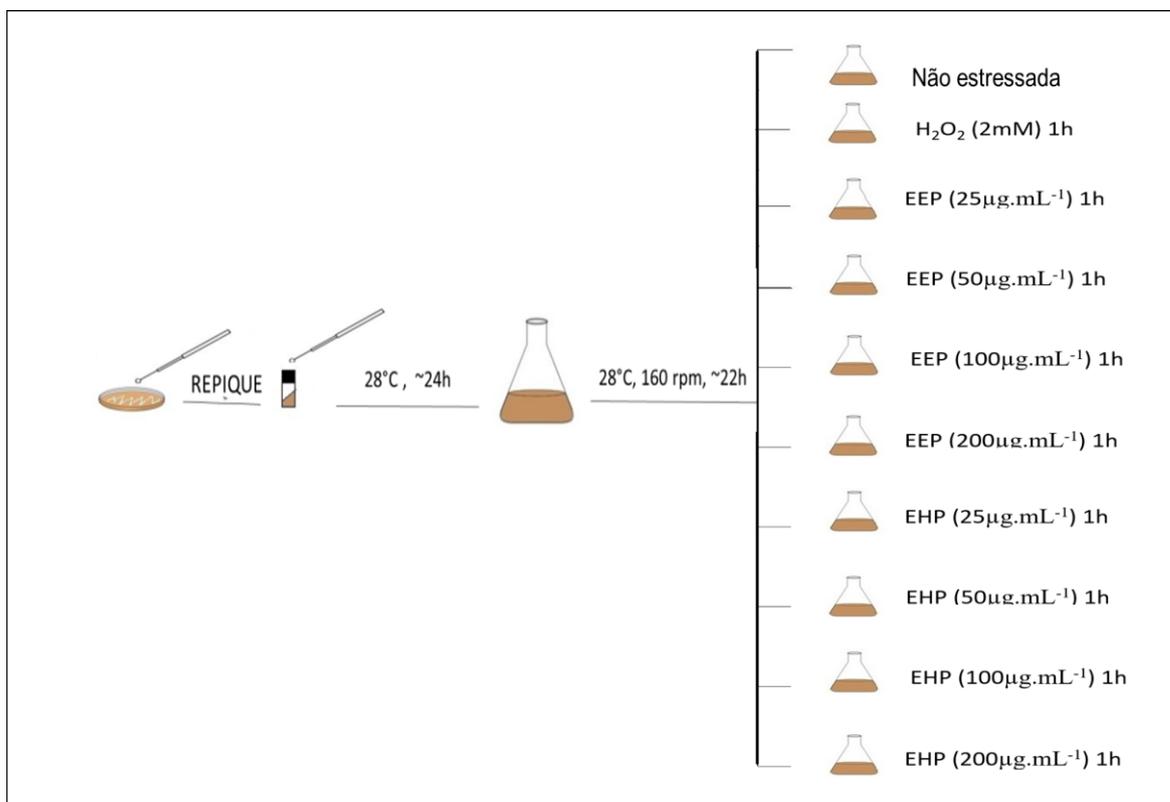


Figura 22: Metodologia do tratamento inicial.

#### 4.5.2 Substâncias puras da Própolis Verde

Um volume da suspensão celular contendo 20 mg de células foi colocado em erlenmeyers de 50 mL e adicionadas o ácido rosmarínico (AR) e artepelin C (AC), separadamente, nas concentrações de 2,5 µg.mL<sup>-1</sup> e 1,9 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Como para os extratos, o volume da cultura celular neste erlenmeyers sempre foi de aproximadamente 10,0 mL, e novamente para fins de comparação dos resultados, foi adicionado o mesmo volume da suspensão celular em um erlenmeyer para ser o controle negativo e um outro erlenmeyer contendo 2,0 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para ser o controle positivo para estresse. Todos foram mantidos no shaker por 1 hora a 28 °C/160 rpm.

#### 4.6 Toxidez e Vitalidade Celular dos Extratos de Própolis

Neste ensaio foi utilizada uma solução da substância resazurina (azul), que quando reduzida produz o composto resorufina (rosa) (Figura 23), que apresenta fluorescência em um determinado comprimento de onda. A medição da fluorescência foi feita em leitor de microplacas de 96 poços CHAMELEON V (Hidex Oy<sup>®</sup>), e sua quantificação foi realizada através da incidência de luz de excitação nas amostras em cada poço da placa, e a luz de emissão é coletada pelo detector através do conjunto de filtro e lente escolhidos, utilizando-se os comprimentos de onda de 534 nm (excitação) e 590 nm (emissão). A fosforescência da placa deve ser levada em consideração ao utilizar filtros para fluorescência, pois os filtros utilizados pelo equipamento apresentam sensibilidade ao vermelho e algumas microplacas brancas emitem alta fosforescência nessa região, portanto foi utilizada placa de cor preta para não interferir na análise.

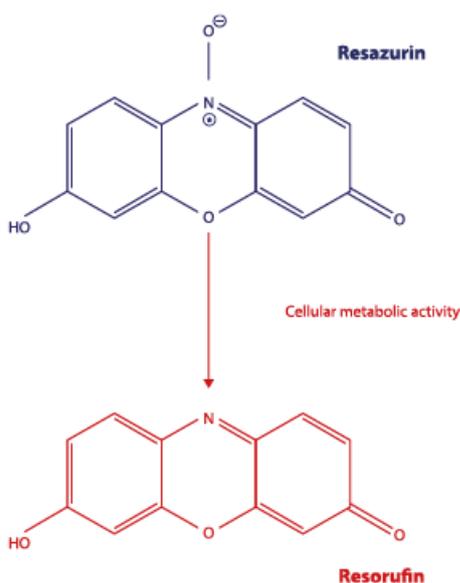


Figura 23: Redução da resazurina em resorufina.

Após o tratamento inicial, o volume da suspensão celular de cada erlenmeyer foi recolhido e centrifugado em tubos tipo falcon estéreis a 5000 rpm por 5 minutos. A suspensão celular foi lavada duas vezes com água destilada estéril. As células foram ressuspensas em 4,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) com 1% de glicose, obtendo concentração final de 5,0 mg.mL<sup>-1</sup> de suspensão celular. Uma alíquota dessa suspensão celular (1,0 mL) foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril, junto com 200 µL de uma solução de resazurina (0,01% em água destilada estéril). Essa mistura foi incubada no shaker por 1 hora

(Figura 24). Após esse tempo de incubação os microtubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos e 100  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços própria para a quantificação da fluorescência.

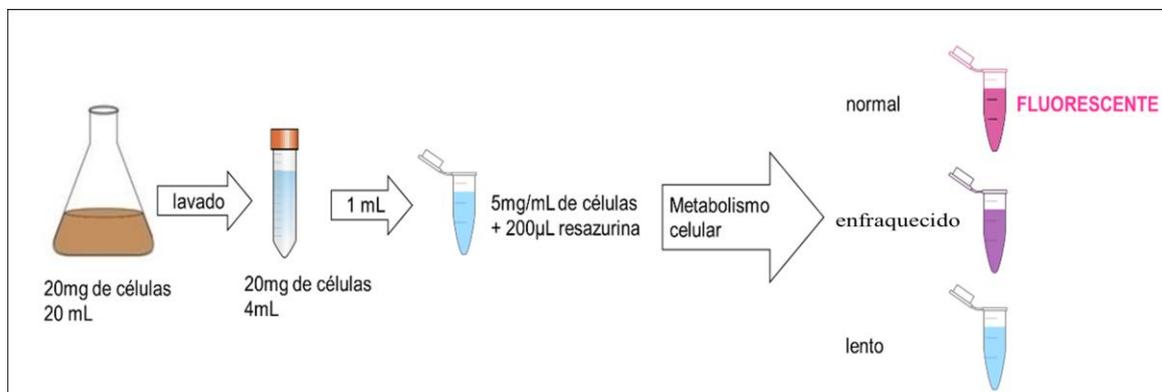


Figura 24: Metodologia da toxicidade e vitalidade celular.

#### **4.7 Peroxidação Lipídica**

Após o tratamento inicial com os extratos de própolis (neste experimento, o erlenmeyer utilizado foi o de 125 mL), um volume de suspensão celular correspondente a 50 mg de células foi recolhido e centrifugado em tubos tipo falcon estéreis a 5000 rpm por 5 minutos. A suspensão celular foi lavada duas vezes com água destilada gelada estéril. As células foram ressuspensas em 50 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,0) e foram transferidas para os erlenmeyers de 125 mL anteriores, sempre em ambiente estéril. O peróxido de hidrogênio foi adicionado na concentração de 2,0 mM e a incubação ocorreu por 1 h sob agitação a 28 °C/160 rpm. Os tubos falcon contendo as células centrifugadas não estressadas e estressadas foram mantidos no gelo até o ensaio propriamente dito.

Após o estresse repetiu-se o processo de lavagem das células que estavam incubadas com peróxido de hidrogênio, sendo, em seguida, ressuspensas em 500  $\mu$ L de TCA 10% (ácido tricloroacético) e transferidas para tubo de ensaio de parede grossa. Adicionou-se a esse tubo 1,5 g de pérolas de vidro (40  $\mu$ m) e as células foram lisadas sob agitação vigorosa com 6 ciclos de 20 segundos no vortex (agitador de tubos, Marca Gehaka<sup>®</sup>) e 20 segundos no gelo. O extrato foi recolhido em microtubos e as pérolas de vidro lavadas adicionando-se 500  $\mu$ L de TCA 10% (Vetec), com o sobrenadante recolhido nos mesmos microtubos. Após a lise celular, os extratos celulares passaram por uma centrifugação a 4000 rpm, o sobrenadante foi coletado e utilizado

para as análises de peroxidação lipídica através do método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

O ensaio foi realizado com a mistura reacional contendo 150  $\mu\text{L}$  de extrato celular, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1 M (Vetec) e 600  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (Merck) 1% em NaOH 0,05 M. Também foi preparado um branco reacional contendo 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  sem o extrato celular. A mistura reacional foi incubada a 100  $^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e a absorvância foi medida espectrofotometricamente a 532 nm. A dosagem foi feita em duplicata e os resultados expressos em picomols de malonaldeído (MDA – produto da peroxidação lipídica) por miligrama de células (pmols MDA/mg cel) (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994). O produto final gerado é o resultado da reação do ácido tiobarbitúrico com o malonaldeído (MDA) produzido durante a peroxidação dos lipídios de membrana (Figura 25).

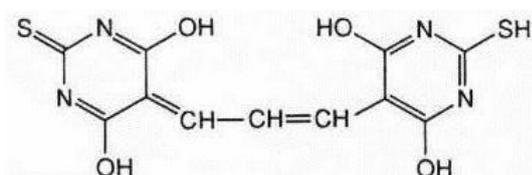


Figura 25: Produto formado a partir da reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído.

Um segundo experimento de peroxidação lipídica foi realizado modificando-se alguns parâmetros, como o aumento na concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizado-se 20 mM no ensaio com as substâncias isoladas, além de só utilizar as concentrações intermediárias dos extratos etanólico e hexânico, 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **4.8 Sobrevivência por Viabilidade Celular**

Após o tratamento inicial com os extratos de própolis ou com as substâncias isoladas, uma alíquota das células tratadas e dos controles sem estresse e sob estresse foram retiradas para a determinação da densidade óptica das suspensões celulares, e um volume correspondente a 40  $\mu\text{g}$  das células tratadas com os extratos e os controles foi diluído em microtubos, contendo 1,0 mL de água destilada estéril; e, subsequentemente, uma alíquota de 0,1 mL foi espalhada por alça de Drigalski sob os meios sólidos YPD 2% e YPGly 4%. As placas foram incubadas a 30  $^\circ\text{C}$  por 48 h e 96 h, respectivamente, para posterior visualização do crescimento celular. A

viabilidade celular foi determinada comparando-se o número de colônias das células tratadas com as substâncias com os controles (negativo e positivo).

#### **4.9 Atividade Antioxidante por Disfunção Mitocondrial**

Após o tratamento inicial com os extratos de própolis ou com as substâncias isoladas, as células foram estressadas com 2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora e posteriormente retirou-se alíquotas dos ensaios para a determinação da densidade óptica das suspensões celulares e um volume correspondente a 40 µg de células foi diluído em microtubos, contendo 1,0 mL de água destilada estéril; e, subsequentemente, uma alíquota de 0,1 mL foi espalhada por alça de Drigalski sob os meios sólidos YPD 2% e YPGly 4%. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e 96 h, respectivamente, para posterior visualização do crescimento celular. E novamente, a viabilidade celular foi determinada pela contagem das colônias e comparando-se com os controles (negativo e positivo).

#### **4.10 Consumo de Oxigênio**

Na realização dessa análise, as células tratadas com os extratos de própolis ou com as substâncias isoladas e posteriormente estressadas juntamente com os controles foram transferidas para tubos tipo falcon e lavadas com água destilada estéril. As células foram ressuspensas em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,0) e uma alíquota de 150 µL dessa suspensão celular foi utilizada na câmara do oxígrafo.

O consumo de oxigênio foi medido em um oxígrafo utilizando um eletrodo do tipo Clark (Oxytherm, Hansatech Instrument<sup>®</sup>) inserido em uma câmara com capacidade de 2,0 mL com um agitador magnético incluso. Depois de calibrar o eletrodo a 28 °C entre 0 e 100% de saturação com o oxigênio atmosférico, foi transferido para a câmara 1830 µL do mesmo tampão fosfato em que as células foram ressuspensas em 20 µL de solução de glicose (9,0 mM). Com a adição das células na câmara, a respiração basal foi registrada representando o consumo de oxigênio das células de levedura.

Com o interesse em avaliar a capacidade máxima da cadeia transportadora de elétrons e a diferença entre o consumo de oxigênio na respiração basal e o consumo máximo foi adicionado 20 µL do cianeto de carbonila 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona (FCCP) (10 µM

em etanol), chegando a uma concentração de 0,01  $\mu\text{M}$  do ionóforo. A concentração utilizada foi determinada após uma titulação com FCCP, chegando a uma resposta máxima após adicionar diferentes concentrações do mesmo. FCCP é uma molécula capaz de transportar os prótons do espaço intermembranar à matriz mitocondrial desacoplando o consumo de oxigênio da síntese de ATP.

