



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

FRANCISCO VITOR AIRES NUNES

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DA PRÓPOLIS DA
ABELHA *Frieseomelitta doederleini* PRODUZIDA NO SEMI-ÁRIDO
NORDESTINO**

MOSSORÓ-RN
2018

FRANCISCO VITOR AIRES NUNES

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DA PRÓPOLIS DA
ABELHA *Frieseomelitta doederleini* PRODUZIDA NO SEMI-ÁRIDO
NORDESTINO**

Tese apresentada á Universidade Federal Rural do
Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para
obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciência Animal

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas

MOSSORÓ-RN
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

N972a Nunes, Francisco Vitor Aires.
Avaliação fitoquímica e farmacológica da própolis
da abelha Frieseomelitta doederleini produzida no
Semi-Árido Nordeste / Francisco Vitor Aires
Nunes. - 2018.
85 f. : il.

Orientador: Jael Soares Batista .
Coorientador: Carlos Ibere Alves Freitas .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2018.

1. : Composição fitoquímica. 2. própolis. 3.
Frieseomelitta doederleini. 4. atividade
farmacológica. I. Batista , Jael Soares , orient.
II. Freitas , Carlos Ibere Alves , co-orient.
III. Título.

Bibliotecário-Documentalista
Nome do profissional, Bib. Me. (CRB-15/10.000)

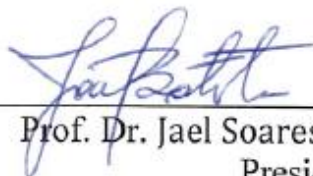
FRANCISCO VITOR AIRES NUNES

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DA PRÓPOLIS DA
ABELHA *Frieseomelitta doederleini* PRODUZIDA NO SEMI-ÁRIDO
NORDESTINO**

Tese apresentada a Universidade Federal Rural do
Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para
obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciência Animal.

Defendida em: 22 / 02 / 2018.

BANCA EXAMINADORA



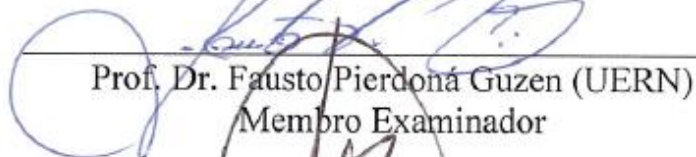
Prof. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)
Presidente



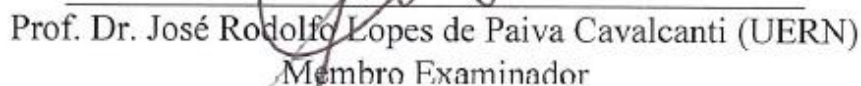
Prof. Dr. Carlos Ibere Alves Freitas (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Raimundo Alves Barreto Junior (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Fausto Pierdoná Guzen (UERN)
Membro Examinador



Prof. Dr. José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti (UERN)
Membro Examinador

FRANCISCO VITOR AIRES NUNES

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS
DA PRÓPOLIS DA ABELHA *Frieseomelitta doederleini* PRODUZIDA NO
SEMI-ÁRIDO NORDESTINO**

EQUIPE ENVOLVIDA

DOUTORANDO: Francisco Vitor A. Nunes **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Sanidade animal
ENDEREÇO: R. Augusto da Escócia, 272 **CPF:** 047.082.364-09
E.MAIL: vitor_farmacia@hotmail.com **TELEFONE:** (84) 98815-4228

ORIENTADOR: Jael Soares Batista **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Sanidade animal
ENDEREÇO: BR 110 Km 47 **CPF:** 684.931.933-72
E.MAIL: jaelsoares@ufersa.edu.br **TELEFONE:** (84) 8864-5368

MOSSORÓ-RN
2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCISCO VITOR AIRES NUNES – Filho de Francisco das Chagas Nunes e Francisca Itacira Aires Nunes, nasceu em 07/03/1983, na cidade de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Coursou o ensino fundamental no Colégio Educandário Imaculada Conceição na cidade de Pau dos Ferros e o ensino médio no Colégio Nossa Senhora das Neves na cidade de Natal, ambas pertencentes ao Estado do Rio Grande Do Norte. Ingressou no ensino superior em 2002, na Universidade Potiguar (UNP), no curso de Farmácia, no qual exerceu atividades de monitoria durante toda a sua graduação, além de estágios extracurriculares na área de Farmácia Hospitalar e de Biologia Molecular. Obteve o título de Bacharel em Farmácia em 2005 e modalidade de Bioquímico em 2007. Concluiu a especialização em Docência no Ensino Superior pela Universidade Potiguar em 2010. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, na modalidade Mestrado, pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2009, sob a orientação da professora Doutora Silvia Maria Ahid. Desenvolveu pesquisa sobre a soroprevalência e fatores de risco da toxoplasmose em caprinos de Mossoró-RN. Concluiu Mestrado em 2011. Atuou como professor das disciplinas de Biologia Celular, Microbiologia e Imunologia, Toxicologia, Farmacologia Aplicada e Mecanismos de Agressão e Defesa dos cursos de Enfermagem, Fisioterapia e Nutrição na Universidade Potiguar; e Farmacologia Aplicada e Processos Terapêuticos na Faculdade de Enfermagem Nova Esperança (FACENE); também atuou como Farmacêutico-Bioquímico da Prefeitura Municipal de Mossoró até o ano de 2016. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Análises Clínicas, Farmacologia e Farmácia Clínica, e na área de Educação, com ênfase em Metodológicas Ativas de Ensino. Atualmente é professor da disciplina de Bases Morfofisiofarmacológicas do Curso de Medicina da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, na modalidade Doutorado, pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2014, sob a orientação do professor Doutor Jael Soares Batista. Desenvolveu pesquisas sobre avaliação fitoquímica e das atividades farmacológicas da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* produzida no semi-árido nordestino.

A todos que de alguma forma, direta e indiretamente, contribuíram para a conclusão de mais um fase importante na minha vida, em especial minha família: Pais e Irmãos. Vocês estiveram sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de realizar o curso;

Agradecimento especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, nas Pessoa do professor Alexandre Rodrigues, Coordenador do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, pela oportunidade, incentivo e compreensão. Meus sinceros agradecimentos;

A Deus por me manter forte e perseverante para alcançar meus objetivos;

A todos os professores do programa pelos ensinamentos transmitidos, em especial aos professores Jael Sores, Carlos Iberê e Jean Berg.

Ao meu orientador Dr. Jael Soares Batista e meu co-orientador Dr. Carlos Ibere Alves Freitas, pela dedicação, empenho e paciência durante as orientações e ensinamentos conduzidos durante o doutorado. De coração agradeço por tornarem esse sonho possível;

A minha família, fonte de inspiração em tudo. Aos meus pais Francisco das Chagas Nunes e Francisca Itacira Aires Nunes por serem minhas referências; por serem fonte de carinho, amor, apoio e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus irmãos Igor, Hugo e Iuri pelo companheirismo, torcida e incentivo;

Aos demais familiares: tios e primos por sempre torcerem por mim;

Aos amigos Keilson, Keilerte, Carlos Eduardo, Antônio Rebouças, Erick, Helena, Alex, Marcia, Sheila, Fred, Vanessa, Bruna, Renato, Alcivaneide, Alexcia por me incentivarem a continuar sempre em frente;

Aos amigos da UNP e aos que já saíram, mas sempre fizeram presentes quando precisei: Pablo Castro, Cayo Riketh, Deivison Wendel, Fausto Guzen, Georges Willeneuwe, André Pessoa, Rosa Nubia, Samuel, Jerônimo, Madermerson, Carlos Moura.

Aos amigos da FACENE Andreza Rochelle, Marília, Wesley Adson, Carlos, Lucidio, Ane, Aliona, Alcivan Nunes, Tiberio, Vicente... pelas inúmeras palavras de apoio;

Aos amigos da UFERSA Rociene, Andrea Tabora, Maiara, Isabella, Flavio, Aline, Joelton pela compreensão, ajuda e inúmeras palavras de apoio.

Aos colegas do programa pelo excelente convívio, por sempre me ouvirem, por compartilharam preocupações e vitórias, e me ajudaram no decorrer do doutorado, em especial Kizzy, Kaliane, Jardel, Savio, Jovilma, Vanessa, Keila, Fernanda e Carla.

Aos amigos bioquímicos e da prefeitura Nubia Cardoso, Saul Batista, Jorge, Marcos, Wallace, Fernanda, Jerfferson, Isabel, Claudia, Wagney, Canindé e João Eduardo (em memória), sempre prontos a me ajudarem no que fosse necessário;

Aos amigos do karatê... Oss

Ao professor do IFRN Leonardo e ao bolsista Barros. A professora da UFRN Silvana e da doutoranda Julia. A Felipe da BiotecCell. Todos pelas ajudas na realização dos experimentos.

A minha namorada, Juliane Moura, por seu carinho, amor e compreensão no decorrer dessa jornada.

Aos membros participantes da banca da minha defesa pela disponibilidade para o enriquecimento desta tese;

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DA PRÓPOLIS DA ABELHA *Frieseomelitta doederleini* PRODUZIDA NO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO

NUNES, Francisco Vitor Aires Nunes. **Avaliação fitoquímica e das atividades farmacológicas da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* produzida no semi-árido nordestino.** 2018. 84 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2018.

Própolis é um material resinoso de coloração e consistência variadas, obtido por abelhas através da coleta de resinas da flora da região, e alteradas pela ação de enzimas contidas em sua saliva. A própolis produzida pelas abelhas com ferrão já foram amplamente estudadas a fim de comprovar as suas atividades farmacológicas e são assim, utilizados para diversas aplicações medicinais. Entretanto, em relação à própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini*, estudos sistematizados sobre suas atividades farmacológicas são escassos. Este estudo objetivou avaliar a composição fitoquímica e as atividades farmacológicas da própolis da abelha *F. doederleini*; para tanto, amostras de própolis da abelha foram obtidas no município de Serra do Mel, Região Oeste do Rio Grande do Norte, as quais tiveram suas atividades farmacológicas avaliadas: antioxidante (através do método DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico); antibacteriana através do método de difusão em ágar e microdiluição para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bacteriana Mínima (CBM); cicatrizante, através da indução de feridas cirúrgicas experimentais em ratos Wistar, além do crescimento de fibroblastos em tempo real; citotóxica pelo método do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e por fim, a mutagenicidade pelo método de micronúcleos. A análise fitoquímica revelou a presença de saponinas, compostos fenólicos, flavonoides agliconas e o método de Co-CCD identificou os compostos quercetina e canferol. A própolis apresentou concentração de 35,55mg EAG.g⁻¹ de fenóis totais. Apresentou expressiva atividade antioxidante pelo método DPPH, com um IC₅₀ de 46,39 ppm, já pelo método ABTS a atividade antioxidante foi mais discreta, com uma IC₅₀ 440.44 ppm. O extrato foi considerado eficaz no que se refere a atividade antibacteriana, pois promoveu a formação de halos de inibição com tamanho ≥ 9 mm para todas as cepas quando testadas em ágar Mueller Hinton . A Concentração Inibitória Mínima (CIM), no teste de microdiluição, variou de 3,125 a 25mg.mL⁻¹ para os 11 microrganismo testados, mostrando a melhor CIM contra *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa relacionada a resistência aos antimicrobianos. A Concentração Bacteriana Mínima (CBM) variou de 6,25 a 50 mg.mL⁻¹. A análise do processo de cicatrização sob os pontos de vista clínico, macroscópico e histológico permitiu concluir, que o uso do creme à base de própolis apresentou influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais, por promover reação inflamatória menos intensa e fechamento mais rápido das feridas em relação ao grupo controle, assim como estimulou o maior crescimento de fibroblastos. No teste de citotoxicidade por MTT é possível observar atividade citotóxica maior para células de carcinoma de colón nas concentrações de 3,12 µg.mL⁻¹, 6,25 µg.mL⁻¹ e 12,5 µg.mL⁻¹, esta ultima concentração conseguiu inibir a viabilidade celular das células cancerígenas em mais de 50%. Quanto a avaliação do potencial mutagênico a própolis induziu aumento na frequência de células micronucleadas apenas na maior concentração avaliada (250 µg.mL⁻¹). Assim foi possível concluir que o estrato hidroalcoólico da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* apresentou uma composição química variada e promissoras atividades farmacológicas, destacando-se a antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante e anti-neoplasica.

Palavras Chaves: Composição fitoquímica, própolis; *Frieseomelitta doederleini*; atividade farmacológica

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL EVALUATION AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF BEE PROPOLIS *Frieseomelitta doederleini* PRODUCED IN SEMI-ARID NORTHEAST

NUNES, Francisco Vitor Aires Nunes. **Phytochemical evaluation and of the pharmacological activities of the propolis of *Frieseomelitta bee doederleini* produced in the half-barren northeastern.** 2018. 84 f. Thesis (PhD in Animal Science) - Post-Graduate Program in Animal Science, Federal Rural Semi-Arid University (UFERSA), Mossoró - RN, Brasil, 2018.

Propolis is a resinous material of coloration and consistency varied, gotten for bees through the resin collection of the flora of the region, and modified for the enzyme action contained in its saliva. The propolis produced by the bees with sting already widely had been studied in order to prove its pharmacological activities and are thus, used for diverse medicinal applications. However, related to the propolis of the bee *Frieseomelitta doederleini*, studies systemize on its pharmacological activities are scarce. This study objectified to evaluate the phytochemistry composition and the pharmacological activities of the propolis of bee *F. doederleini*; therefore, samples of bee propolis had been extracted in the city of Serra do Mel, West Region of the Rio Grande do Norte, which were evaluated pharmacological activities: antioxidant (through method DPPH-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin) 6-sulfonic acid); antibacterial through the method of diffusion in agar and microdilution to determine Minimum the Inhibitory Concentration (CIM) and Minimum Bacterial Concentration (CBM); healing, through the induction of experimental surgical wounds in Wistar rats, beyond the growth of fibroblasts in real time; cytotoxic for the method of the MTT (bromide of [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5- diphenyltetrazolium) and finally, the mutagenicity for the method of micronuclei. The phytochemistry analysis disclosed the presence of saponins, phenolic composites, flavonoids aglycones and the method of Co-CCD identified to the composites quercetin and kaferol. The propolis presented concentration of 35,55mg EAG.g⁻¹ of total phenols. It presented expressive antioxidant activity for method DPPH, with a 46,39 ppm of IC₅₀, already for method ABTS the antioxidant activity was discreet, with a IC₅₀ 440.44 ppm. The extract was considered efficient with respect to antibacterial activity, therefore ≥ 9 mm for all promoted the halos formation of inhibition with size strains when tested in agar Mueller Hinton. Minimum the Inhibitory Concentration (CIM), in the microdilution test, varied of 3,125 25mg.mL⁻¹ for the 11 microorganism tested, showing best the CIM against *aeruginosa Pseudomonas*, Gram-negative bacterium related the resistance to antimicrobials. The Minimum Bacterial Concentration (CBM) varied of 6,25 the 50 mg.mL⁻¹. The analysis of the process of healing under the clinical, macroscopic and histological points of view allowed to conclude, that the use of the cream to the base of propolis presented positive influence in the healing of experimental cutaneous wounds, for promoting less intense reaction inflammatory and faster closing of the wounds in relation to the group has controlled, as well as stimulated the biggest growth of fibroblasts. In the test of cytotoxicity by MTT it is possible to observe higher cytotoxic activity for colon carcinoma cells at concentrations of 3,12 µg.mL⁻¹, 6,25 µg.mL⁻¹ e 12,5 µg.mL⁻¹, this finishes concentration obtained to more than inhibit the cellular viability of the carcinogenic cells in 50%. How much the evaluation of the mutagenic potential the propolis induced increase in the frequency of micronucleate cells only in the biggest evaluated concentration (250 µg.mL⁻¹). Thus it was possible to conclude that the *hydroalcoholic stratum* of the propolis of the bee *Frieseomelitta doederleini* presented a chemical composition varied and promising pharmacological activities, being distinguished antirust, antioxidant, healing and anti-neoplasm.