#### **4.11 Toxidez e Vitalidade Celular com as Substâncias Puras da Própolis**

Em um dos poços da placa de 96 poços foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  contendo meio de cultura YPD 2% e soluções do ácido rosmarínico e de artepelin C numa concentração de 160  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  dessa mistura para o poço seguinte já contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio YPD 2%, para que a concentração fosse a metade do poço anterior; e assim foi feito em todos os poços das linhas A a H.

Ao longo dos 8 poços de cada coluna (1 a 3 e 6 a 8) as concentrações de exposição foram de 160  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  à 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Preparado o experimento, a placa de 96 poços ficava em ambiente estéril incubada por 1 hora e posteriormente foi adicionada a solução de resazurina (coloração azul) a fim de caracterizar a faixa de concentração que apresentasse toxicidade às células. Após 1 hora foi possível visualizar qualitativamente os resultados obtidos.

#### **4.12 Análise Estatística**

Os resultados são apresentados como uma média e desvio padrão de três experimentos independentes, no mínimo. O teste de análise de variância ANOVA foi aplicado seguido de teste póstumo de Tuckey para comparação das diversas médias. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . A representação com letras diferentes mostra resultados estatisticamente distintos em todos os gráficos apresentados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Salgueiro (2016) isolou e quantificou ácidos e flavonoides presentes em 12 amostras de própolis verde brasileira, além de fazer extratos com diferentes solventes, determinar os teores de fenóis e flavonoides totais, e determinar a capacidade antioxidante, através dos ensaios *in vitro*.

Segue a tabela 2 com os resultados obtidos no trabalho de Salgueiro (2016) para os extratos etanólico de própolis.

**Tabela 2** – Teores de fenóis totais (TP), flavonoides totais (TF) e da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos (EEP) apresentados em suas médias e desvios padrão.

Amostras	TP <sup>a</sup>	TF <sup>b</sup>	Capacidade Antioxidante		
			FRAP <sup>c</sup>	ABTS <sup>d</sup>	DPPH-CE <sub>50</sub> <sup>e</sup>
EEP1	8,74 ± 0,01	7,31 ± 0,01	260,79 ± 0,03	98,65 ± 0,09	42,58 ± 0,02
EEP2	7,90 ± 0,02	5,21 ± 0,01	487,74 ± 0,02	99,03 ± 0,06	36,84 ± 0,09
EEP3	1,37 ± 0,01	0,63 ± 0,01	482,18 ± 0,02	84,86 ± 0,01	52,76 ± 0,04
EEP4	14,43 ± 0,01	9,71 ± 0,01	384,96 ± 0,03	157,62 ± 0,01	35,61 ± 0,12
EEP5	11,88 ± 0,07	8,73 ± 0,06	395,79 ± 0,03	128,89 ± 0,04	30,65 ± 0,02
EEP6	7,15 ± 0,01	5,59 ± 0,01	289,41 ± 0,01	116,64 ± 0,09	51,27 ± 0,04
EEP7	6,86 ± 0,02	4,96 ± 0,02	341,63 ± 0,01	123,73 ± 0,15	56,71 ± 0,02
EEP8	10,57 ± 0,03	4,56 ± 0,02	381,35 ± 0,01	136,36 ± 0,05	50,33 ± 0,05
EEP9	9,16 ± 0,02	1,45 ± 0,02	291,91 ± 0,01	149,95 ± 0,02	35,79 ± 0,05
EEP10	8,46 ± 0,01	2,28 ± 0,01	283,29 ± 0,02	110,14 ± 0,02	31,95 ± 0,01
EEP11	9,89 ± 0,02	3,40 ± 0,01	332,74 ± 0,01	112,43 ± 0,02	39,75 ± 0,06
EEP12	10,47 ± 0,02	5,87 ± 0,02	608,85 ± 0,03	142,68 ± 0,04	32,98 ± 0,05

FRAP - Redução do íon férrico; ABTS - Captura do radical-cátion (ABTS<sup>+</sup>); DPPH – Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil; a- mg EAG 100mg<sup>-1</sup> de extrato; b – mg EQE 100mg<sup>-1</sup> de extrato; c- mmol Fe(II) 100mg<sup>-1</sup> de extrato; d- mmol Trolox 100mg<sup>-1</sup> de extrato; e- µg mL<sup>-1</sup>; média ±desvio padrão, n=3

Concluiu-se que os extratos etanólico de própolis 4 e 12 (EEP4 e EEP12) foram os que de forma geral apresentaram melhores resultados quanto a capacidade antioxidante nos três métodos testados *in vitro*. EEP4 apresenta os maiores valores de fenóis e flavonoides totais. Nesse trabalho, analisando os extratos de própolis em diferentes solventes, Salgueiro (2016) conseguiu relacionar os teores de substâncias fenólicas e a capacidade antioxidante com altas concentrações de artepelin C, ácido rosmarínico, canferide e ácido *p*-cumárico.

Sendo assim, a fim de avaliar a atividade antioxidante utilizando modelo biológico eucarioto, decidiu-se no presente trabalho utilizar o extrato etanólico EEP4, assim como o

extrato hexânico da mesma própolis a fim investigar se há diferenças devido ao caráter mais apolar das substâncias presentes. Além disso também avaliou-se o potencial antioxidante do biomarcador da própolis verde, artepelin C, e do ácido rosmarínico, que foi pela primeira vez encontrado numa própolis verde produzida no Rio de Janeiro (SALGUEIRO e CASTRO, 2016). Os experimentos foram realizados *in vivo* utilizando como modelo biológico a levedura *S. cerevisiae*.

### **5.1 Toxidez e Vitalidade Celular**

A vitalidade celular é definida como a capacidade metabólica de uma célula, onde os efeitos tóxicos de fatores químicos ou físicos podem não levar diretamente à morte celular, mas podem causar uma série de alterações intracelulares e metabólicas que resultarão na incapacidade de uma célula de se dividir. Em condições de estresse oxidativo intracelular haverá uma menor quantidade de enzimas disponíveis e ativas para produzir moléculas redutoras, e a quantidade destas pode não ser o suficiente para reagir com a resazurina e alterar sua coloração de azul para rosa (resorufina). Esta substância permite distinguir entre células metabolicamente ativas, enfraquecidas ou sem atividade metabólica.

A produção de moléculas redutoras está diretamente relacionada com vias metabólicas (fermentação e respiração, por exemplo); assim, quanto mais metabolicamente ativa a célula estiver, maior será a produção de moléculas redutoras. A resazurina atua como um acceptor de elétrons, reagindo com as moléculas redutoras e gerando a resorufina, composto de coloração rosa perceptível a olho nu que tem a capacidade de emitir fluorescência; portanto, quanto mais ativa esta célula estiver, mais rosa e mais fluorescente estará a suspensão celular (MORAES, 2017, TECZA e MIREK, 2014).

Avaliou-se a toxidez dos extratos etanólico e hexânico em diferentes concentrações pelo método da resazurina, analisando conseguinte a perda de vitalidade celular das leveduras quando expostas aos extratos. Depois de determinada a fase de crescimento e a concentração do inóculo a serem utilizadas neste experimento, foram selecionadas diferentes concentrações dos extratos de própolis (25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) baseadas em trabalhos anteriores (SALGUEIRO, 2016, SÁ *et al.*, 2013).

Durante os ensaios também foram realizados dois experimentos controle juntamente com quatro concentrações diferentes dos dois extratos de própolis verde, o controle (controle

negativo - CN) e as células estressadas com peróxido de hidrogênio (controle positivo - CP). O controle representa apenas células em meio de cultura, onde estas células não foram expostas a nenhuma substância que possa estressá-las ou influenciar significativamente no seu metabolismo. Este controle representou 100% de vitalidade (Figura 26). As células estressadas foram expostas a 2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substância extremamente tóxica para as células nessa concentração. Por ser uma espécie reativa de oxigênio altamente oxidante, esta substância pode afetar o metabolismo celular oxidando biomoléculas presentes nas células.

Após a incubação das células de levedura com as substâncias de interesse por 1 hora ocorreram duas lavagens com água destilada estéril. É interessante ressaltar que a lavagem retira os compostos fenólicos do meio sobrenadante, bem como o peróxido de hidrogênio; permitindo assim avaliar apenas a ação das substâncias que provavelmente foram absorvidas pela levedura. O resultado obtido neste experimento pôde ser analisado de forma qualitativa (Figura 26a) e quantitativa (Figura 26b).

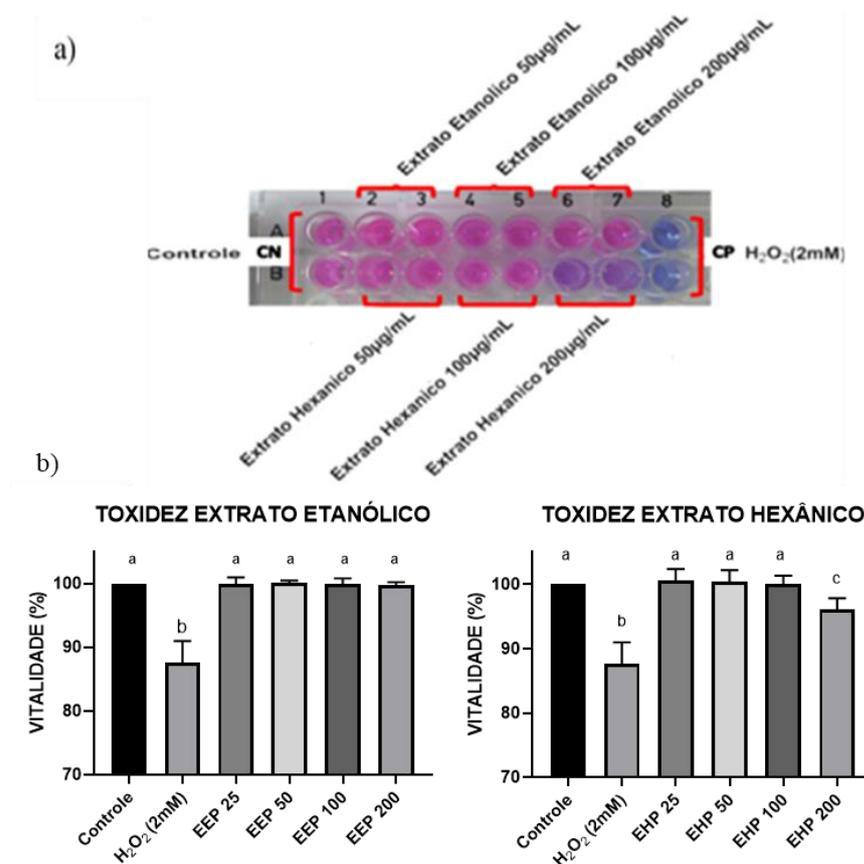


Figura 26: Vitalidade das células de levedura expostas a diferentes concentrações dos extratos etanólico (EEP) e hexânico (EHP) por 1 hora. a) Resultado da coloração obtida no experimento. b) Gráficos obtidos pelos valores, em porcentagem, das leituras de fluorescência.

Na figura 26a observa-se que o extrato hexânico da própolis (EHP) apresenta leve toxidez na concentração de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , característica de uma coloração roxa indicando uma quantidade menor de resorufina formada, conseqüentemente revelando que o metabolismo destas células está enfraquecido. Já com o extrato etanólico da própolis (EEP) nenhuma concentração utilizada mostrou ser tóxica, sendo qualitativamente iguais ao controle (CN).

De acordo com um estudo anterior, o extrato etanólico da própolis brasileira originária do município de Guarapari-ES também não mostrou-se tóxica para as células de *S. cerevisiae* nas concentrações avaliadas ( $25 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (SÀ *et al.*, 2013), obtendo-se uma tolerância de 100% assim como foi observado neste trabalho. Corroborando os resultados obtidos com o extrato etanólico da própolis verde, o trabalho de Silva *et al.* (2018), que utilizou concentrações de  $137,5$  a  $550 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, também não apresentou toxidez mostrando similaridade entre os resultados.

As células estressadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram coloração azul, indicando que o metabolismo das células estava lento, não sendo possível visualizar a alteração de cor.

Nos resultados obtidos de forma quantitativa (Figura 26b) todos os tratamentos com o extrato etanólico e as três primeiras concentrações do extrato hexânico apresentaram valores próximos a 100%, sendo estatisticamente iguais entre si; enquanto as células estressadas e o extrato hexânico de maior concentração (EHP200) mostraram  $87,60\% \pm 3,4$  e  $96,06\% \pm 1,8$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os resultados quantitativos revelam coerência com a análise qualitativa, visto que EHP200 mostrou-se com coloração arroxeadada, o que revela certa toxidez se comparado com o controle, mas com menor toxicidade que o controle positivo (azul). No gráfico da figura 26b é apresentado o mesmo perfil, onde ocorre uma diminuição da vitalidade referente a EHP200 em comparação com controle, bem como uma menor toxidez quando comparada com as células estressadas, além de serem estatisticamente diferentes entre si.

A análise estatística dos dados confirma que os valores de fluorescência obtidos das diferentes concentrações do extrato etanólico e as três primeiras concentrações do extrato hexânico são estatisticamente iguais ao controle negativo e diferentes das células estressadas ( $p < 0,05$ ). O valor do extrato hexânico de maior concentração é estatisticamente diferente do controle negativo e das células estressadas ( $p < 0,05$ ). Estes resultados indicam também que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração utilizada realmente é tóxico para as leveduras a ponto de não apresentar suficiente produção de moléculas redutoras como NADH, por exemplo, presentes em quantidade suficiente para reagir com resazurina e produzir resorufina em quantidade similar

às células controle. Ao tratar com peróxido de hidrogênio induzimos as células ao estresse oxidativo ocasionando a diminuição da atividade das enzimas relacionadas às vias metabólicas, ou seja, menos moléculas redutoras são produzidas (MORAES, 2017).