Keywords: phytochemical composition, propolis; *Frieseomelitta doederleini*; pharmacological activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i>	27
Figura 2	Mapa da distribuição potencial da <i>Frieseomelitta doederleini</i> , para o Brasil.....	28
Figura 3	– Vila Sergipe, Serra do Mel/RN.....	35
Figura 4	– (A) Abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i> (destacadas pelo circulo); (B) e (C) Própolis coletado na colmeia.....	35
Figura 5	– Halo de inibição das concentrações de 100 e 50 mg/ml pelo metodo de poços em ágar Muller Hilton; (A) <i>Salmonella typhimurium</i> ; (B) <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; (C) <i>Escherichia coli</i> ; (D) <i>Streptococcus mutans</i>	39
Figura 6	– Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em placas de 96 cavidades. (A) e (B) Representas as placas em pré-incubação na estufa; (C) e (D) demonstram os resultados após a adição da resazurina.....	41
Figura 7	– Fluxograma do delineamento do teste de cicatrização.....	44
Figura 8	– Cromatografia em Camada Delgada do extrato hidroetanólico de própolis após revelação com diferentes reagentes.....	50
Figura 9	– Co-CCDs com o extrato hidroetanólico de própolis e os padrões luteolina, quercetina e canferol.....	52
Figura 10	– Aspecto macroscópico das feridas cirúrgicas cutâneas pós-cirurgico em <i>Rattus norvegicus</i> , linhagem Wistar ; Grupo Experimental (GE) no 3º dia(A); Grupo Controle no 3º dia (D); grupo experimental no 7º dia (B); grupo controle no 7º dia (E); grupo experimental no 14º dia (C); grupo controle no 14º dia (F)	59
Figura 11	– Aspecto histológico das feridas cutâneas, (A) ao 3º dia de evolução pós-cirúrgica do grupo experimental nota-se discreto infiltrado de células polimorfonucleares; e no grupo controle (B) células polimorfonucleares. Obj. 20x.....	60
Figura 12	– Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 7º dia de evolução pós-cirúrgica, (A) no grupo experimental e (B) no grupo controle, nota-se presença de tecido de granulação com vasos sanguíneos e celulas mononucleares.Ob. 10x. (C) fibroblastos em GE e em GC. Obj. 20x.....	61
Figura 13	– Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 14º dia de evolução pós-cirúrgica, (A) fibras colágenas em GE e GC (B). Obj. 20x.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Gráfico do valor médio \pm desvio padrão das áreas das feridas nos animais do Grupo Experimental e do Grupo Controle.....	62
Gráfico 2	– Avaliação do crescimento de fibroblastos (linhagem L929) em tempo real pelo sistema XCELLigance.....	64
Gráfico 3	– Avaliação da viabilidade celular do extrato da própolis da abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i> pelo Método de MTT sobre fibroblastos murinos (Linhagem L929) e sobre células de carcinoma de cólon humano (linhagem SW620)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Testes fitoquímicos qualitativos preliminares.....	49
Tabela 2	–	Atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, e determinação da concentração de fenóis totais.....	52
Tabela 3	–	Atividade antimicrobiana da própolis da abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i> sobre cepas de microrganismos patogênicos, pelo método de pelo método de poços em ágar (expresso em média e desvio padrão).....	56
Tabela 4	–	Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bacteriana Mínima (CBM) da própolis da abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i> sobre cepas de microrganismos patogênicos.....	57
Tabela 5	–	Avaliação da Citotoxicidade do Extrato da Própolis da abelha amarela pelo Método de MTT sobre fibroblastos murinos (Linhagem L929) e sobre células de carcinoma de cólon humano (linhagem SW620) (Valores de média \pm desvio padrão)	65
Tabela 6	–	Valor da IC50 nas duas linhagens celulares (L929 e SW620) em relação ao tempo.	67
Tabela 7	–	Análise do percentual da viabilidade celular em fibroblastos murinos L929 após exposição à amostra da própolis da abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i>	69
Tabela 8	–	Análise da frequência de fibroblastos murinos L-929 micronucleados após exposição à amostra da própolis da abelha <i>Frieseomelitta doederleini</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
AMH	Mueller Hinton
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butil-hidroxitolueno
°C	Grau Celsius
CBM	Concentração bactericida mínima
CBPI	Índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (<i>Cytokinesis-Block Proliferation Index</i>)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDK	Cyclin-dependent kinases
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHO-K1	Células de ovário de hamster Chinês
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
⁶⁰ Co	Cobalto 60
COX	Ciclooxigenase
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dr.	Doutor
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DMEM	Meio Dulbecco MEM
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EEP	Etrato etanolico de própolis
Es	Etrato seco
Esp.	Especialista
EtOAc	Acetato de etila
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimental

h	Horas
HE	Hematoxilina-eosina
Hek-293	Células normais do epitélio de rins embrionário
HeLa	Adenocarcinoma cervical
Hep-2	Células humanas de carcinoma epidermóide da laringe
HIF	Hypoxia-inducible factors
HTC	Células de hepatoma de rato
HT-1080	Células humanas de fibrosarcoma
IC	Concentração inibitória
IES	Instituição de Ensino Superior
Me	Mestre
MeOH	Metanol
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mm	Milímetros
MMC	Concentração microbicida mínima
ml	Mililitro
MMS	Metilmetano Sulfonato
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanometros
PANC-1	Células humanas de câncer pancreático
PC3	Células tumorais de próstata
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rf	Fator de Retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UI	Unidade de Informação
U.V.	Ultra Violeta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
26-L5	Células de carcinoma de colo murino

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
2.	OBJETIVOS.....	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVO ESPECIFICO	24
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	PRÓPOLIS.....	25
3.2	ABELHA <i>Frieseomelitta doederleini</i>	26
3.3	ATIVIDADES FARMACOLÓGICA	29
3.3.1	Atividade antioxidante.....	29
3.3.2	Atividade antibacteriana.....	30
3.3.3	Atividade cicatrizante.....	32
3.3.4	Atividade Citotóxica.....	33
3.3.5	Potencial Mutagênico.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	COLETA DA PRÓPOLIS.....	34
4.2	IDENTIFICAÇÃO FITOQUÍMICA	36
4.2.1	Análise Fitoquímica preliminar	36
4.2.2	Análise Por Cromatografia Em Camada Delgada (CCD)	36
4.2.3	Determinação de Fenóis Totais.....	37
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	37
4.3.1	Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	37
4.3.2	Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	38
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.4.1	Avaliação da atividade antibacteriana preliminar	39
4.4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
4.4.3	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	41
4.5	ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	42
4.5.1	Formulação do creme	42
4.5.2	Animais Utilizados e grupos experimentais	42
4.5.3	Protocolo anestésico, confecção das feridas e aplicação tópica do creme..	43
4.5.4	Avaliação macroscópica e morfométrica das lesões.....	43
4.5.5	Biopsia das feridas e avaliação histológica	43
4.6	MONITORAMENTO DINÂMICO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL – XCELLIGENCE SYSTEM.....	45
4.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	46
4.8	ATIVIDADE MUTAGÊNICA.....	47
4.9	ANALISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1	ANALISE FITOQUÍMICA.....	49
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓIS TOTAIS.....	52
5.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	54
5.4	ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	58
5.5	MONITORAMENTO DINÂMICO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL – XCELLIGENCE SYSTEM.....	63
5.6	ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	65
5.7	POTENCIAL MUTAGÊNICO.....	68

6	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
	ANEXO.....	85

1. INTRODUÇÃO

Mesmo com o desenvolvimento dos processos sintéticos para obtenção de novas moléculas a partir do final do século XIX, os produtos naturais sempre exerceram papel importante na pesquisa de novos compostos farmacologicamente ativos. Este fato se deve a grande complexidade estrutural de alguns de seus princípios ativos. Muitos fármacos clinicamente viáveis e comercialmente disponíveis com atividade antitumoral e anti-infecciosa, por exemplo, têm sua origem em produtos naturais (SHU, 1998).

No Brasil, a biodiversidade é vasta, sendo considerada uma das maiores do planeta (BRASIL, 1998). Nesse contexto, destaca-se a Caatinga, que é um bioma exclusivo do território brasileiro, principalmente da região Nordeste (Figura 1). A busca, na biodiversidade, inclusive na Caatinga, por recursos que contenham compostos bioativos com potencial atividade terapêutica tem sido alvo de estudos há bastante tempo. Apesar dessas investigações focarem especialmente em espécies vegetais, outros produtos naturais, como a própolis, têm sido alvo de interesse (BASTOS et al., 2011).

A própolis é utilizada por diferentes civilizações desde a antiguidade na medicina popular e mais recentemente, no comércio, vários produtos contendo própolis são vendidos, incluindo sabonetes e cremes dentais (SALATINO et al., 2011). Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, em brotos, flores e exsudatos de plantas, os quais são alterados por secreções salivares destes insetos e acrescentados de cera e pólen para elaboração do produto final (BRASIL, 2001). A composição química é mais diversa nas própolis obtidas de regiões tropicais, que nas de climas temperados, refletindo a variedade vegetal desses locais (FABRIS et al., 2013). Concernente à própolis, múltiplas atividades farmacológicas foram comprovadas: antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, cicatrizante, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, entre outras (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011; SFORCIN; BANKOVA, 2011; CARDINAULT, CAYEUX; SERT, 2012). A natureza dos compostos encontrados na própolis, tem importância biológica, variando de acordo com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas (SAWAYA, CUNHA; MARCUCCI, 2011).

Em se tratando de abelhas, vale salientar que as abelhas das espécies pertencentes à tribo Meliponini, conhecidas como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas, abelhas nativas, ou ainda, “meliponíneos” são muito populares em diversos países tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil (SOUZA et al., 2009). Atualmente muitas espécies de abelhas sem ferrão tem sido criadas com diversas finalidades. Dentre elas, destaca-se como principal, a criação

para produção de mel. No sertão nordestino pode-se encontrar a espécie *Frieseomelitta doederleini*, também conhecida como moça branca ou abelha branca.

A própolis é amplamente utilizada para tratamento de diferentes doenças (SOUZA et al., 2009), com algumas atividades biológicas já comprovadas (LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012; CUNHA et al., 2013). Entretanto, em relação à própolis da *Frieseomelitta doederleini*, estudos sistematizados sobre suas atividades farmacológicas são escassos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição fitoquímica e as atividades farmacológicas da própolis da abelha sem ferrão *Frieseomelitta doederleini* produzida no semi-árido nordestino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação fotoquímica do extrato hidroalcoólico da própolis através dos métodos preliminares de Matos (2009) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD);

- Determinar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* a partir do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico);

- Analisar o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* contra fungo e contra diferentes bactérias gram-negativas e gram-positivas através do método de difusão em ágar Mueller Hinton, e determinar a Concentração Inibitoria Mínima e da Concentração Bacteriana Mínima através do teste de microdiluição;

- Investigar a atividade cicatrizante do creme da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini*;

- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* pelo método do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio];

- Avaliar o potencial mutagênico do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* a parti do ensaio de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico (CBMN).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRÓPOLIS

A palavra própolis é derivada do grego e significa em defesa da comunidade (*pro*, em defesa, e *polis*-, cidade ou comunidade) (MIGUEL; ANTUNES, 2011). A própolis é produzida pelas abelhas a partir da coleta de ceras e substâncias derivadas de plantas (como resinas e compostos voláteis). As abelhas têm a própolis como a sua "arma química" mais importante, utilizando-a contra micro-organismos patogênicos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colmeia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (BANKOVA, 2005).

A origem botânica da propólis está diretamente relacionada à sua composição química, mas fatores como sazonalidade, variabilidade genética da abelha que a produz e reações geradas, através das secreções hipofaringianas da abelha (hidrólise de glicosídeos flavonóides em agliconas), podem levar a transformações em sua composição (CARDINAULT; CAYEUX; SERT, 2012; NUNES; GUERREIRO, 2012). Tipicamente, a própolis é formada por cerca de 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e 5% de pólen (ASHRY; AHMAD, 2012). Sua cor varia do marrom escuro à verde, amarelo e vermelho. Entre seus compostos, se encontram, em sua maior parte, flavonóides e outros ésteres fenólicos e seus derivados, compostos aromáticos, minerais (ferro, cálcio, zinco, cobre, manganês) e vitaminas (C, E, e do grupo B) (CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012).

Durante as últimas décadas, muitas dessas atividades biológicas foram reportadas e confirmadas cientificamente: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetor, antitumoral, cicatrizante no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras, dentre outros (SAWAYA, CUNHA; MARCUCCI, 2011; SFORCIN; BANKOVA, 2011; CARDINAULT, CAYEUX; SERT, 2012; FABRIS et al., 2013). Entretanto, são escassas revisões críticas sobre o uso de produtos à base de própolis no contexto clínico (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Além das dificuldades acerca da existência de estudos clínicos com própolis e, embora uma considerável quantidade de estudos sobre própolis tenham sido publicados, a maioria deles refere-se à própolis produzida pela abelha africanizada *Apis mellifera*, originária da África.

Em relação à própolis das abelhas Meliponini, há escassez de estudos sistematizados e, destes poucos, alguns trabalhos já indicam bons resultados quanto às suas propriedades imunomoduladora e antimicrobiana (LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012; CUNHA et al., 2013).

A composição química das própolis utilizadas em estudos de atividades biológicas, pode ajudar na compreensão da correlação entre os tipos específicos de própolis e suas atividades biológicas (FUNARI, FERRO; MATHOR, 2007).

Visando compreender a bioatividade da própolis, se faz necessário caracterizar quimicamente os extratos a serem testados nos estudos de atividade biológica (SFORCIN; BANKOVA, 2011), pois as propriedades farmacológicas da própolis estão diretamente relacionados à sua composição química, que por sua vez depende da flora local e sazonalidade (SILVA et al., 2006).

A própolis contém compostos fenólicos e terpenóides, mas não apresenta compostos nitrogenados, tais como alcalóides, glucosinolatos e compostos cianogênicos. Usualmente, esses compostos não são encontrados nas superfícies das plantas (locais onde as abelhas coletam as resinas e exsudatos), com exceção dos alcalóides cafeína e teobromina, que são encontrados na cera foliar de *Ilex paraguariensis* (SALATINO et al., 2011).

3.2 ABELHA *Frieseomelitta doederleini*

O Brasil é rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão”, ou ainda, “meliponíneos”. As abelhas indígenas da tribo Meliponini, composta por 619 espécies, são caracterizadas, portanto, pela ausência de ferrão associado ao ovipositor. Na Caatinga, cerca de 18 espécies da tribo Meliponini já tiveram sua ocorrência registrada (ZANELLA, 1999), dentre elas as abelhas do gênero *Frieseomelitta* (figura 1). Este é um gênero de abelhas nativas sem ferrão (Apinae, Meliponini) do novo mundo com larga distribuição geográfica ocorrendo do sudoeste do México (Sinaloa) ao sudeste do Brasil (São Paulo) podendo ser encontrada nas florestas, Cerrado, Caatinga e regiões montanhosas, alcançando altitudes de até 1600 m (Iguala, Guerrero, México) (OLIVEIRA, 2003). Uma característica peculiar desse gênero e a disposição dos favos de cria, que são dispostos em forma de cacho e célula real visível, e não apresentam o involucrio que normalmente é encontrado abrigando as crias na maioria dos Meliponini (NUNES, 2012).

É um grupo que tem importância econômica e cultural, sendo polinizador de diversas plantas nativas (serviço ambiental), além de produzir mel, cera e própolis que podem ser comercializados; faz parte da tradição de criação de animais silvestres de comunidades indígenas, remanescentes de quilombos, além de outros povos tradicionais e de agricultores de economia familiar. O mel destas abelhas sem ferrão é usado na medicina tradicional e na alimentação de alguns povos indígenas, sendo a cera comumente usada para artesanato e outros fins (SAMPAIO et al., 2009).



Figura 1 – Abelha *Frieseomelitta doederleini*

Fonte: <http://www.ame-rio.org/2010/11/diferenca-entre-moca-branca.html>

A criação de abelhas nativas é de fácil manejo e contribui para a conservação das abelhas e de seus habitats, sendo considerada sustentável, pois inclui a restauração ambiental através da preservação e plantio de árvores que servem de locais de nidificação, além da atuação das abelhas na polinização da flora nativa (ZANELLA; MARTINS, 2003). Além da sua importância para a polinização, as abelhas produzem cera, mel, própolis ou geoprópolis, possuindo alguns desses produtos propriedades terapêuticas (BRUENING, 1990). Desse modo, o interesse econômico gira em torno do mel que é apreciado pela população local pela ótima qualidade (sabor, cheiro, cor, valor nutricional e terapêutico) e dos enxames, que são vendidos no tronco ou em cortiços (CÂMARA et al., 2004). Por isso, a demanda do mel das abelhas sem ferrão vem aumentando no mercado, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diversas regiões do Brasil (SOUZA et al., 2004).

Os meliponíneos são totalmente dependentes dos recursos florais para sua alimentação, sendo os principais polinizadores das espécies de plantas nativas (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996); representando, dessa forma, os organismos de maior importância na manutenção da diversidade florística brasileira (SILVA; PAZ, 2012).