No trabalho de Moraes (2017), o autor verificou a viabilidade e a vitalidade celular de uma cepa da levedura *Saccharomyces pastorianus* pela técnica de coloração por azul de metileno, onde as células coradas são consideradas não-viáveis e as células não-coradas, viáveis, e pelo método da resazurina, respectivamente. Os resultados apresentaram na viabilidade celular uma sobrevivência de 60,5% e na vitalidade, uma coloração roxa, demonstrando que a vitalidade celular pode ser analisada através da redução da resazurina; sendo então considerados não tóxicos apenas àquelas suspensões celulares que possuem coloração rosa fluorescente referente à resorufina. Entretanto, um outro ensaio seria importante para demonstrar, comparando-se a toxidez com o peróxido de hidrogênio, se os extratos utilizados não apresentam toxidez.

## **5.2 Atividade Antioxidante pelo Método TBARS**

O malonaldeído (MDA) é um biomarcador importante na detecção do estresse oxidativo utilizado em diversos trabalhos (M. B. ALMEIDA 2014; MENDONÇA *et al.*, 2014). O MDA é um dos produtos finais da peroxidação lipídica, ocasionada por uma cascata de reações nas membranas celulares impulsionadas pela ação das espécies radicalares presentes no citoplasma, inclusive oriundas do metabolismo celular. Essas reações podem causar danos estruturais nas células, alterando a permeabilidade na membrana e o fluxo de substâncias intra e extracelulares (FRANÇA *et al.*, 2013).

Novamente foram realizados ensaios com controle negativo e controle de células estressadas, além de quatro concentrações dos extratos etanólico e hexânico. As células estressadas foram expostas a 2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foi confirmado pelo ensaio de vitalidade celular ser tóxico para as células nessa concentração. Após o tratamento da suspensão celular com as substâncias de interesse por 1 hora, as células foram estressadas com peróxido de hidrogênio na mesma concentração utilizada no controle de células estressadas (2,0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubadas em tampão fosfato de sódio por mais 1 hora. É interessante ressaltar que após cada incubação as células foram lavadas para retirar os compostos fenólicos do meio

sobrenadante, assim como o peróxido de hidrogênio, permitindo assim avaliar apenas a ação das substâncias que provavelmente foram absorvidas pelas células.

Os resultados da peroxidação lipídica permitem a análise da situação redox intracelular, avaliando se os diferentes tratamentos possuem atividade antioxidante, impedindo e/ou reduzindo os danos causados nas membranas celulares. Quanto menor for a concentração de malonaldeído nas células, maior será o poder antioxidante dos tratamentos nas amostras analisadas. De acordo com o esperado (Figura 27), o controle ( $62,25 \pm 26,62$  pmols de MDA/mg células) e as células estressadas ( $179,0 \pm 30,35$  pmols de MDA/mg células) apresentaram valores distintos estatisticamente, visto que no último as células ficam em contato direto com o agente oxidante.

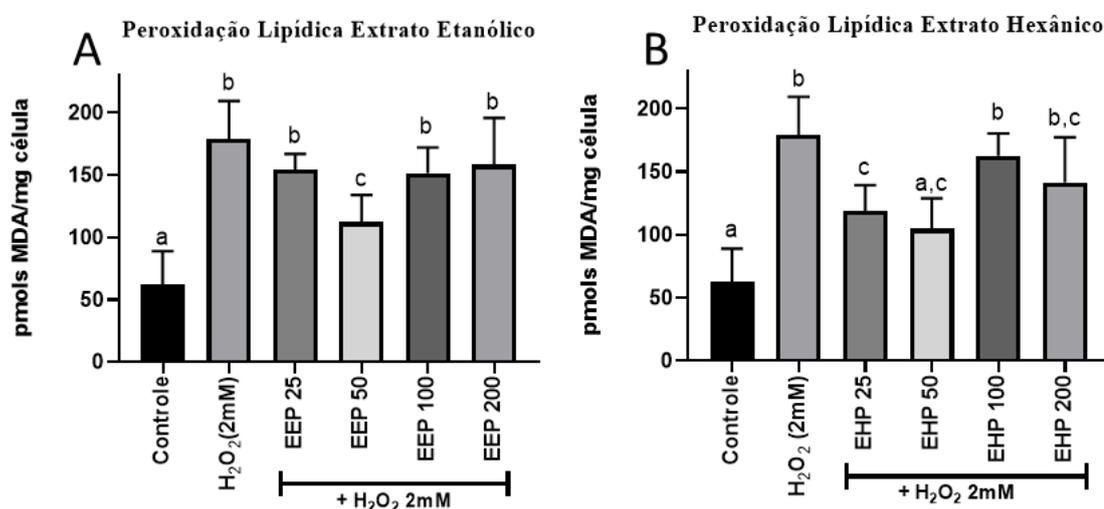


Figura 27: Peroxidação lipídica nas células de levedura expostas a diferentes concentrações dos extratos com posterior estresse. EEP - extrato etanólico de própolis; EHP - extrato hexânico de própolis; controle – controle negativo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,0 mM) – controle positivo para estresse.

Na peroxidação lipídica com o extrato etanólico, todos os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente iguais entre si ( $p < 0,05$ ). Observa-se pelo gráfico que EEP25 ( $154,0 \pm 12,88$  pmols de MDA/mg células), EEP100 ( $151,3 \pm 20,65$  pmols de MDA/mg células) e EEP200 ( $158,2 \pm 37,55$  pmols de MDA/mg células) apresentaram valores estatisticamente iguais às células estressadas ( $179,0 \pm 30,35$  pmols de MDA/mg células). É importante ressaltar que todos os resultados são diferentes do controle negativo, e que apenas o extrato etanólico na concentração de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $112,3 \pm 21,54$  pmols de MDA/mg células) apresentou proteção antioxidante contra o peróxido de hidrogênio. Nos resultados com o extrato hexânico percebe-se que tanto EHP25 ( $115,9 \pm 20,32$  pmols de MDA/mg células) quanto EHP50 ( $104,8 \pm 24,16$

pmols de MDA/mg células) apresentaram ação antioxidante, sendo EHP50 estatisticamente igual ao controle negativo; já EHP100 ( $162,3 \pm 18,00$  pmols de MDA/mg células) e EHP200 ( $141,4 \pm 35,78$  pmols de MDA/mg células) mostraram elevados níveis de danos nas membranas semelhantes ao controle positivo.

Outro ponto a ser observado é que tanto com o extrato etanólico quanto com o extrato hexânico o tratamento que apresenta melhor resultado foi com a concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo que o melhor resultado é com EHP50. É bastante conveniente ressaltar que apesar de EEP50 ser um bom resultado visando o potencial antioxidante comparado às células estressadas, uma análise estatística aplicada entre todos os outros tratamentos com os extratos etanólicos revelou resultados semelhantes entre si e às células estressadas para  $p < 0,05$ . Isso levou-nos à conclusão de que nestas concentrações, caso houvesse proteção antioxidante, esta deveria ser muito pequena comparada aos níveis de estresse causados pelo peróxido de hidrogênio; ou ainda que a própria ação oxidante causada pelos extratos poderia causar esse efeito nos resultados apresentados. E o mesmo raciocínio pode ser pensado para os resultados do extrato hexânico, visto que em maiores concentrações a atividade antioxidante não foi aumentada dose-dependente, e sim permaneceu ao nível do controle positivo.

Portanto, como conclusão destes resultados observou-se que os ensaios de lipoperoxidação com os dois extratos nessas concentrações utilizadas apresentaram atividade antioxidante significativa somente em EHP25, EHP50 e EEP50, e então resolveu-se alterar a concentração do agente oxidante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a fim de verificar se os tratamentos com os extratos conseguiriam nas mesmas concentrações proteger contra a ação oxidativa sobre os lipídeos presentes nas membranas celulares.

Silva (2009) em seu trabalho utilizou  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de  $15,0 \text{ mM}$  a fim de verificar a sensibilidade da levedura e de suas cepas mutantes. Em outro trabalho utilizou-se concentração de  $10,0 \text{ mM}$  de peróxido no experimento de oxidação intracelular para verificar a ação antioxidante dos extratos de própolis também em células da levedura *S. cerevisiae* (PEREIRA, 2013). Através do trabalho de Steels et al (1994) decidiu-se por alterar a concentração de peróxido utilizada, de  $2,0 \text{ mM}$  para  $20,0 \text{ mM}$ ; mantendo-se o tempo de incubação e os outros parâmetros constantes. Considerando a pouca toxicidade dos extratos nas concentrações de  $50$  e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 27) decidiu-se por realizar o novo ensaio de lipoperoxidação nestas concentrações.

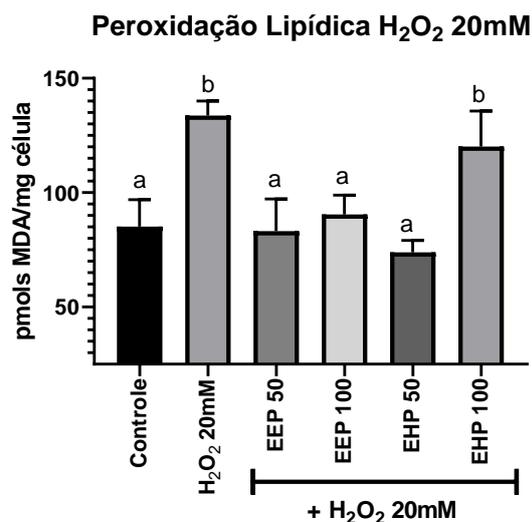


Figura 28: Peroxidação lipídica nas células de levedura expostas a diferentes concentrações dos extratos com posterior estresse com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM).

Analisando os resultados dos tratamentos com as concentrações intermediárias observou-se que os dois extratos apresentaram ação antioxidante (Figura 28). Os ensaios com EEP50, EEP100 e EHP50 apresentaram alta atividade antioxidante com  $83,13 \pm 14,11$  pmols de MDA/mg de células,  $90,45 \pm 8,50$  pmols de MDA/mg de células e  $73,89 \pm 5,19$  pmols de MDA/mg de células, respectivamente; revertendo a oxidação lipídica ao mesmo nível das células sem estresse ( $85,20 \pm 11,72$  pmols de MDA/mg de células); já com EHP100 ( $120,1 \pm 15,54$  pmols de MDA/mg de células) não houve qualquer diminuição estatisticamente significativa, mantendo-se no mesmo nível das células sob estresse ( $133,7 \pm 6,35$  pmols de MDA/mg de células).

Com isso, pode-se dizer que o extrato com características mais polares devido ao tipo de solvente utilizado (etanol) possui uma maior faixa de proteção contra o estresse oxidativo nas membranas celulares, e isto pode estar associado a uma ação direta ou indireta sobre os lipídeos de membrana. O extrato com características mais apolares, em contrapartida, pode atuar mais diretamente nos lipídeos presentes nas membranas e assim impedir as espécies reativas de iniciarem ou propagarem danos nesta estrutura celular específica. Algumas substâncias lipossolúveis possuem a característica de penetrar nas membranas celulares e reagir com os radicais formados (Figura 29) (BIANCHI e ANTUNES, 1999, KRINSKY, 1988).

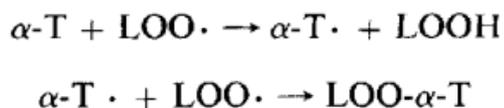


Figura 29: Reações envolvidas na inibição da peroxidação lipídica, onde  $\alpha\text{-T}$  é  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (KRINSKY, 1988).

Com a concentração do agente oxidante 10 vezes maior foi possível verificar um potencial antioxidante mais elevado dos extratos sobre as células de levedura, inclusive igualando-se ao nível do ensaio controle; sendo possível também observar que o nível de peroxidação sobre as membranas gerado a partir do estresse com peróxido de hidrogênio na concentração de 2,0 mM ( $179 \pm 30,35$  pmols de MDA/mg de células) (Figura 27) ou 20,0 mM ( $133,7 \pm 6,35$  pmols de MDA/mg de células) (Figura 28) mantiveram-se elevados e estatisticamente iguais entre si. Nesse caso, a ação antioxidante dos extratos pode estar relacionada à proteção de outras biomoléculas que poderiam ser afetadas pelos subprodutos formados como resultado dos danos nas membranas aliada a uma resposta antioxidante endógena maior.

Kocot et al (2018) fizeram um artigo de revisão mostrando o potencial antioxidante de diferentes própolis. Os resultados obtidos aqui estão de acordo com outros estudos mostrados pelos autores na literatura, uma vez que a própolis diminui o estresse celular agindo também na proteção das membranas celulares. A redução dos valores de MDA ocorre independente das características dos diferentes tipos de própolis (verde, marrom, indiana, vermelha) e de todos os extratos, independente da polaridade do solvente.

Fonseca et al (2011) utilizaram extrato de própolis brasileira marrom e verde a fim de prevenir danos oxidativos induzidos pela radiação UV em camundongos sem pele. Os extratos apresentaram diferentes composições de substâncias fenólicas, onde a própolis verde apresentou maiores quantidades de polifenóis enquanto a marrom apresentou de flavonoides. De acordo com os autores entende-se que a atividade antioxidante está relacionada com a quantidade de polifenóis como artepelin C e ácido *para*-cumárico, já que a verde apresentou atividade antioxidante mais elevada.

No trabalho de Sá et al (2013) percebe-se uma diminuição da peroxidação lipídica em concentrações menores da própolis verde (25  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando a mesma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  do primeiro ensaio (2,0 mM). Talvez o fato das células deste presente trabalho estarem na 2ª

fase exponencial, ou seja, encontrarem-se na fase de respiração celular, as leveduras estejam mais resistentes por possuírem mais defesas contra as EROs provenientes da respiração celular, formadas naturalmente nas mitocôndrias. Isso porque na presença de altas concentrações de glicose os genes envolvidos no metabolismo respiratório (cadeia transportadora de elétrons e ciclo do ácido cítrico) estão sob repressão metabólica; assim como os genes que possuem os elementos de resposta ao estresse e também àqueles envolvidos na utilização de etanol e glicerol como fonte de carbono (SILVA, 2009).

A sazonalidade é outro fator importante, pois pode influenciar na concentração de substâncias fenólicas encontradas na vegetação, uma vez que essas moléculas são biossintetizadas pelo metabolismo secundário das plantas. Mesmo que em outros estudos utilizem também a própolis verde brasileira, não é possível precisar que as concentrações de substâncias sejam as mesmas e, conseqüentemente, a atividade antioxidante idêntica.

### **5.3 Avaliação da Atividade Antioxidante por Viabilidade Celular**

Uma maneira de verificar o impacto destes extratos sobre a vida celular é analisar a possibilidade da geração de células-filhas através da formação de colônias. A fim de se avaliar o aumento no número de células viáveis mediante ação dos extratos sob células em estresse oxidativo pelo agente oxidante peróxido de hidrogênio realizou-se o ensaio de viabilidade celular. Além disso, com o objetivo de possuir um critério de comparação na análise da determinação desta atividade antioxidante foram avaliados também neste ensaio os níveis tóxicos dos extratos revelados pelo número de colônias oriundas de células em contato somente com EEP e EHP.

É importante ressaltar que neste ensaio as concentrações utilizadas dos extratos foram de 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; ou seja, as mesmas que obtiveram resultados de proteção antioxidante na peroxidação lipídica. Contudo, a concentração de peróxido foi mantida inicialmente em 2,0 mM, avaliando-se o seu aumento ou mesmo o tempo de incubação caso não houvesse resultados promissores.

Na figura 30 encontram-se os resultados tanto da toxicidade (Figura 30A) quanto do potencial antioxidante dos extratos (Figura 30B). Quanto à ação tóxica dos extratos observa-se que em todos os tratamentos os resultados demonstraram níveis similares às células sem tratamento ( $170,10 \pm 13,48$  UFC), com  $149,4 \pm 8,56$  UFC e  $151,4 \pm 23,69$  UFC para 50 e 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato etanólico, respectivamente; e  $145,0 \pm 20,52$  UFC e  $142,8 \pm 28,19$  UFC para 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato hexânico, respectivamente. É extremamente claro o grau de toxicidade do peróxido de hidrogênio para a geração de células-filhas ( $8,43 \pm 17,94$  UFC), revelando que apesar das células ainda possuírem metabolismo ativo de acordo com o resultado quantitativo de vitalidade celular (Figura 30B), a proliferação celular está seriamente comprometida com este nível de estresse.

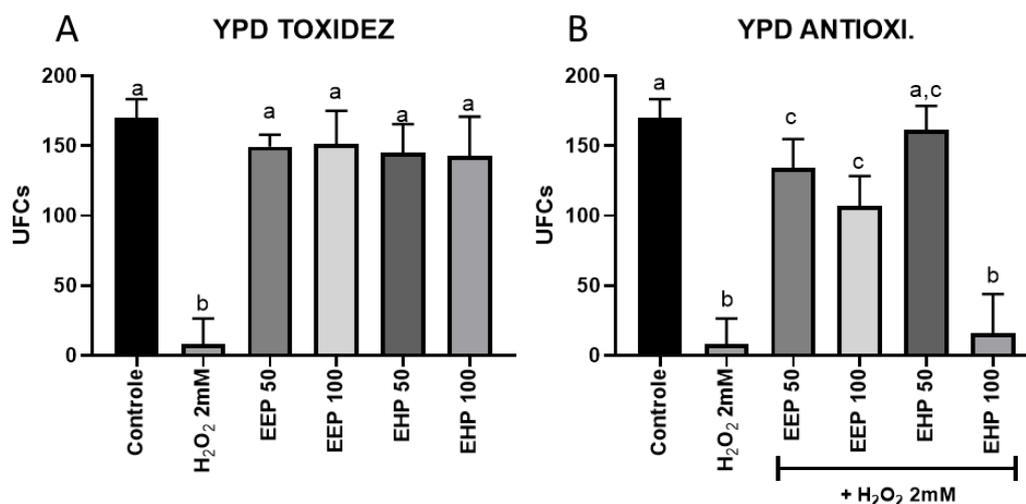


Figura 30: Viabilidade celular das leveduras expostas na avaliação da toxicidade dos extratos (A) e das suas atividades antioxidantes (B).

Na análise antioxidante (Figura 30B) verificou-se que três dos quatro tratamentos apresentaram proteção antioxidante, com um aumento no número de colônias em pelo menos doze vezes nos tratamentos com EEP50, EEP100 e EHP50, em comparação com as células sob estresse ( $8,43 \pm 17,94$  UFC). Nesse caso, o melhor resultado foi com EHP50 ( $161,30 \pm 17,31$  UFC), atingindo, o mesmo nível do controle. Em seguida estão EEP50 ( $134,30 \pm 20,53$  UFC) e EEP100 ( $107,00 \pm 21,37$  UFC). O único tratamento a não conseguir aumentar a viabilidade das células foi com EHP100 ( $16,00 \pm 27,90$  UFC), sendo estatisticamente igual às células estressadas ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados estão coerentes com o ensaio de peroxidação lipídica, onde nos dois casos o EHP100 foi o único tratamento a não diminuir o estresse celular, igualando-se aos resultados das células estressadas; mostrando que mesmo que nesta concentração o extrato não seja tóxico não há ação antioxidante. Além disso, EHP50 apresentou resultados melhores no ensaio da viabilidade celular (Figura 30B) do que no ensaio dos níveis de lipoperoxidação

(Figura 28). Entretanto, é importante lembrar que além dos ensaios avaliarem parâmetros celulares diferentes, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suficiente para a obtenção de resultados na peroxidação lipídica precisou ser aumentada em 10 vezes.

Um estudo com a própolis portuguesa coletada em diferentes períodos e locais possuindo um total de 6 amostras de própolis bruta avaliou a toxicidade por viabilidade celular dos extratos etanólico e hexânico nas concentrações de 200 e 500 µg.mL<sup>-1</sup> sobre células de *S. cerevisiae*. O extrato de caráter apolar não apresentou danos às leveduras, mas com o extrato etanólico de algumas amostras foi possível observar que a própolis apresentou ser tóxica e letal; resultados estes diferentes dos encontrados com a própolis verde brasileira utilizada neste estudo (PEREIRA H. R., 2013). Em oposição, nossos estudos com a concentração de 200 µg.mL<sup>-1</sup> do extrato hexânico apresentaram toxicidade para as células, ao contrário do extrato polar que não apresentou nenhuma queda significativa na viabilidade celular, sendo o resultado igual às células controle. O autor utilizou as amostras de própolis que apresentaram certa toxidez para dar continuidade ao seu trabalho, pois diferente do presente estudo, além de verificar se a própolis possuía caráter antioxidante, foi verificado se poderia possuir atividade antimicrobiana. Ainda na concentração de 200 µg.mL<sup>-1</sup> foi verificado se essa amostra causaria danos ao DNA, e não só apresentou danos, como foi similar às células estressadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 M (10 mM). Entretanto afim de avaliar a atividade antioxidante foram utilizados as concentrações entre 25 e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de extrato etanólico da própolis portuguesa e foi possível verificar ação antioxidante em todas as concentrações (PEREIRA H. R., 2013).

#### **5.4 Proteção Antioxidante sobre as Mitocôndrias**

O fato dos extratos apresentarem atividade antioxidante nos ensaios anteriores não traduz necessariamente uma proteção sobre a funcionalidade das mitocôndrias; com isso, avaliou-se a produção de células-filhas dependentes da ação mitocondrial através do ensaio de viabilidade celular. Neste experimento verifica-se a capacidade de crescimento e multiplicação das células em um meio não-fermentativo, onde para que as células realizem obrigatoriamente o metabolismo respiratório é necessário que o meio de cultura contenha baixa concentração de glicose, ou apenas uma fonte de carbono não fermentável, como o glicerol utilizado neste experimento; pois, neste caso, a célula é forçada a utilizar o metabolismo aeróbico para o seu crescimento e desenvolvimento celular (ALMEIDA, 2014).

O número elevado de EROs pode levar à peroxidação lipídica das membranas presentes nesta organela, oxidando lipídeos e modificando a estrutura da membrana mitocondrial diminuindo assim o seu potencial de membrana. Com isso, a organela passa a não mais controlar as concentrações de íons dentro e fora desta organela, como por exemplo a homeostase do cálcio intracelular relacionado a uma série de vias de sinalização responsáveis, inclusive, pela proteção celular.

Os radicais livres também podem reagir com as biomoléculas presentes na mitocôndria, como proteínas presentes na CTE e o DNA mitocondrial, ocasionando mutações e consequentes distúrbios capazes de comprometer várias funções específicas nas células, podendo comprometer tecidos e órgãos. Caso ocorram estes eventos o sistema de defesa precisa ser eficiente e suficiente para não haver uma disfunção mitocondrial significativa, pois o mal funcionamento desta organela pode levar à morte celular. O tratamento com antioxidantes pode não só proteger a célula, como também a função mitocondrial das células de *S. cerevisiae*.

A avaliação da função mitocondrial mostrou diferenças significativas entre os resultados nas células estressadas ( $15,43 \pm 21,76$  UFC) e em todos os outros tratamentos (Figura 31); onde apenas com EHP100 ( $106,1 \pm 14,78$  UFC) houve certa toxicidade; sugerindo que apesar deste extrato na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  não apresentar toxicidade no meio YPD 2%; ou seja, quando a célula possui como preferência o metabolismo fermentativo; nesta concentração a funcionalidade das mitocôndrias é afetada. Nos outros tratamentos os resultados com EEP50 ( $147,5 \pm 11,56$  UFC), EEP100 ( $130,6 \pm 20,69$  UFC) e EHP50 ( $128,0 \pm 19,60$  UFC) foram estatisticamente semelhantes ao controle ( $145,5 \pm 13,82$ ), com  $p < 0,05$  segundo o teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

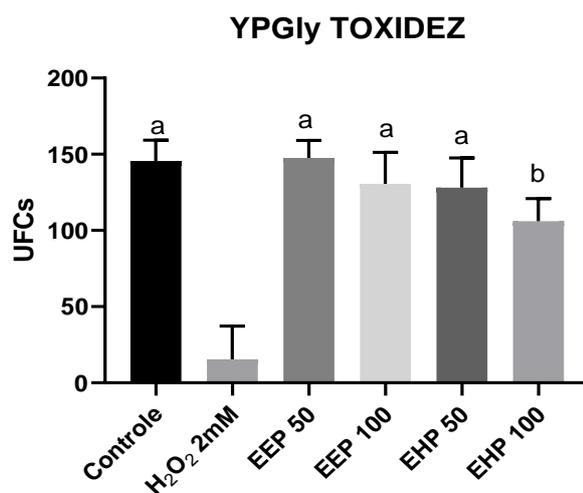


Figura 31: Toxicidade dos extratos etanólicos (EEP) e hexânicos (EHP) sobre a atividade mitocondrial.

Na análise antioxidante sobre a função mitocondrial celular, através do ensaio de viabilidade das células (Figura 32) após a pré-incubação com os extratos e posterior estresse com peróxido de hidrogênio (2,0 mM), encontrou-se que as amostras EEP50 ( $117,2 \pm 12,13$  UFC), EEP100 ( $77,60 \pm 16,35$  UFC) e EHP50 ( $87,33 \pm 12,29$  UFC) apresentaram a função mitocondrial mantida após o estresse; mesmo que no controle sob estresse a função mitocondrial tenha apresentado valor muito baixo ( $15,43 \pm 21,76$  UFC); enquanto que para EHP100 ( $15,29 \pm 15,29$  UFC), como já esperado pela sua alta toxicidade (Figura 31), não demonstrou qualquer proteção, sendo inclusive similar aos resultados das células estressadas.

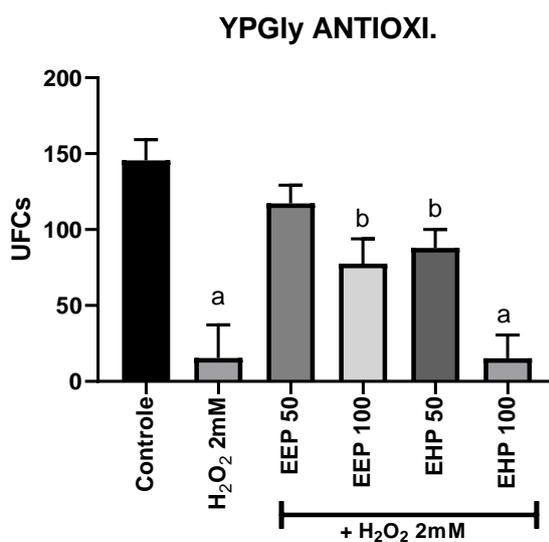


Figura 32: Análise antioxidante dos extratos etanólicos (EEP) e hexânicos (EHP) sobre a atividade mitocondrial em células de *S. cerevisiae* sob estresse oxidativo.

Os tratamentos que apresentaram atividade antioxidante nos demais experimentos são os mesmos a apresentar aqui uma melhora na funcionalidade mitocondrial, podendo atuar direta ou indiretamente na proteção às mitocôndrias. Pereira (2013) e Castro et al (2011) em seus trabalhos discutem a possibilidade da própolis ter como alvo essa organela, pois pode induzir a apoptose celular liberando citocromo c para o citosol e aumentar a produção de EROs mitocondriais. Castro demonstra isso em seu trabalho apresentando resultados em que as células utilizando metabolismo fermentativo são menos afetadas que aquelas em fase estacionária.

Em contrapartida, há estudo que mostra que o extrato de *Baccharis dracunculifolia*, planta majoritariamente utilizada na produção de própolis verde pelas abelhas, foi capaz de proteger a mitocôndria. Guimarães et al (2012) mostraram a atividade antioxidante do extrato da planta, através de estudo *in vitro* com radicais DPPH e pela peroxidação lipídica nas membranas das mitocôndrias. Neste estudo também verificaram que a eficácia contra a oxidação dos lipídios e de proteínas com grupamentos tióis foi mais pronunciada do que a eficácia contra a oxidação do GSH, o que levou a discussão que as substâncias presentes no extrato possuem sua atividade através da eliminação dos radicais livres capazes de oxidar as macromoléculas e não dos peróxidos formados (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Extratos de própolis possuem substâncias fenólicas que conseguem atravessar as membranas celulares e com isso reagir com as EROs intracelulares (JARDINI, 2010). Além

disso, como a mitocôndria é um dos primeiros alvos a serem danificados quando as células são expostas a substâncias prejudiciais, esta organela pode aumentar a produção de espécies reativas, como o ânion radical superóxido através da redução incompleta do oxigênio molecular. Kubiliene et al (2018) decidiram avaliar se o extrato de própolis era capaz de diminuir o número de EROs intramitocondrial, e perceberam que algumas moléculas possuem a capacidade de penetrar na organela pelas membranas mitocondriais, e reagem diretamente com os radicais livres; enquanto outras estariam contribuindo para diminuir o possível estresse oxidativo funcionando como um desacoplador da fosforilação oxidativa, diminuindo o consumo de oxigênio da célula e conseqüentemente diminuindo as espécies reativas formadas pela mitocôndria.