Com a degradação dos ambientes naturais causada pelo homem, muitas populações de abelhas foram afetadas, sendo que das 300 espécies de abelhas sem ferrão descritas no Brasil, aproximadamente 100 estão em perigo de extinção (KERR, 1997). O desmatamento, as queimadas, o uso de insumos químicos, a introdução de espécies vegetais exóticas e as mudanças climáticas são os principais fatores responsabilizados pela redução de comunidades de polinizadores, principalmente de abelhas nativas (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006). Atividades antrópicas e o corte de madeira que levam à destruição de árvores usadas na nidificação de abelhas nativas; associado à redução da oferta de alimentos são apontadas como importantes causas do declínio das populações de abelhas sem ferrão (ASF) em vários habitats perturbados, inclusive naqueles fragmentados. Em algumas regiões do Nordeste Brasileiro, principalmente na Caatinga, os meleiros têm destruído sistematicamente várias árvores no processo de coleta de mel para comer ou vender (CASTRO, 2005).

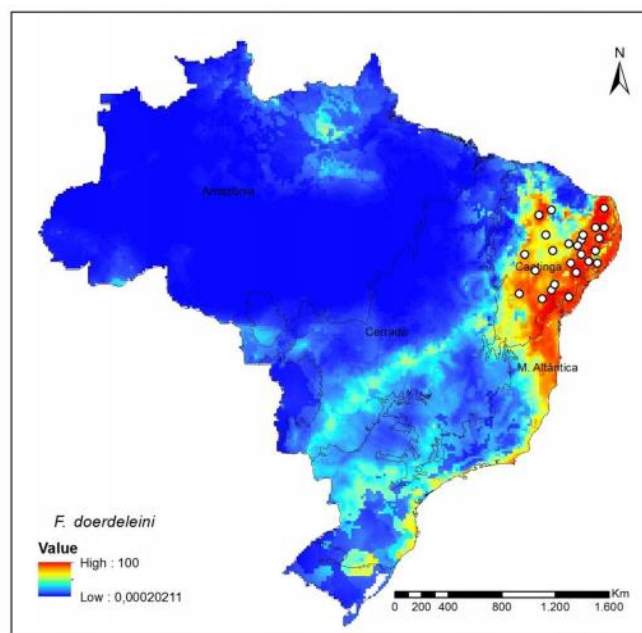


Figura 2: Mapa da distribuição potencial da *Frieseomelitta doederleini*, para o Brasil.
Fonte: Nunes (2012)

No Brasil, antes da introdução da *Apis mellifera* as abelhas criadas eram exclusivamente as abelhas nativas sem ferrão. A criação em cortiços (trancos de madeira), cabaças, potes de barro e caixas de madeira era uma atividade tradicional em muitas comunidades indígenas e não indígenas. No entanto, o interesse por essa prática foi

diminuindo gradativamente, em muitas áreas, onde a destruição dos habitats é bastante intensa (CASTRO, 2005).

As abelhas do gênero *Frieseomelitta* são abelhas eussociais, geralmente pequenas e delgadas, com o aparelho coletor de pólen em forma de corbícula, localizado no terceiro par de pernas como na maioria dos Meliponini. São conhecidas popularmente como abelha branca, moça branca, asa branca, marmelada, mocinha preta, rendeira, mané de Abreu, etc. Aparentemente, não se adaptam ao ambiente antrópico. São abelhas moderadamente agressivas, que nidificam em árvores vivas ou mortas (secas), mourões de cercas, etc (OLIVEIRA, 2003; OLIVEIRA et al., 2011b).

A espécie *Frieseomelitta doederleini*, também conhecida como moça branca ou abelha branca, é uma abelha de ocorrência na região Neotropical e no Brasil, sendo encontrada em quase toda a região Nordeste, nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí e Rio Grande do Norte (OLIVEIRA, 2003); no entanto, são poucas as informações na literatura sobre a espécie. Dentre as espécies do gênero *F. doederleini* caracteriza-se por ocupar áreas nos biomas da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (NUNES, 2012).

3.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

3.3.1 Atividade antioxidante

Na avaliação da atividade antioxidante de extratos de própolis, o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) e o método de inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico têm sido amplamente empregados. Já para formulações farmacêuticas tópicas, os ensaios de inibição da peroxidação lipídica e sistema xantina/xantina oxidase/luminol mostraram-se mais adequados (MARQUELE et al., 2005).

No trabalho de Alves; Kubota (2013) foi encontrada uma alta atividade antioxidante dos extratos puros (ou diluídos) analisada de seis amostras comerciais obtidas em farmácias e lojas de produtos naturais. Esta alta atividade pode ser explicada pelo teor dos flavonoides e fenólicos totais, confirmando a relação desses compostos na ação preventiva contra radicais livres. As seis amostras comerciais analisadas possuíram de fenólicos 70,60 mg a 539,10 mg (expresso em mg de ácido gálico/g de extrato de própolis) e de flavonoides 48,95 mg a 114,50 mg (expresso em mg de quercetina/g de extrato de própolis). A atividade

antioxidante maior foi do extrato aquoso, tanto pela inibição do radical DPPH quanto pela atividade quelante.

Ao analisar a preparação de extratos de própolis utilizando água e diferentes concentrações de etanol como solventes, Park et al. (1998) observou que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, no entanto, os extratos de própolis a 70 e 80% de etanol apresentaram a maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos etanólicos nas concentrações de 90, 60, 50 e 40%, respectivamente. Os extratos que apresentaram menor atividade antioxidante foram o extrato etanólico a 20% e o extrato aquoso.

Wang, Lien; Yu (2004), estudando própolis verde demonstraram atividade antioxidante concentração-dependente de frações de um extrato etanólico da própolis brasileira, fracionadas por fluido supercrítico, através da capacidade sequestradora dos radicais DPPH, superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH). Em outro estudo, Sheng et al. (2007) ao compararem o potencial antioxidante de um extrato etanólico com um extrato éter de petróleo, ambos de própolis brasileira, mostrou que o primeiro exibiu maior atividade tanto através do método DPPH, como através do método tiocianato férrico.

A própolis vermelha também possui efeito antioxidante relevante. Um estudo comparou o potencial antioxidante de frações obtidas de um extrato hidroalcolólico da própolis vermelha, através dos métodos de sequestro de radical DPPH e inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico. No primeiro método, a fração hexânica apresentou maior atividade antioxidante (74,4%), enquanto que no segundo método, a fração clorofórmica apresentou maior atividade (64,84%). O estudo concluiu que existe uma maior correlação entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante pela oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico ($R^2=0,86$) (CABRAL et al., 2009).

3.3.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana da própolis é uma de suas propriedades farmacológicas mais bem elucidada. Sabe-se que, de um modo geral, as bactérias gram-positivas são mais sensíveis do que as gram-negativas aos extratos de própolis (GONSALES et al., 2006; JÚNIOR et al., 2006; CARDINAULT; CAYEUX; SERT, 2012). O mecanismo da atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído a inibição do crescimento bacteriano por bloqueio da divisão celular, desorganização do citoplasma por inibição da

síntese de proteína, ou ainda, pela inibição do processo adesão (SCAZZOCCHIO et al., 2006).

Júnior et al. (2006) procuraram avaliar as propriedades antimicrobianas da própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil (Botucatu-SP, Mossoró-RN e Urubici-SC). Foi investigada sobre linhagens isoladas de infecções clínicas humanas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). Foram preparados extratos alcoólicos de própolis (EAP) e determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguida do cálculo da CIM 90%. A própolis de Botucatu foi a mais eficiente sobre *S. aureus* (0,3% v/v), *Enterococcus sp* (1,1% v/v) e *C. albicans* (2,1% v/v). Para *E. coli*, a própolis eficiente foi de Urubici (7,0% v/v) e para *P. aeruginosa* a de Mossoró (5,3% v/v). Os resultados mostram maior sensibilidade das bactérias Gram positivas e levedura em relação às Gram negativas. Esta diferença nas atividades antimicrobianas das amostras de própolis testadas pode ser explicado devido a diferença na composição química da própolis em função do seu local de produção.

Ao analisar a preparação de extratos de própolis utilizando água e diferentes concentrações de etanol como solventes, os quais foram analisados quanto ao seu espectro de absorção por espectrofotometria na região ultravioleta ("U.V. scanning"). O pico de absorção máxima de todos os extratos foi a 290 nm sendo o extrato etanólico a 80% o que apresentou maior absorção. A maioria dos flavonóides foram extraídos nas concentrações alcóolica entre 60 a 80%. Park et al., (1998) Observou que o extrato aquoso e os extratos etanólicos de própolis a 10% e 20% não apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto os extratos etanólicos de 30% a 50% apresentaram pequena atividade. Já os extratos etanólicos de própolis de 60% a 80%, garantiram grande inibição do crescimento microbiano e diminuição na atividade antimicrobiana em porcentagens mais altas de etanol. Dessa forma, pode-se afirmar que a concentração de etanol utilizada no preparo de extratos de própolis, bem como o modo como estes são realizados, tende a influenciar na concentração de flavonóides e, conseqüentemente, na atividade antimicrobiana apresentada pela própolis.