### **5.5 Análise da Influência dos Extratos Sobre o Consumo de Oxigênio**

A fim de averiguar a influência destes extratos sobre uma das principais funções desta organela, avaliou-se o consumo de oxigênio mitocondrial nas células de *Saccharomyces cerevisiae* intactas; com o propósito de analisar variações na respiração celular provocadas nas células previamente tratadas com os extratos e sob estresse oxidativo.

Durante a síntese de ATP os prótons bombeados pela CTE para o espaço intermembranar voltam à matriz mitocondrial, e a utilização do transporte de prótons pela enzima ATP sintase é chamado de acoplamento quimiosmótico. Quando esses prótons retornam para a matriz através de outras moléculas/poros presentes na membrana interna é chamado de vazamento de prótons, ou de desacoplamento entre a CTE e a síntese de ATP; diminuindo assim a síntese de ATP mantendo o transporte de elétrons e a redução do oxigênio independentemente deste fato. O desacoplamento causado por esse mecanismo estimula o consumo de oxigênio ao máximo durante o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (PEREIRA DA SILVA, A. P., 2008).

Após o tratamento das suspensões celulares com os extratos nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e o posterior estresse causado pelo peróxido de hidrogênio na mesma concentração utilizada no controle positivo (2,0 mM) foi adicionada aproximadamente 2,62 mg de células na câmara do oxígrafo contendo tampão fosfato de sódio. Assim que as células foram adicionadas mensurou-se o consumo de oxigênio basal das células. Ao adicionar o ionóforo FCCP

posteriormente, como um desacoplador, obtém-se o consumo máximo de oxigênio sem aumentar a síntese de ATP.

A figura 33 mostra o consumo de  $O_2$  pelas células de levedura. Ao colocar as células na câmara percebe-se um consumo acentuado de oxigênio, o que é de se esperar visto que as leveduras adicionadas, que estão em metabolismo respiratório, consomem o oxigênio presente. Depois que o consumo de  $O_2$  é normalizado, verifica-se o intervalo de inclinação constante da curva e utiliza-se esta inclinação para se calcular a concentração de oxigênio consumida pelas células dentro da câmara do oxígrafo. Da mesma forma é realizado depois de adicionar o desacoplador FCCP, que ao fazer a análise percebeu-se uma maior inclinação da reta, demonstrando maior consumo de  $O_2$ .

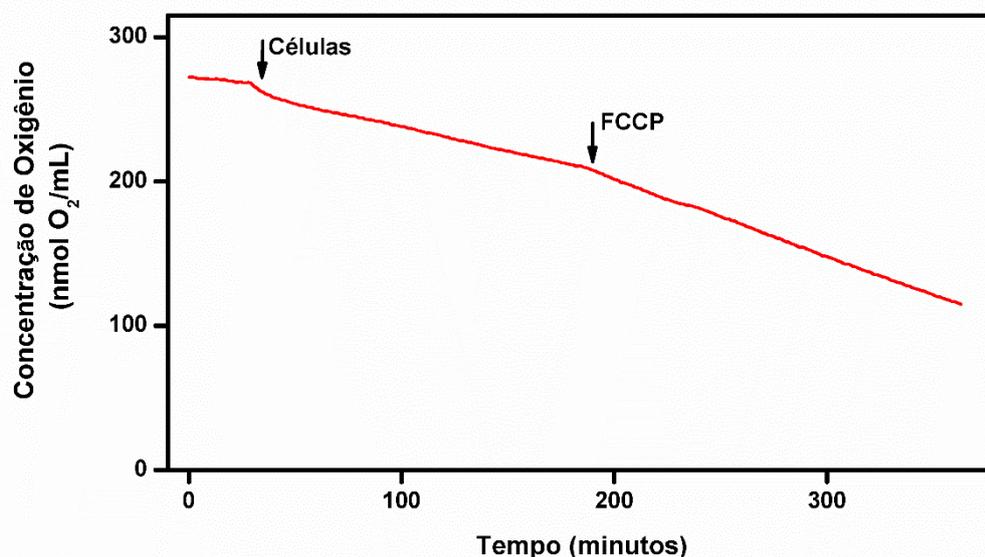


Figura 33: Gráfico de consumo de oxigênio em tempo real.

Percebe-se pela figura 33 que a fase de crescimento das células utilizadas nesses experimentos está de acordo com o esperado, ou seja, as células estão na fase diáuxica ou na segunda fase de crescimento exponencial, visto que as mitocôndrias estão ativas. Isso porque a expressão dos genes relacionados à CTE é aumentada quando a disponibilidade de glicose diminui mesmo que as células estejam em meio YPD, uma vez que o açúcar disponível é consumido no metabolismo fermentativo. As células então adaptam-se para consumir o etanol formado durante a fermentação (GUEDES, 2006).

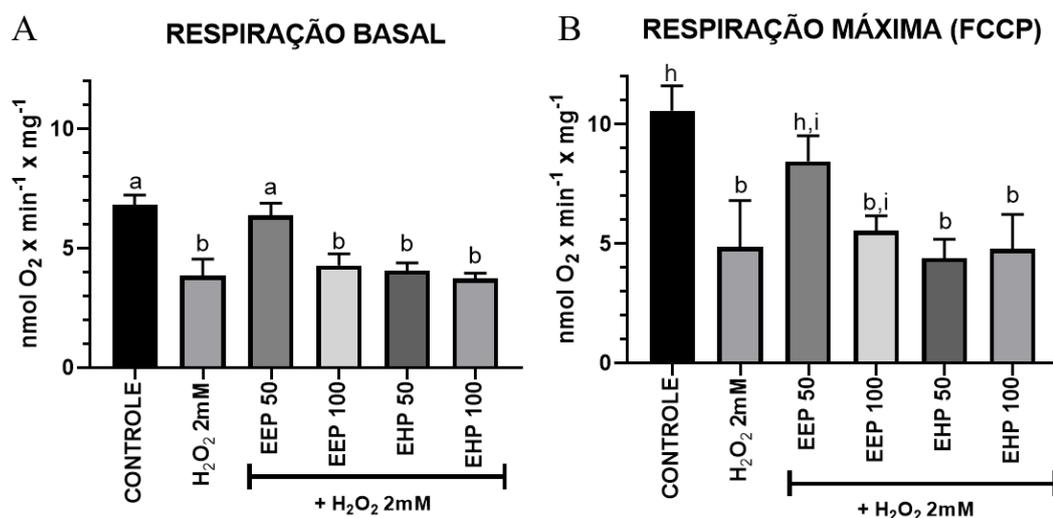


Figura 34: Consumo de oxigênio das leveduras na respiração basal (A) e com a adição do desacoplador (FCCP) (B).

Na figura 34A avaliou-se a consumo de oxigênio basal, função mitocondrial relacionada ao metabolismo celular respiratório sem o efeito do desacoplamento. Os tratamentos com os extratos hexânico EHP50 ( $4,08 \pm 0,3150$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) e EHP100 ( $3,74 \pm 0,2267$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>), bem como o etanólico EEP100 ( $4,29 \pm 0,4844$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>), não foram capazes de diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo nas mitocôndrias, apresentando valores estatisticamente iguais às células estressadas ( $3,86 \pm 0,6937$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>). O único tratamento que conseguiu neutralizar os danos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi EEP50 ( $6,38 \pm 0,5127$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>), sendo igual ao controle ( $6,82 \pm 0,4174$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>). Em um estudo utilizando extrato etanólico de uma própolis tcheca também foi verificada a capacidade de melhoria da eficiência da respiração mitocondrial em espermatozoides humanos, além de melhorar a atividade dos complexos II e IV da cadeia respiratória individualmente (CEDIKOVA *et al.*, 2014).

Com a adição do desacoplador (Figura 34B) a cadeia respiratória funciona na sua capacidade máxima, consumindo mais oxigênio molecular para tentar sintetizar o ATP necessário para a manutenção da homeostase energética celular e manter o potencial transmembrana. Os resultados demonstram que o tratamento com EEP50 ( $8,45 \pm 1,076$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) foi o único a conseguir proteger os complexos presentes na CTE dos danos causados pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mantendo os níveis de respiração celular ao máximo e apresentando o mesmo nível de atividade das organelas presentes nas células controle ( $10,58 \pm$

1,040). Em contrapartida, os demais tratamentos, EEP100 ( $5,56 \pm 0,6178$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), EHP50 ( $4,41 \pm 0,7867$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) e EHP100 ( $4,78 \pm 1,452$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) continuam apresentando um perfil semelhante às células estressadas ( $4,88 \pm 1,937$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), mostrando que as substâncias presentes nos extratos nestas concentrações não foram capazes de minimizar os danos à mitocôndria e conseqüentemente, a CTE pode estar com um ou mais complexos danificados fazendo com que a célula não consiga utilizar a organela para a respiração.

Portanto, pode-se concluir que EEP50 apresenta atividade antioxidante, pois foi capaz de diminuir os danos causados pelo  $H_2O_2$  na respiração basal e contribuiu para melhorar a função mitocondrial uma vez que durante a respiração máxima apresentou junto com as células sem estresse as maiores médias de consumo de  $O_2$ . Este resultado corrobora o que foi verificado na análise da função mitocondrial por viabilidade celular (Figura 31), assim como nos ensaios antioxidantes de viabilidade celular (Figura 30B) e lipoperoxidação (Figuras 27 e 28). Existem várias formas de combate aos danos intracelulares de biomoléculas e organelas, e de acordo com estes resultados pode-se dizer que o EEP50 possui a capacidade de diminuir a peroxidação lipídica e influenciar positivamente na respiração celular, combatendo os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio geradas durante o estresse oxidativo causado pelo  $H_2O_2$ .

O extrato hexânico, nas concentrações utilizadas neste experimento, não foi capaz de aumentar a eficiência da respiração mitocondrial. Este resultado pode ser devido à diferença de polaridade dos extratos e com isso diferentes substâncias estão presentes nos extratos, fazendo com que o desempenho mitocondrial possa não sofrer alterações devido à incubação com estes extratos.

Substâncias fenólicas podem agir de forma indireta como antioxidantes diminuindo a oxidação intracelular através do aumento dos níveis de proteínas endógenas antioxidantes, sem penetrar nas membranas celulares. Entretanto, moléculas menos polares são capazes de entrar nas células e/ou permanecer nas membranas celulares agindo diretamente com os radicais livres e diminuindo a necessidade das defesas endógenas, por exemplo as enzimas antioxidantes. Algumas substâncias parecem ser capazes de interagir diretamente no complexo proteico presente na membrana mitocondrial, que sintetiza ATP (ATP sintase) impedindo a formação de EROs pela cadeia transportadora de elétrons (CIGUT *et al.*, 2011).

Alguns estudos mostram que polifenóis como os ácidos fenólicos podem interagir melhor com as membranas celulares e mitocondriais e assim possuir um melhor efeito antioxidante de

proteção da mitocôndria. Há outros estudos que associam a atividade antioxidante dos extratos da própolis verde com a presença do artepelin C; e dos extratos de alecrim-da-horta (*Rosmarinus officinalis* L.) com a presença do ácido rosmarínico.

### **5.6 Toxidez e Vitalidade Celular das Substâncias Artepelin C e Ácido Rosmarínico**

Neste ensaio de toxidez e vitalidade celular variando-se a concentração destas substâncias em contato com as células dos extratos optou-se por avaliar apenas qualitativamente, visto que anteriormente obteve-se uma relação direta entre as análises quantitativa e qualitativa utilizando-se os extratos (Figuras 26a e 26b).

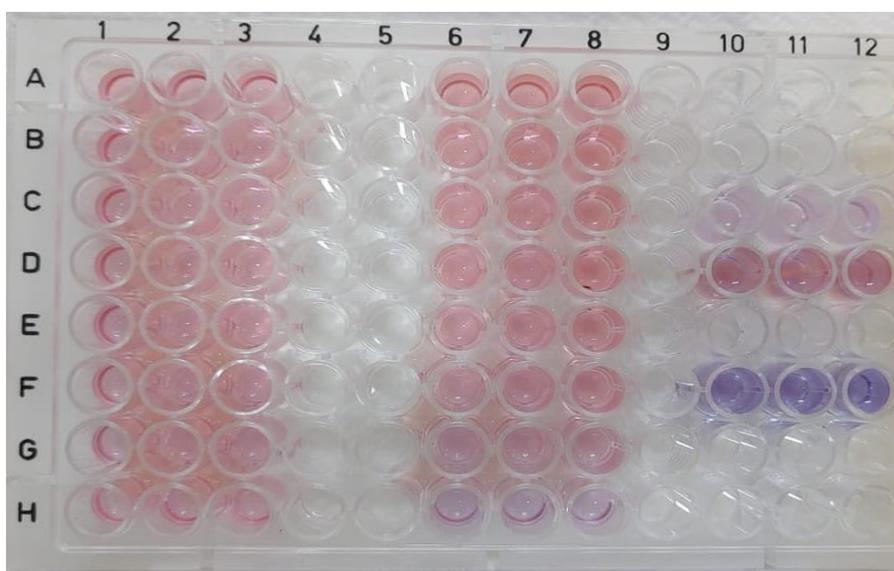


Figura 35: Resultado qualitativo do ensaio de toxidez das substâncias ácido rosmarínico (colunas 1-3) e artepelin C (colunas 6-8) isoladas da própolis verde. Linha D – células em meio de cultura; Linha F – meio de cultura sem células.

A fim de determinar as concentrações não-citotóxicas a serem utilizadas nos ensaios antioxidantes posteriores foi feito o teste de vitalidade celular, onde as substâncias isoladas foram colocadas diretamente junto às células já presentes nos poços. Depois de 1 hora foi adicionada uma solução da substância resazurina revelando que nessa varredura apenas a maior concentração de artepelin C disposta nos poços H6, H7 e H8 ( $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) mostrou ser tóxica às leveduras (Figura 35). Ou seja, para as duas substâncias não houve toxidez entre as concentrações de  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ficando evidente pelos resultados que a coloração entre os tratamentos e o controle negativo (D10 a D12) foram similares, enquanto o controle sem células mostrou não existir metabolismo nestes poços (colunas F10 a F12).

Com base neste experimento e em outros estudos que fizeram uso de substâncias fenólicas isoladas em análises de atividades biológicas, decidiu-se utilizar a concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ : tanto para o artepelin C (AC) quanto para o ácido rosmarínico (AR) (CASTRO *et al.*, 2011; PRUDÊNCIO, 2016). Esta concentração das substâncias fenólicas corresponde a  $33,29 \mu\text{M}$  para AC e  $27,75 \mu\text{M}$  para AR.

### 5.7 Toxicidade por Viabilidade Celular de Artepelin C e Ácido Rosmarínico

Os resultados revelaram que no experimento de viabilidade celular as substâncias artepelin C e ácido rosmarínico não demonstraram qualquer toxicidade (Figura 36), confirmando os resultados qualitativos da vitalidade celular. Neste ensaio, AC ( $134,9 \pm 17,94$  UFC) e AR ( $154,3 \pm 24,16$  UFC) possuem valores estatisticamente iguais ao controle ( $145,1 \pm 29,93$  UFC) e totalmente diferente das células estressadas ( $8,43 \pm 17,94$  UFC). Comparando-se com outros estudos, verificou-se a citotoxicidade do ácido rosmarínico em linhagens de câncer de mama, pulmão e ovário, onde foi utilizada uma concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e não foi observada redução na viabilidade celular (SOUZA, 2017). No estudo de Szliszka et al (2012) o artepelin C apresentou baixa citotoxicidade em células de câncer de próstata, nas concentrações de 50 e  $100 \mu\text{M}$  mas, ao ser administrado junto ao indutor de apoptose tumoral, aumentou a porcentagem da apoptose celular, os autores mostram maior atividade da caspase indicando que AC pode ser usado como agente imunopreventivo de câncer de próstata.

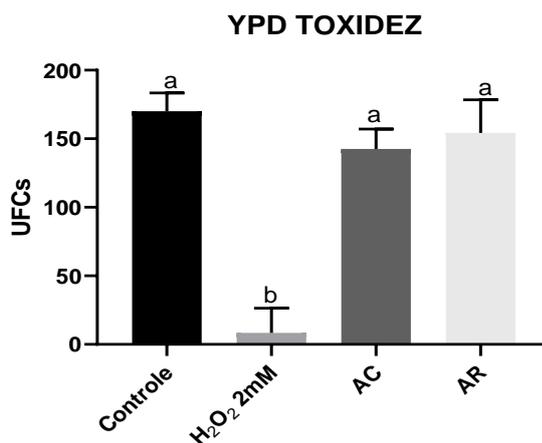


Figura 36: Viabilidade celular de *S. cerevisiae* após tratamento com artepelin C (AC) e ácido rosmarínico (AR), ambas as substâncias na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## **5.8 Atividade Antioxidante por Viabilidade Celular das Substâncias Artepelin C e Ácido Rosmarínico**

Própolis de diversos países como Brasil, Portugal e Polônia possuem ação antioxidante e acredita-se que esta propriedade seja devido a presença de substâncias fenólicas nos extratos utilizados como tratamento. Diversos estudos mostram a relação positiva entre a concentração de substâncias fenólicas e flavonoides presentes nos diferentes extratos e a atividade antioxidante demonstrada (SILVA 2017, KUREK-GORECKA, 2014; CAVALARO *et al.*, 2019; KOCOT *et al.*, 2018; PEREIRA H. R., 2013).

Em outro estudo foi verificado a atividade antioxidante do extrato etanólico da própolis eslovena e de seus principais constituintes, os ácidos cafeico, p-cumárico e ferúlico e o CAPE, onde apenas o extrato foi capaz de apresentar atividade antioxidante. Visto isso, verificaram se as substâncias fenólicas conseguiriam entrar nas células da levedura *S. cerevisiae*. CAPE foi a única molécula que conseguiu, devido a sua polaridade, penetrar e permanecer na camada lipídica. Os autores então separaram o extrato etanólico em duas frações, uma polar e uma outra menos polar, e verificaram que os compostos presentes nesta fração foram capazes de entrar nas células e diminuir a oxidação intracelular (CIGUT *et al.*, 2011).

As substâncias AC ( $145,7 \pm 15,29$  UFC) e AR ( $149,6 \pm 29,02$  UFC) foram capazes de aumentar a sobrevivência celular quando comparadas às células estressadas ( $8,43 \pm 17,94$  UFC), sendo semelhantes, inclusive, significativamente aos valores do controle negativo ( $170 \pm 13,48$  UFC) (Figura 37). Portanto, pode-se dizer que essas substâncias que estão presentes na própolis verde nas quantidades de  $0,348 \pm 0,073$  mg.100 mg<sup>-1</sup> de extrato para o artepelin C e  $1,352 \pm 0,001$  mg.100mg<sup>-1</sup> de extrato para o ácido rosmarínico (SALGUEIRO, 2016) podem ter contribuído sinergicamente para a atividade antioxidante observada nos resultados obtidos para os extratos (Figura 30B).

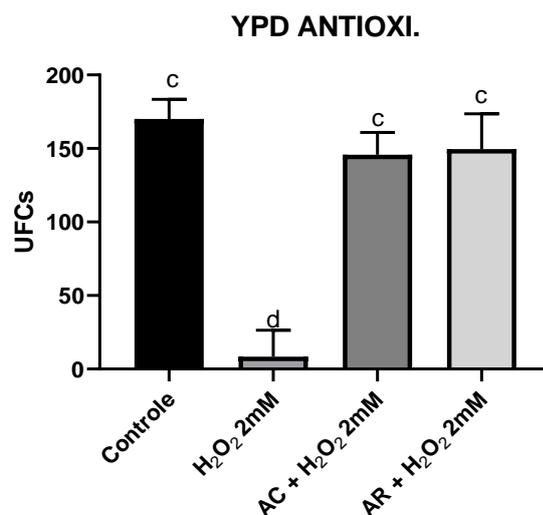


Figura 37: Viabilidade celular da levedura após a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,0 mM) nas células pré-incubadas com artemelin C (AC) e ácido rosmarínico (AR).

GAO e colaboradores (2005) utilizaram em seus estudos pré-tratamento de 10  $\mu$ M e 40  $\mu$ M de ácido rosmarínico e ambas as concentrações foram capazes de reverter a apoptose celular gerada pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demonstrando ação antioxidante. O ácido rosmarínico é um éster de estrutura similar ao CAPE (éster fenético do ácido cafeico), e este além de possuir propriedade antioxidante é capaz de penetrar nas membranas celulares devido a sua polaridade moderada. Da mesma forma o ácido prenilado, artemelin C, pode ser encontrado tanto no extrato etanólico quanto no extrato hexânico indicando uma polaridade moderada.

### **5.9 Atividade Antioxidante por TBARS com as Substâncias Puras**

Os compostos fenólicos são ácidos fracos que atuam como doadores de hidrogênio, capazes de reagir com os radicais livres formados por cascatas de reações provocadas pela peroxidação lipídica e/ou inicializadas pelo radical hidroxila ( $\bullet$ OH), que pode ser formado a partir do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela reação de tipo Fenton (Figuras 3 e 6) (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Ácidos fenólicos como artemelin C e ácido rosmarínico, produtos do metabolismo secundário das plantas, devido às suas estruturas químicas são capazes de interagir e/ou penetrar nas membranas celulares; ou seja, nas bicamadas lipídicas. Além de reagirem com as EROs ou outros radicais formados, podem aumentar a fluidez da membrana se associados às camadas

lipídicas impedindo a propagação da oxidação das cadeias (FADEL *et al.*, 2011; PAZIN *et al.*, 2019; UTO *et al.*, 2006).

Analisando os resultados dos tratamentos (Figura 38) observa-se que ambos os compostos apresentaram ação antioxidante, atingindo os mesmos níveis de MDA que as células sem estresse. As substâncias AC ( $95,35 \pm 9,435$  pmols de MDA/mg células) e AR ( $87,57 \pm 11,52$  pmols de MDA/mg células) apresentaram valores estatisticamente iguais entre si e ao controle ( $85,20 \pm 11,72$  pmols de MDA/mg células), sendo diferentes das células apenas estressadas ( $133,7 \pm 6,352$  pmols de MDA/mg células); corroborando os resultados de proteção antioxidante observados no experimento de viabilidade celular (Figura 37).

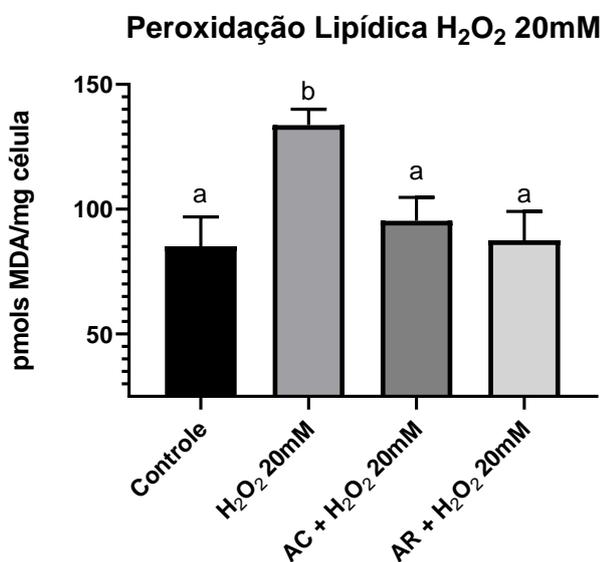


Figura 38: Peroxidação lipídica das células de levedura expostas a diferentes tratamentos com posterior estresse. AC - artepelin C; AR - ácido rosmarínico; controle - controle negativo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) - controle positivo para estresse.

No estudo de Uto *et al.* (2006) comparou-se o papel antioxidante do artepelin C com a vitamina E, que é um antioxidante endógeno e inibidor da peroxidação lipídica capaz de se associar às membranas celulares. Os autores relatam que o AC, por possuir uma menor hidrofobicidade que a Vit E, apresentou um poder 3 vezes maior de proteger as cadeias lipídicas da oxidação. Este trabalho demonstrou ainda que a molécula é capaz de entrar na bicamada, sugerindo que se estabilizem nas partes mais polares das membranas (PAZIN *et al.*, 2019).

Em outro estudo com o ácido rosmarínico também verificou-se que esta molécula foi capaz de interagir com a bicamada lipídica, e nas concentrações de  $0,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $2,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $21,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  inibir a peroxidação lipídica em pelo menos 50% em comparação com um ensaio controle. Para sua eficiência antioxidante os autores levantaram hipóteses onde a primeira seria que esta substância reagiria com as EROs antes de atingirem as membranas; e a segunda seria que esta substância estaria associada às membranas celulares aumentando a proteção das células (FADEL *et al.*, 2011). Já em outro estudo realizou-se um tratamento com o AR usando 10 mg/kg corporal/dia durante 21 dias em ratos adultos saudáveis e diabéticos. Após o experimento foi avaliado se o tratamento foi eficiente através da análise de peroxidação lipídica e obtiveram que o tratamento conseguiu prevenir o aumento de MDA sendo comparado ao grupo controle (MUSHTAQ *et al.*, 2014).

Em outro estudo também com o ácido rosmarínico, a adição de 200 mg/Kg em células de fígado e rim de ratos conseguiu diminuir a produção de MDA, mas as concentrações inferiores (50 e 100 mg/Kg) neste trabalho não possuíram tal efeito. Na maior concentração trabalhada AR aumentou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH Px); sugerindo que esta substância pode ser capaz de atuar também contra o envelhecimento (CHEN *et al.*, 2014). Com os resultados obtidos sobre o potencial antioxidante destas substâncias e os resultados disponíveis de outras pesquisas, decidiu-se verificar uma possível ação desses ácidos fenólicos durante a respiração celular sobre a funcionalidade da mitocôndria.

### **5.10 Avaliação Antioxidante dos Isolados dos Extratos por Disfunção Mitocondrial**

Neste experimento foi avaliado se as células tratadas com as substâncias isoladas tiveram seu consumo de oxigênio alterado, de forma a minimizar os efeitos antioxidantes e o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (2,0 mM).

A avaliação da função mitocondrial (Figura 39) apenas com o tratamento das substâncias a fim de avaliar suas toxicidades no meio YPGly (glicerol) não revelou toxidez sobre a atividade mitocondrial, onde AC ( $139,6 \pm 22,72$  UFC) e AR ( $123,1 \pm 12,51$  UFC) mostraram diferenças significativas entre as células estressadas ( $15,43 \pm 21,76$  UFC) e similaridade em relação ao ensaio controle ( $145,5 \pm 13,82$  UFC), ou seja, as substâncias não afetam a funcionalidade mitocondrial em células que não estejam sob estresse.

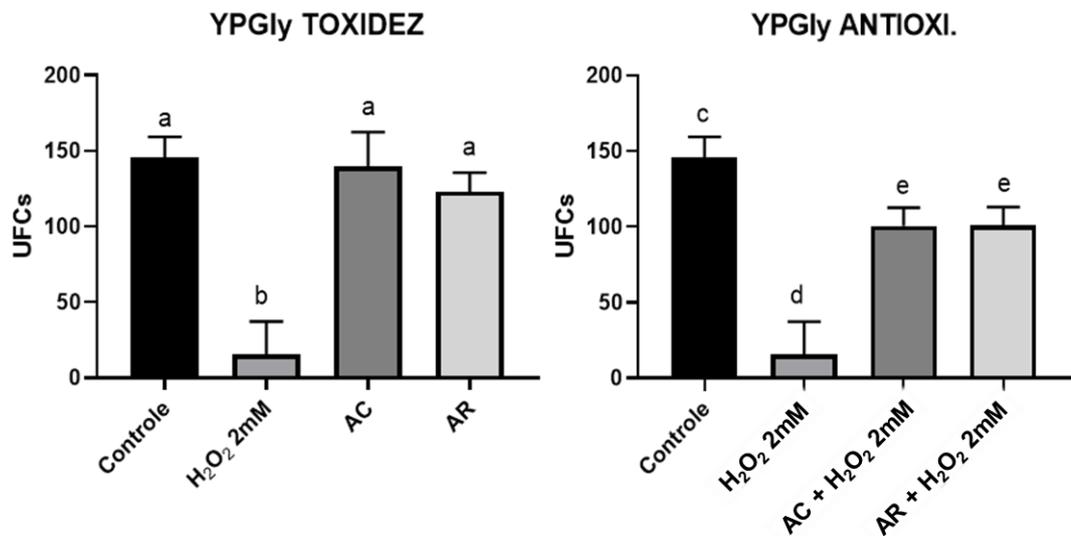


Figura 39: Disfunção mitocondrial das células tratadas com as substâncias artepelin C (AC) e ácido rosmarínico (AR) e posteriormente estressadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,0 mM).