Em relação à própolis vermelha, a atividade antimicrobiana do extrato total e frações foi investigada. No estudo de Dausch et al. (2008), alguns extratos etanólicos foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva. Ainda em relação à própolis vermelha, um extrato metanólico apresentou atividade antimicrobiana em bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*) e gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e

Escherichia coli) e contra fungos unicelulares *Candida albicans*. Nas condições experimentais testadas, a maior concentração microbicida mínima (MMC) encontrada foi para *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando maior resistência de bactérias gram-negativas, como já reportado (RIGHI et al., 2011).

3.3.3 Atividade cicatrizante

A própolis é amplamente usada como cicatrizante e agente regenerador de tecidos. Na dermatologia é empregada no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras. Vários estudos *in vitro*, *in vivo* e alguns estudos clínicos foram realizados com o intuito de demonstrar tal atividade. Apesar de diferentes modelos experimentais terem sido relatados nesta revisão de literatura, grande parte dos estudos mostra diminuição do recrutamento de células inflamatória após tratamento com própolis.

Na pesquisa de Santos et al. (2007), a qual se utilizou pomada de própolis em 22 feridas crônicas, sendo 11 úlceras venosas, sete úlceras por pressão, duas úlceras diabéticas e duas feridas pós-trauma, durante o processo de avaliação do tecido, em 14 (8,2%) registrou-se a presença de tecido necrótico. Entretanto verificou-se ausência de tecido necrótico após a intervenção terapêutica. Quanto ao odor avaliado nas evoluções realizadas, 78,8% apresentavam *sui generis*, havendo ausência do mesmo em 53,3% dos casos após a terapêutica. Em relação ao tempo de cicatrização, observou-se que o tempo médio foi de 13,1 semanas. Ao considerar-se um seguimento de 20 semanas, 74,1% das úlceras cicatrizaram antes desse período. E quanto à dor sentida pelos portadores das feridas crônicas, todos referiram melhora, embora não tenha avaliado sua intensidade neste estudo.

Em outro trabalho, realizado por Peruchi et al. (2001) foi feita a análise histológica da ação da solução de extrato alcoólico de própolis a 10% e a 30% em feridas induzidas nas costas de ratos, onde o tecido conjuntivo foi exposto. Os resultados mostraram que a própolis não provoca resposta inflamatória no tecido conjuntivo, promovendo nova formação vascular e fibroblástica, induzindo a regeneração do tecido epitelial, apesar dos resultados encontrados nas lesões tratadas com solução a 30% foram um pouco mais lentos. Assim, a própolis pode ser indicada para o tratamento e reparação por segunda intenção de feridas na pele do tecido subcutâneo.

Santos et al. (2007) avaliaram a eficácia do tratamento com pomada de própolis em pacientes portadores de feridas crônicas (úlceras vasculares, diabéticas e por pressão). As

feridas tiveram tempo médio de cicatrização de 13,10 semanas e apresentaram sinais de inflamação brandos, indicando que o tratamento com a pomada de própolis agiu estimulando a cicatrização. Também utilizando uma pomada de própolis, um estudo observou que sob essa forma farmacêutica, a própolis influenciou o processo de cicatrização através do estímulo na proliferação de queratinócitos, além de ter sido capaz de reduzir de forma significativa as áreas das feridas. Através da técnica de espectroscopia fotoacústica foi possível observar que a taxa de penetração da formulação variou de acordo com o estágio da cicatrização (SEHN et al., 2009).

3.3.4 Atividade Citotóxica

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos e animais, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo. Awale et al. (2008) avaliaram a atividade citotóxica do extrato metanólico de própolis vermelha e alguns de seus compostos isolados revelando que, tanto o extrato total quanto um pterocarpano ((6aR,11aR)-3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpano), mostraram alta citotoxicidade contra células humanas de câncer pancreático (PANC-1). O mecanismo de morte está associado a um processo tempo-dependente por via não-apoptótica, que não conduz a fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA), mas a alterações morfológicas do tipo necrótica. Outro extrato de própolis vermelha (hidroalcolico), apresentou atividade citotóxica em células humanas de carcinoma epidermóide da laringe (Hep-2), adenocarcinoma cervical (HeLa) e células normais do epitélio de rins embrionário (Hek-293) (FROZZA et al., 2013).

Em estudos realizados com extratos metanólicos de própolis verde e marrom, foi demonstrada alta capacidade citotóxica destas própolis contra células de carcinoma de colo murino (26-L5) e células humanas de fibrosarcoma (HT-1080), quando comparados aos seus respectivos extratos aquosos (BANSKOTA et al., 2000).

Estudos comparativos também foram realizados. Em um deles, Moraes et al. (2010) comparou *in vitro* o potencial antiproliferativo de extratos etanólicos de dois tipos de própolis, frente às células derivadas de câncer de próstata primário. Os autores observaram que a própolis vermelha apresentou alto potencial citotóxico, em comparação a outro tipo de

própolis obtido na região sudeste. Estes resultados estão de acordo com os achados de Franchi et al. (2012), que também compararam o comportamento da própolis verde e vermelha frente ao crescimento de células tumorais de leucemia, e concluíram que a própolis vermelha é mais citotóxica que a própolis verde.

3.3.5 Potencial Mutagênico

Um extrato etanólico de própolis verde apresentou genotoxicidade *in vivo*, através do ensaio do cometa e teste do micronúcleo (PEREIRA et al., 2008). Utilizando parâmetros semelhantes, Liberio et al. (2011) avaliaram o potencial genotóxico da artepilina C (3,5-diprenil-ácido-p-cumárico), o composto encontrado em maior quantidade na própolis verde. Esse composto não se mostrou genotóxico no ensaio do cometa e no teste do micronúcleo. Nos animais tratados concomitantemente com artepilina C e doxorrubicina, o número de reticulócitos micronucleados foi significativamente menor em comparação ao grupo que recebeu apenas a doxorrubicina – o agente genotóxico. Em relação ao potencial antigenotóxico, a artepilina C nas doses testadas, diminuiu a extensão de danos no DNA de forma relevante, induzido por metanosulfonato de metila em células de fígado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DA PRÓPOLIS

No período de julho de 2014 a setembro de 2015, foram coletadas 3 amostras de própolis (figura 4B e 4C) produzidas por abelhas da espécie *Frieseomelitta doederleini*, junto a um único meliponicultor na zona rural de Serra do Mel, Rio Grande do Norte, Brasil (figura 3). As amostras foram obtidas assepticamente, colocadas em sacos plásticos estéreis, e conduzidas ao laboratório, onde foram mantidas em congelador (-20 °C) até a produção dos extratos. As abelhas foram identificadas pelo taxonomista Dr. Airton Carvalho como pertencente a espécie *Frieseomelitta doederleini* (Friese, 1900) (figura 4A).

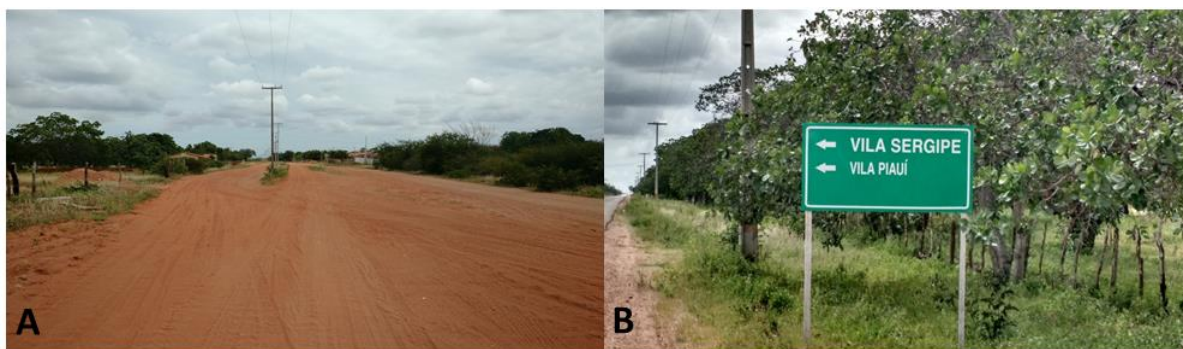


Figura 3 – Vila Sergipe, Serra do Mel/RN
Fonte: Autor

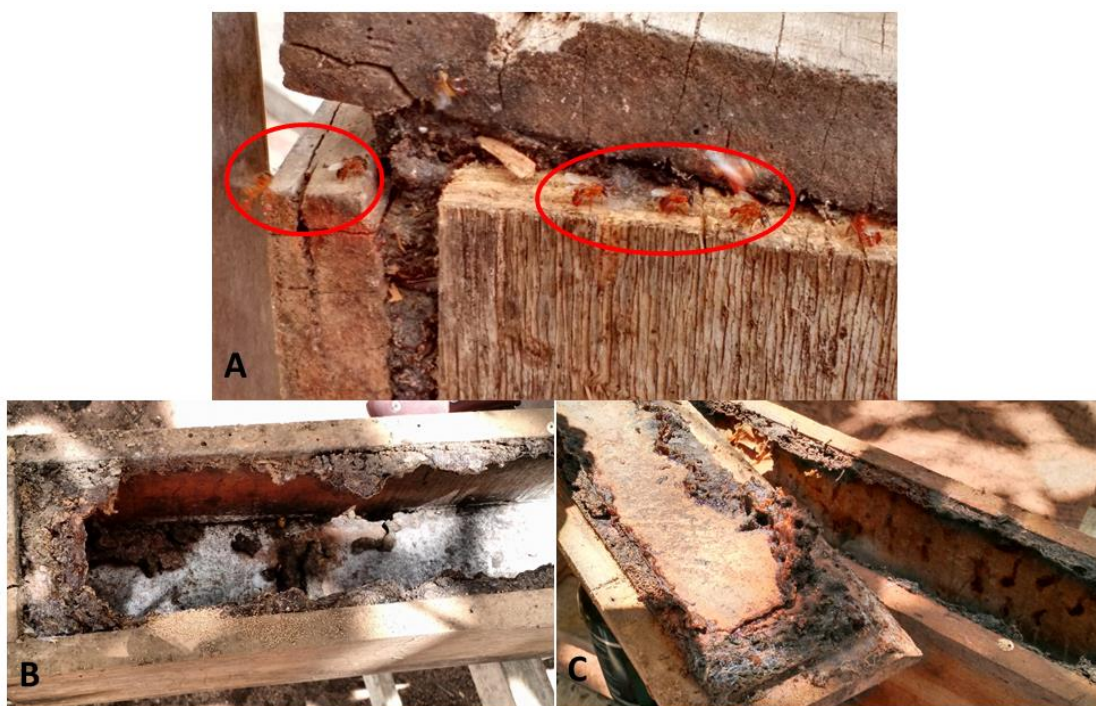


Figura 4 – (A) Abelha *Frieseomelitta doederleini* (destacadas pelo círculo); (B) e (C) Própolis.
Fonte: Autor

Para confecção do extrato foram retiradas as sujidades aparentes e 350 gramas da própolis foi submetida à secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C por 48 horas, triturada em multiprocessador Britânia por cinco minutos, obtendo-se um pó fino e homogêneo. Esse material foi pesado e depositado em recipiente de vidro âmbar com adição de solução hidroalcolica a 70% na proporção de 1:10 do pó. A mistura foi mantida em maceração durante 7 dias sob agitação frequente. Posteriormente realizou-se processo de filtragem do

sobrenadante em papel filtro, para retenção de partículas insolúveis; o material retido no papel filtro foi remacerado para garantir a extração total dos princípios ativos contidos na própolis. Nas etapas seguintes a amostra foi concentrada por meio de um evaporador rotativo (Buchi®) sob pressão reduzida, e controle de vácuo a 40 °C, e posteriormente liofillizado (liofilizador Terroni LS 3000®) até retirar toda água da amostra.

4.2 IDENTIFICAÇÃO FITOQUÍMICA

4.2.1 Análise Fitoquímica preliminar

A metodologia utilizada para a realização dos testes fitoquímicos preliminares do extrato etanólico foi descrita no trabalho de Matos (2009) onde se observava a presença de flavonóides, taninos, saponinas, fenóis, esteroides, entre outros, de forma qualitativa através de variações de coloração em reações específicas.

4.2.2 Análise Por Cromatografia Em Camada Delgada (CCD)

A análise por CCD foi realizada usando como adsorvente cromatoplas de alumínio com gel de sílica 60 F₂₅₄, e, para a Co-CCD, cromatoplas de vidro com gel de sílica 60 F₂₅₄. Como fase móvel foi escolhido um sistema específico de acordo com os metabólitos secundários de interesse. Foram realizados diversos testes com composições e proporções diferentes de solvente, e o ideal para análise escolhido foi a composição ternária de Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:5:0,5, v/v/v).

As placas foram reveladas utilizando quatro tipo de reveladores: Vanilina Sulfúrica, como revelador universal; Cloreto Férrico para a detecção de compostos fenólicos; Reagente Natural A 0,5 % (difetilboriloxietilamina), específico para flavonóides, e observação sob luz ultravioleta em 365 nm; e Reagente de Drangendorf, para pesquisa de alcalóides.

Após investigação do perfil químico e de acordo com os resultados obtidos, o extrato de própolis foi comparado frente a amostras autênticas dos flavonoides luteolin, quercetina e canferol (Sigma-Aldrich®). Os padrões sugeridos após essa análise foram submetidos a co-CCD com o extrato, visando comprovar a presença de padrões na amostra, através de sobreposição das bandas cromatográficas.

4.2.3 Determinação de Fenóis Totais

A determinação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Cicalteau (BONOLI et al., 2004). O extrato da própolis foi dissolvido em metanol, transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final completado com metanol. 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. A solução terá seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância da amostra foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância da amostra contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Mensor et al., (2001). O extrato foi diluído em metanol em diferentes concentrações (100, 50, 40, 20, 5 e 2 ppm). 1,0 mL de cada concentração foi posta em tubos de ensaio juntamente com 1,0 mL de uma solução metanólica de DPPH 60µmol.L⁻¹. Decorridos 30 minutos foi medida a absorbância das amostras em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 520 nm tendo como branco somente o metanol.

A porcentagem de inibição referente a cada extrato foi obtida a partir da relação da absorbância do mesmo com a absorbância de uma solução contendo 1,0 mL de metanol e 1,0 mL da solução de DPPH sem o extrato utilizando a equação. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmo foram analisados em Software Oringin 7.0 com a finalidade de se obter um gráfico

que apresentasse valores pelos quais seria calculada a concentração inibitória de 50 % do radical DPPH (IC₅₀)

4.3.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

As soluções de reserva incluíram solução de ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico] 7mM e solução de persulfato de potássio 140mM. O radical ABTS foi então preparado misturando as duas soluções armazenadas e deixando-as por 12-16h à temperatura ambiente no escuro. A partir do extrato liofilizado, preparou-se em tubos de ensaio, cinco diluições diferentes (100, 50, 20, 5 e 2ppm), em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu uma alíquota de 30µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0mL do radical ABTS. Realizou-se a leitura (734nm) após 6 min da mistura e utilizou o álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorbâncias foi confeccionado a equação da reta e o cálculo do IC₅₀.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As cepas bacterianas utilizadas foram provenientes de coleções padronizadas *American Type Cell Culture* (ATCC), devidamente caracterizadas morfológicamente, fisiologicamente e bioquimicamente, sendo os ensaios realizados com bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Shigella flexneri* ATCC 12022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e contra o fungo *Candida albicans* ATCC 10231. Inicialmente todas as cepas foram reativadas em caldo Brain Heart Infusion –BHI por 24h para obter turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala *Mac Farland* o que corresponde a uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2015). Posteriormente foi realizado um *screening* de antibióticos, em triplicata, através da técnica de difusão em ágar, para verificar qual deles possui maior potencial contra os microorganismos testados, definindo os antibióticos Levofloxacina (10µg) e ceftriaxona (10µg) como controle positivo da inibição do crescimento bacteriano e, como controle negativo, 40µL de água destilada.

4.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana preliminar

Para análise preliminar do potencial antimicrobiano do extrato liofilizado, foi utilizada a técnica do poço segundo Grove; Randall (1955), com modificações. As placas contendo ágar Muller Hilton foram perfuradas de 6 mm de diâmetro com auxílio de ponteira estéril e semeadas com um swab estéril, os inóculos bacterianos com turvação 0.5 da escala de MacFarland, sendo distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, pelo método de Kirby-Bauer. Nos poços perfurados em cada placa, devidamente identificado, foram adicionados 40µL do extrato da própolis nas seguintes concentrações: 100 e 50 mg.mL⁻¹, além do controle positivo contendo o antibiótico, Levofloxacina (10µg) e ceftriaxona (10µg). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24h. Mediu-se em milímetros o halo de inibição do crescimento, utilizando paquímetro com auxílio de lupa. O estudo para todas as bactérias foi desenvolvido em triplicatas.