Após a adição do peróxido de hidrogênio pós-incubação às substâncias isoladas tem-se a situação de estresse oxidativo, onde AC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $100,6 \pm 11,94$  UFC) e AR + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $100,7 \pm 12,15$  UFC) foram estatisticamente diferentes tanto do controle ( $145,5 \pm 13,82$  UFC) como das células estressadas ( $15,43 \pm 21,76$  UFC); revelando que essas substâncias mostram caráter antioxidante como nos experimentos anteriores e contribuem para a melhora no funcionamento da mitocôndria, pois conseguem aumentar a sobrevivência celular em meio não fermentativo. Assim, como os tratamentos com os extratos EEP50, EEP100 e EHP50, as substâncias artepelin C e ácido rosmarínico apresentam proteção antioxidante às células, que direta ou indiretamente possuem uma melhoria na funcionalidade mitocondrial em células sob estresse oxidativo.

### **5.11 Consumo de Oxigênio pelas Células sob Estresse na Presença dos Isolados**

Durante a respiração basal os tratamentos com as substâncias artepelin C ( $5,27 \pm 1,335$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) e ácido rosmarínico ( $4,71 \pm 0,9595$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) apresentaram valores estatisticamente iguais às células sob estresse ( $3,86 \pm 0,6937$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>), porém o artepelin C também é estatisticamente igual ao controle negativo com  $p < 0,05$  ( $6,82 \pm 0,4174$  nmol de O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>); mostrando uma característica antioxidante mesmo que

pequena (Figura 40A). Com a adição do desacoplador FCCP poderia ser observado um aumento do consumo de oxigênio pela mitocôndria, o que só ocorre no controle ( $10,58 \pm 1,040$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), mostrando que as substâncias AC ( $4,42 \pm 1,143$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) e AR ( $6,54 \pm 2,284$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) nessa concentração não contribuem para uma melhoria na função mitocondrial relacionada ao consumo de oxigênio molecular, possuindo valores estatísticos iguais às células estressadas ( $4,88 \pm 1,937$  nmol de  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) (figura 40B).

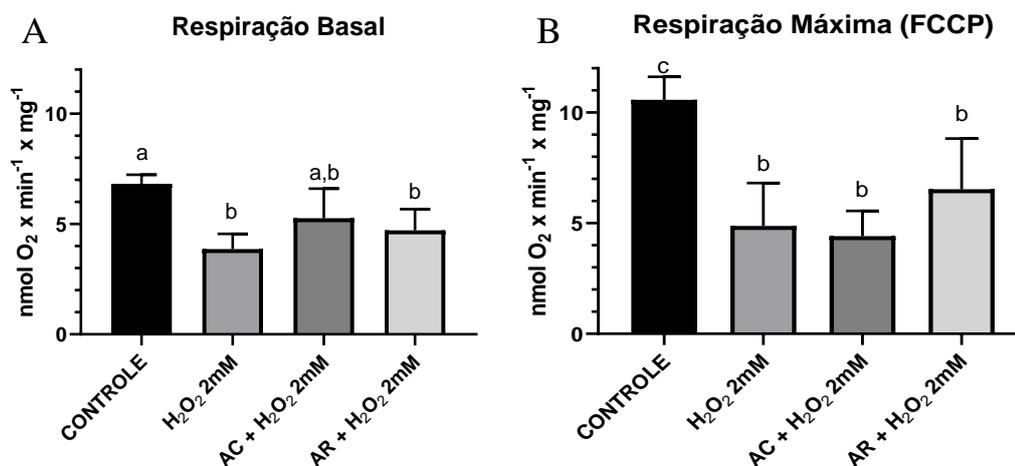


Figura 40: Consumo de oxigênio das leveduras na respiração basal (A) e respiração máxima na presença de FCCP (B).

É possível perceber pelos resultados que as células de levedura estão respirando, e ao adicionar o desacoplador FCCP há uma resposta considerável apenas das células do controle negativo, o que pode estar relacionado ao fato de que as demais células estão com as mitocôndrias danificadas pelo estresse oxidativo e os ácidos fenólicos utilizados não foram capazes de melhorar a atividade mitocondrial. Diferente do que foi observado durante avaliação da disfunção mitocondrial onde as substâncias fenólicas foram capazes de, aparentemente, proteger a mitocôndria das EROs mostrando que talvez o tratamento ajude a organela e a célula de uma maneira geral reduzindo e/ou impedindo os danos gerados pela adição do agente oxidante.

Kubiliene et al (2018) revela em suas pesquisas que alguns ácidos fenólicos e flavonoides possuem a capacidade de interagir e se estabilizar na membrana das mitocôndrias e fazer o papel de um desacoplador, aumentando assim o consumo de  $O_2$  e diminuindo a

formação de EROs mitocondriais. Isto não foi observado nestes resultados, pois talvez a concentração das substâncias esteja baixa, não sendo suficiente para influenciar na função mitocondrial. Kubiliene e colaboradores verificaram efeito nas mitocôndrias a partir de 32  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de compostos fenólicos e no presente trabalho utilizou apenas 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada ácido fenólico, AC e AR. Mesmo não possuindo uma atividade mitocondrial elevada, AC foi a substância que possuiu melhores resultados entre as duas substâncias avaliadas. O artepelin C, assim como EEP50, apresentaram ação antioxidante contribuindo com a diminuição dos danos causados pelo estresse oxidativo, mas o AC não foi capaz de melhorar a funcionalidade mitocondrial como o que foi demonstrado no mesmo ensaio com o extrato EEP50 (Figura 34).

## 6. CONCLUSÕES

O extrato etanólico de própolis verde não foi tóxico em nenhuma das concentrações utilizadas, apresentando caráter antioxidante no ensaio de sobrevivência celular, tanto em meio fermentativo como em meio não fermentativo. Apenas no consumo de oxigênio, que avalia diretamente a influência na mitocôndria, o extrato etanólico de própolis em 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (EEP50) foi o único a contribuir positivamente para funcionamento mitocondrial.

O extrato hexânico de própolis demonstrou, logo no início dos experimentos, ser tóxico na concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Embora a concentração EHP100 não tenha sido tóxica para as células, esta causou disfunção mitocondrial e não apresentou atividade antioxidante. Já EHP50 mostrou ser capaz de diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo nas células, mas não diretamente na mitocôndria.

As substâncias puras avaliadas e que estão presentes na própolis verde, artepelin C e ácido rosmarínico, também demonstraram possuir propriedades antioxidantes, sendo capazes de diminuir os danos causados pelo peróxido na maioria dos diferentes ensaios, inclusive no experimento de disfunção mitocondrial. Porém, ao analisar a mitocôndria especificamente, o artepelin C apresentou pequena contribuição apenas na respiração basal. Mesmo que o tratamento apresente atividade antioxidante e proteja as leveduras dos danos causados pelo peróxido aumentando a viabilidade celular, tanto artepelin C quanto ácido rosmarínico não foram capazes de interferir diretamente na função respiratória das células. Talvez a concentração utilizada pode estar abaixo do necessário para que consiga fazer um maior efeito na organela em questão.

Das amostras avaliadas neste trabalho, o extrato etanólico de própolis em 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (EEP50) foi aquele que apresentou o melhor caráter antioxidante e o único a contribuir positivamente na cadeia transportadora de elétrons, sendo claramente devido aos componentes presentes nessa amostra. Certamente a ação sinérgica das substâncias fenólicas (ácidos fenólicos e flavonoides) e outros compostos presentes neste extrato e nestas concentrações foi benéfica para as células e provavelmente algumas substâncias presentes no extrato etanólico foram capazes de atuar direta ou indiretamente sobre a função mitocondrial e proteger os complexos presentes nas cadeias transportadoras de elétrons. Já o extrato com características apolares na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (EHP50) apresentou ótimos resultados diminuindo a peroxidação lipídica e aumentando a viabilidade celular em meio fermentativo, onde certamente

as substâncias presentes no extrato hexânico não promoveram o mesmo efeito do extrato etanólico mais polar, contudo foi capaz de atuar na proteção das membranas celulares.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACC. *American Association for Clinical Chemistry*. 27 de Julho de 2019. <https://labtestsonline.org.br/tests/ldh> (acesso em 14 de Dezembro de 2020).
- ABDULLAH, Nurul Aliah, et al. "Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam." *Heliyon* 5, n° 9 (setembro 2019).
- AKAMINE, Larissa Naomi Lima. *Bioquímica do Envelhecimento*. 2011. <http://envelhecimentounb94.blogspot.com/2011/10/senescencia-da-membrana-plasmatica.html> (acesso em 17 de novembro de 2019).
- ALMEIDA, Gabriel Moretti de. *Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de Moniliophthora pernicioso (fungo da vassoura de bruxa) em Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014.
- ALMEIDA, MARIANA BORTHOLAZZI. *Uso Do Biomarcador Malondialdeído Em Análise De Estresse Oxidativo Em Diversos Modelos Experimentais*. Dissertação (Mestrado), Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2014.
- ARRUDA, caroline. "estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido p-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários." tese de doutorado, faculdade de ciências farmacêuticas de ribeirão preto, universidade de são paulo, ribeirão preto, 2019.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira, Neuza Maria Brunoro COSTA, Rita de Cássia Gonçalves ALFENAS, Sérgio Oliveira DE PAULA, Valéria Paula Rodrigues MINIM, e Josefina BRESSAN. "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios." *Revista de Nutrição*, 23(4), jul./ago. 2010: 629-643.
- BARCELOS, Isabella Peixoto de, e Richard H. Haas. "CoQ10 and Aging." *Biology* 8 (2018).
- BASTOS, EMAF, Santana. RA, AGF Calaça-Costa, e PS Thiago. "Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais." *Braz. J. Biol.* 71 (3) (2011): 727-734.
- BAYLIAK, Maria M., Nadia I. Burdylyuk, e Volodymyr I. Lushchak. "Quercetin increases stress resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* not only as an antioxidant." *Annals of Microbiology* 66 (2016): 569-576.
- BIANCHI, Maria de Lourdes Pires, e Lusânia Maria Gregg ANTUNES. "Radicaís Livres E Os Principais Antioxidantes Da Dieta." *revista de nutrição* 12, n° 2 (maio-agosto 1999): 123-130.
- BUSSO, Cleverson. "Caracterização Funcional da Proteína Coq10p de *Saccharomyces cerevisiae* na Atividade Respiratória da Coenzima Q." Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- CAMPOS, Viviane Aparecida Costa, Helvécio Martins dos Santos Júnior, Denilson F. Oliveira, Hudson Walace Pereira de Carvalho, Alan Rodrigues Teixeira Machado, e Aline Auxiliadora Tirelli. "Antibacterial Activity Of Propolis Produced By *Frieseomelitta varia*." *Ciênc. agrotec.* 35 (6) (nov./dez. 2011): 1043-1049.

- CARRÃO, Daniel Blascke. “Estudo de Metabolismo in vitro do Componente Majoritário da Própolis Verde Brasileira, Artepelin C, Empregando Microssomas Hepáticos.” Dissertação, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2015.
- CASTRO, Patrícia Alves de. “identificação dos mecanismos de letalidade da própolis em *saccharomyces cerevisiae* e *candida albicans*.” dissertação, faculdade de medicina de ribeirão preto, universidade de são paulo, ribeirão preto, 2012.
- CASTRO, Patrícia Alves de, et al. “Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*.” Edição: American Society for Microbiology. *EUKARYOTIC CELL* 10, nº3 (março 2011): 398–411.
- CAVALARO, Renata Iara, Richtier Goncalves da Cruz, Sebastien Dupont, Juliana Maria Leite, Nobrega de Moura Bell, e Thais Maria Ferreira de Souza Vieira. “In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction.” *Food Chemistry: X* 4 (dezembro 2019).
- CEDIKOVA, Miroslava, et al. “Effects of the Czech Propolis on Sperm Mitochondrial Function.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014 (2014).
- CHANG, Xing, Tian Zhang, Wenjin Zhang, Zhenyu Zhao, e Jiahui Sun. “Natural Drugs as a Treatment Strategy for Cardiovascular Disease through the Regulation of Oxidative Stress.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- CIGUT, Tanja, Tomaz Polak, Lea Gasperlin, Peter Raspor, e Polona Jamnik. “Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011.
- CIOFFI, Federica, Rayan Hassan Ibrahim Adam, e Kerensa Broersen. “Molecular Mechanisms and Genetics of Oxidative Stress in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 72 (2019): 981–1017.
- DALVI, Luana Taquette. “Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido elágico in vitro e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e deficiente em superóxido dismutase 1.” Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- DOI, Kenichiro, et al. “Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis.” *in vivo* 31 (2017): 187-198.
- ENGERS, Vanessa Krüger, Camile Saul Behling, e Matias Nunes Frizzo. “A Influência Do Estresse Oxidativo No Processo De Envelhecimento Celular.” *Revista contexto e Saúde* 10, nº 20 (janeiro-junho 2011): 93-102.
- FADEL, Ophélie, Karim El Kirat, e Sandrine Morandat. “The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, nº 12 (dezembro 2011): 2973-2980.
- FALCAO, Rosângela A., et al. “Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013 (2013).

- FERRARI, Carlos K.B. “Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging.” *Biogerontology* 5 (2004): 275-289.
- FLORIOS, Daia. *Alecrim-do-campo: planta do cerrado, medicinal e produtora da própolis verde*. 2017. <https://www.greenme.com.br/usos-beneficios/4828-alecrim-do-campo-propolis-verde/> (acesso em 27 de outubro de 2020).
- FORD, Earl S., Ali H. Mokdad, Wayne H. Giles, e David W. Brown. “The Metabolic Syndrome and Antioxidant Concentrations.” *Diabetes* (American Diabetes Association) 52 (2003).
- FRANÇA, BRUNA KAROLINE, et al. “Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos.” *GE Jornal Portugues de Gastreterologia*, Setembro-Outubro 2013: 199-206.
- GEMELLI, Tanise, Rodrigo Binkowski de ANDRADE, Alexandre Luz CASTRO, Larissa Pacheco GARCIA, e Cláudia FUNCHAL. “Estresse Oxidativo Como Fator Importante Na Fisiopatologia Da Doença De Alzheimer.” *Revista Uniara* 16, n.1 (julho 2013).
- GOMES, Fernando. “A síntese de coenzima Q e a estabilidade de DNA mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*.” Dissertação, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- GOTTLIEB, Maria Gabriela Valle, Alessandra Loureiro Morassutti, e Ivana Beatrice Mânica da Cruz. “Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva.” *Scientia Medica* 21, nº 2 (2011): 69-80.
- GUEDES, Raquel Fonseca. “Caracterização Fenotípica e Genotípica Preliminar de Seis Genes Nucleares de Provável Função Mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*.” Dissertação (mestrado), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 2006.
- GUIMARÃES, Natalia S. S., et al. “*Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage.” *Food and Chemical Toxicology* 50, nº 3-4 (abril-maio 2012): 1091-1097.
- KOCOT, Joanna, Małgorzata Kielczykowska, Dorota Luchowska-Kocot, Jacek Kurzepa, e Irena Musik. “Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application.” *oxidative medicine and celular longevity* 2018, ed. especial (2018).
- KRINSKY, NORMAN I. “Membrane Antioxidants.” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 551(1 *Membrane in C*), 1988: 17-32.
- KUBILIENE, Loreta, et al. “Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties.” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, maio 2018.
- LE MOS, Marivane, Muriel Primon de Barros, João Paulo Barreto Sousa, Ademar Alves da Silva Filho, Jairo Kenupp Bastos, e Sérgio Faloni de Andrade. “*Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59 (2007): 603–608.
- LI, Sen, Guowei Chen, Chao Zhang, Man Wu, Shuyan Wu, e Qing Liu. “Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases.” *Food Science and Human Wellness* 3, nº 3-4 (setembro-dezembro 2014): 110-116.

- LUSTOSA, Sarah R., Alexandre B. Galindo, Lívio C. C. Nunes, Karina P. Randau, e Pedro J. Rolim Neto. "Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, nº 3 (julho-setembro 2008): 447-454.
- MACHADO, Bruna Aparecida Souza, et al. "Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil." *PLOS ONE*, 2016: 1-26.
- MACHADO, Joleen Lopes, et al. "Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 (2012).
- MAHARJAN, B. R., et al. "Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in ischemic heart disease patients from western region of Nepal." *Nepal Med Coll J.* 10, nº 1 (março 2008): 20-24.
- MARNETT, Lawrence J. "Oxyradicals and DNA damage." *Carcinogenesis* 21, nº 3 (2000): 361-370.
- MARTINS, Nádia Maria. *Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos wistar: efeito protetor de dimetiltiouréia*. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2007.
- MARTINS, Vicente de Paulo. *Respiração mitocondrial, Fosforilação oxidativa, clonagem e expressão heteróloga de uma oxidase alternativa de Paracoccidiodes brasiliensis*. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2007.
- MENDONÇA, Priscila Silva, Antônio Augusto Ferreira Carioca, E Fernanda Maria Machado Maia. "Interações entre estresse oxidativo, terapia utilizada e estadiamento em pacientes com câncer colorretal." *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2014: 129-134.
- MONTEIRO, Raquel Fonseca Guedes. *Estudo De Proteínas Que Afetam A Tradução Mitocondrial em Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2017.
- MORAES, JÚLIA. *Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro*. Monografia (graduação), Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
- MUSHTAQ, Nadia, et al. "Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats." *cell biochemistry and function* 32, nº 3 (2014): 287-293.
- NASSEH, Ibrahim E., Célia H. Tengan, Beatriz H. Kiyomoto, e Alberto Alain Gabbai. "Doenças Mitocondriais." *Rev. Neurociências* 9, nº 2 (2001): 60-69.
- NELSON, David L., e Michael M. Cox. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª. Artmed, 2014.

- NI, Junjun, et al. "The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- OLIVEIRA, Vanessa Patrocínio de, Ana Cristina Rocha Espescht, e Maria do Carmo Gouveia Peluzio. "Flavonóides e doenças cardiovasculares: Ação antioxidante." *revista médica de minas gerais* 16 (outubro-dezembro 2006): 234-238.
- OSORIO, Rodrigo de Paulo. "Avaliação Da Toxidez Dos Óleos Essenciais DE *Ocimum gratissimum* e *Cymbopogon nardus* em Células de *Saccharomyces cerevisiae*." Instituto De Química, Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Seropédica - RJ, 2018.
- PAULELA, Janaina Areias. "Caracterização de Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Deficientes na Biossíntese da Coenzima Q." Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- PAZIN, W.M., N. Vilanova, I.K. Voets, A.E.E. Soares, e A.S. Ito. "Effects of artemisinin C on model membranes displaying liquid immiscibility." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 52, nº 3 (março 2019).
- PEREIRA, Alberto dos Santos, Fernando Rodrigues Mathias Silva Seixas, e Francisco Radler de Aquino Neto. "Própolis: 100 Anos De Pesquisa E Suas Perspectivas Futuras." *Química Nova* 25, Nº2 (2002): 321-326.
- PEREIRA, Hélder Ricardo Cardoso. "Genotoxic, phytotoxic and protective effects of Portuguese propolis." Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, 2013.
- PEREIRA DA SILVA, A. P. "Mecanismos De Ação Do 3-Bromopiruvato, Um Agente Anti-Tumoral, Sobre O Metabolismo Energético De Células Derivadas De Hepatocarcinoma Humano." Tese de Doutorado, Instituto De Bioquímica Médica, Universidade Federal Do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- PIRES, Joana Manuela Capela. "Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio." Tese de Doutorado, Universidade de Évora, Évora - Portugal, 2017.
- PIRES, Lucas de Oliveira. "Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) de derivados prenilados da própolis verde." Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2019.
- PÔRTO, Weyler Galvão. "Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia?" *Rev. Neurociências* 9, nº 2 (2001): 70-76.
- PRADO, Paula Favoretti Vital Do. "Caracterização Dos Mecanismos De Resistência A Estrobilurinas No Fungo *Moniliophthora perniciosa*, Agente Causador Da Vassoura De Bruxa Do Cacaueiro." Dissertação, Instituto De Biologia, Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2016.
- PRUDÊNCIO, Edlene Ribeiro. *Estudo Do Potencial Antioxidante De Diferentes Classes De Moléculas Isoladas De Mel E Própolis Em Células De *Saccharomyces cerevisiae**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Instituto De Ciências Exatas, Programa De Pós-Graduação Em Química, 2016.

- REDE D'OR SÃO LUIZ. s.d. <https://www.rededorsaoluiz.com.br/exames-e-procedimentos/analises-clinicas/ldh> (acesso em 14 de Dezembro de 2020).
- SÁ, Rafael A. De, Frederico A. V. De Castro, Elis C. A. Eleutherio, Raquel M. De Souza, Joaquim F. M. Da Silva, E Marcos D. Pereira. "Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress." *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 3, 2013: 993-1000.
- SALGUEIRO, Fernanda B., e Rosane N. Castro. "Comparação Entre A Composição Química E Capacidade Antioxidante De Diferentes." *Quimica Nova*, 39 (2016): 1192-1199.
- SALGUEIRO, FERNANDA BARBOSA. "Caracterização Da Própolis Verde Brasileira: Substâncias Fenólicas, Atividade Biológica E Análise Quimiométrica." Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Seropédica - RJ, 2016.
- SALVADOR, MIRIAM, e JOAO ANTONIO PEGAS HENRIQUES. *Radicais Livres E a Resposta Celular Ao Estresse Oxidativo*. 1ª. Ulbra, 2004.
- SCHIAVONE, Marion, et al. "Evidence for a Role for the Plasma Membrane in the Nanomechanical Properties of the Cell Wall as Revealed by an Atomic Force Microscopy Study of the Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (15) (2016).
- SÉFORA-SOUSA, M., e M.C. De Angelis-Pereira. "Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose." *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15, nº 4 (2013): 617-626.
- SERRA, J. A., et al. "Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients." *Journal Neural Transmission* 108 (2001): 1135-1148.
- SIES, Helmut, Carsten Berndt, e Dean P. Jones. "Oxidative Stress." *Annual Review of Biochemistry* 86 (junho 2017): 715-748.
- SILVA, Andreza Amaral da, e Roberto Calderon Gonçalves. "Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais." *Ciência Rural* 40, nº 4 (abril 2010): 994-1002.
- SILVA, gabriele marisco da. "caracterização fenotípica dos mutantes *adh1Δ* e *adh2Δ* e resposta de sensibilidade do mutante após a metabolização de dissulfiram em *Saccharomyces cerevisiae*." dissertação, Programa De Pós-Graduação Em Genética E, Universidade Estadual De Santa Cruz, Ilhéus – Bahia – Brasil, 2009.
- SILVA, Mariana Rodrigues da, Rosiane Gomes Silva Oliveira, e Mirley Alves Vasconcelos. "Avaliação do efeito anticarcinogênico da própolis verde (Artepelin C ) por meio do teste warts em células somáticas de *Drosophila melanogaster*." *Revista Perquirere* 15, nº 1 (janeiro-abril 2018): 285-296.
- SILVA, Sarah Martins Presti da. "Efeitos Do Tratamento Com Ácido Rosmarínico Em Parâmetros Bioquímicos E Motores Em Modelo Pré Clínico Da Doença De Parkinson." Universidade Federal Do Espírito Santo, Vitória - ES, 2018.
- SILVA, Wallison Junio Martins da, e Carlos Kusano Bucalen Ferrari. "Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento." *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia* 14, nº 3 (2011): 441-451.

- SOARES, Sergio Eduardo. “Ácidos fenólicos como antioxidantes.” *revista de nutrição* 15 (janeiro-abril 2002): 71-81.
- SOODI, Maliheh, Abolfazl Dashti, Homa Hajimehdipoor, Shole Akbari, e Nasim Ataei. “Melissa officinalis Acidic Fraction Protects Cultured Cerebellar Granule Neurons Against Beta Amyloid-Induced Apoptosis and Oxidative Stress.” *Cell Journal* 18 (4) (2017): 556–564.
- SOUZA, Carolina Fischinger Moura de. *Um Estudo Clínico, Bioquímico, Histoquímico E Genético-Molecular De Pacientes Com Doenças Do Dna Mitocondrial*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2005.
- SOUZA, Marcele Lorentz Mattos De. “Estudo Da Citotoxicidade Do Ácido Rosmarínico Em Modelos In Vitro De Câncer Humano.” Dissertação, Centro De Ciências Da Saúde - Programa De Pós-Graduação Em Bioquímica E Farmacologia, Universidade Federal Do Espírito Santo, Vitória - ES, 2017.
- STANLEY, D., A. Bandara, S. Fraser, P.J. Chambers, e G.A. Stanley. “The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.” *Journal of Applied Microbiology*, 2010: 13-24.
- STEELS, E. L., R. P. Learmonth, e K. Watson. “Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically.” *Microbiology Society* 140 (1994): 569-576.
- SZLISZKA, EWELINA, GRZEGORZ ZYDOWICZ, ELZBIETA MIZGALA, e WOJCIECH KROL. “Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis.” *International journal of oncology* 41, n° 3 (2012): 818–828.
- TECZA, RENATA ZADRAG, e MAGDALENA KWOLEK MIREK. “Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells.” *FEMS*, 2014: 1068-1079.
- TEIXEIRA, EW, G Negri, RM Meira, D Message, e A Salatino. “Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry.” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2 (2005): 85-92.
- UTO, Yoshihiro, et al. “Artepillin C isoprenomics: Design and synthesis of artepillin C isoprene analogues as lipid peroxidation inhibitor having low mitochondrial toxicity.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, n° 16 (agosto 2006): 5721–5728.
- VALVERDE, Michelle. *Apicultores mineiros se articulam para proteger a produção de própolis verde*. 2020. <https://diariodocomercio.com.br/exclusivo/apicultura-mineira-disputa-realizacao-de-congresso-para-fortalecer-propolis-verde/> (acesso em 27 de outubro de 2020).
- VARELA-LÓPEZ, Alfonso, Pedro Bullón, Francesca Giampieri, e José L. Quiles. “Non-Nutrient, Naturally Occurring Phenolic Compounds with Antioxidant Activity for the Prevention and Treatment of Periodontal Diseases.” *Antioxidants* 4 (2015): 447-481.
- VASCONCELOS, Sandra Mary Lima, Marília Oliveira Fonseca Goulart, José Benedito de França Moura, Vanusa Manfredini, Mara da Silveira Benfato, e Lauro Tatsuo Kubota. “Espécies Reativas De Oxigênio E De Nitrogênio, Antioxidantes E Marcadores De

- Dano Oxidativo Em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos Para Sua Determinação.” *Química Nova* 30, nº 5 (2007): 1323-1338.
- VEIGA, R.S., et al. “Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC.” *Journal of Applied Microbiology*, abril de 2017, 4 ed.: 911-920.
- VISSERS, Margreet C.M., Mark B. Hampton, e Anthony J. Kettle. *Hydrogen Peroxide Metabolism in Health and Disease*. CRC Press, 2018.
- VOET, Donald, e Judith G. VOET. *Bioquímica*. 4ª. ARTMED, 2013.
- YEN, Chi-Hua, Nae-Cherng Yang, Bor-Jen Lee, Jui-Yuan Lin, Simon Hsia, e Ping-Ting Lin. “The Antioxidant Status and Concentrations of Coenzyme Q10 and Vitamin E in Metabolic Syndrome.” *The Scientific World Journal*, 2013.
- ZACCARIA, Vincenzo, et al. “Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation.” *Nutrients* 9 (10): 1090 (2017).
- ZHANG, Y, X. Chen, L. Yang, Y. Zu, e Q. Lu. “Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice.” *Food & Function* 6, nº 3 (2015): 927-931.