A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos, em mm, formados ao redor dos discos contendo os extratos. Foi considerado como resultado final de cada extrato a média das três medidas dos halos e, como positivo, o extrato que apresentou halo maior ou igual a 9 mm, segundo Carvalho et al. (2014).

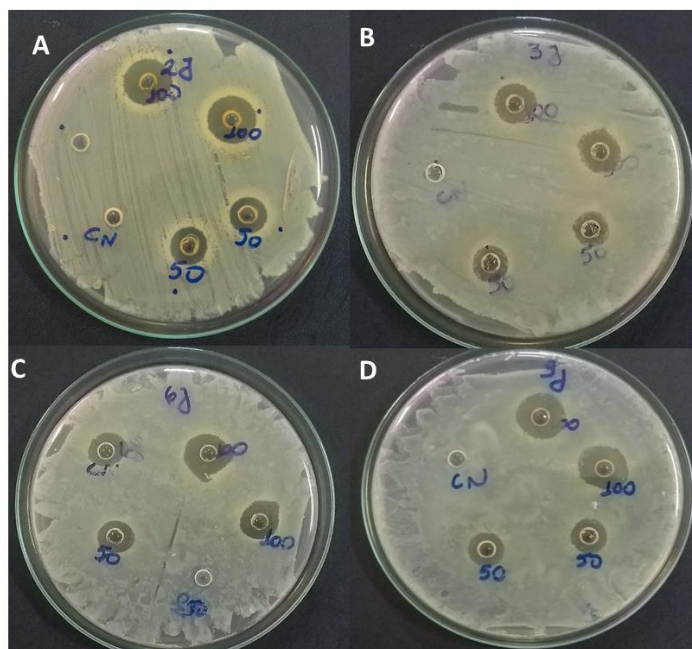


Figura 5: Halo de inibição das concentrações de 100 e 50 mg/ml pelo método de poços em ágar Muller Hilton; (A) *Salmonella typhimurium*; (B) *Klebsiella pneumoniae*; (C) *Escherichia coli*; (D) *Streptococcus mutans*.

4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade bacteriana deu-se pela determinação da CIM que corresponde a menor concentração do extrato da própolis capazes de inibir as bactérias supracitadas. A CIM foi determinada através de testes de microdiluição em placa de 96 poços de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005)*. Em cada poço foram adicionados 20 µL do inóculo ajustado pela escala de McFarland, 100 µL de Agar Mueller-Hinton e 100 µL do própolis nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,562 mg/ml. Nos poços-controle foram adicionados: meio de cultura, inóculo do microrganismo e água destilada (controle negativo), ou meio de cultura, inóculo do microrganismo e os antibióticos Levofloxacina e ceftriaxona (controle positivo). Após o período de incubação, de 24h/37°C, foram acrescidos a cada um dos orifícios 10 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) a 1%, e as microplacas foram novamente incubadas a 37°C por mais 2 horas. Decorrido esse tempo, realizou-se a leitura visual em cada microplaca, sendo observada a mudança de coloração nos poços. Na leitura foi observada a mudança da cor azul (original da resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante nos poços onde houve viabilidade bacteriana, e nos poços onde a cor permaneceu azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana e, conseqüentemente inibição dos microrganismos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

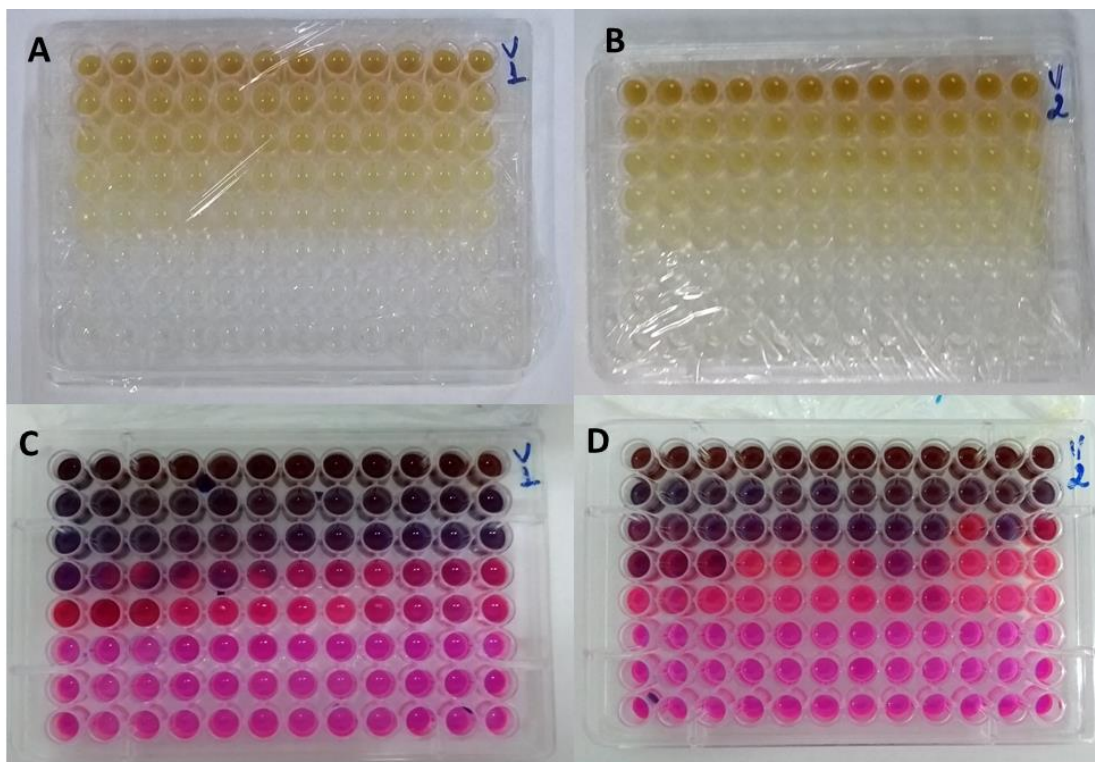


Figura 6 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em placas de 96 cavidades. (A) e (B) Representas as placas em pré-incubação na estufa; (C) e (D) demonstram os resultados após a adição da resazurina.

Fonte: Autor

4.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Nos poços da CIM em que não houve crescimento bacteriano foi feito o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) para avaliar quais concentrações do extrato eram bactericidas. Para isso, foi retirado 10 μ L do poço onde não houve crescimento bacteriano visível, e semeou-se na superfície do ágar Mueller-Hinton. Após 48h de incubação a 37°C, foi definida a concentração bactericida mínima como a menor concentração do látex e de seus extratos em estudo, capaz de causar a morte dos microrganismos, sendo realizado em triplicata (SANTURIO et al., 2007).

4.5. ATIVIDADE CICATRIZANTE

4.5.1 Formulação do creme

Para preparação da formulação do creme aplicado por via tópica nas feridas experimentais usado na avaliação da atividade cicatrizante, foi utilizado o creme base constituído de lanete WB 10%, isobecila 5%, butil-hidroxitolueno (BHT) 0,01%, ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 0,1%, propileno glicol 5%, aristoflex 1,5%, silicone BC245 2%, Phenonip[®] 0,1% e água bidestilada q.s.p. 100 g. Foram Adicionados ao creme 10% do extrato liofilizado.

4.5.2 Animais Utilizados e grupos experimentais

Foram utilizados princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a Lei Aucoca nº 11.794 na condução do experimento, no qual iniciou após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte – UERN, sobre o protocolo nº 001/15 (Anexo A).

Na avaliação da atividade cicatrizante foram empregados 40 ratos da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, machos da linhagem Wistar e com peso médio de 250g, sendo todos provenientes e mantidos no biotério da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) campos Mossoró. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40x50x20 cm) forradas com maravalha contendo três animais em cada, as quais eram mantidas em salas adequada com temperatura 21 a 23° C e com ciclo de luz claro/escuro de 12 h. Água e ração comercial (Labina Purina[®]) foram oferecidas *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo experimental (GE), composto por 20 ratos com feridas cirúrgicas cutâneas, tratados com aplicação tópica do creme base com 10% de própolis, e o grupo controle (GC), com o mesmo número de animais que receberam a aplicação tópica de creme base sem adição de própolis.

4.5.3 Protocolo anestésico, confecção das feridas e aplicação tópica do creme

Para a realização das feridas cutâneas, os animais foram anestesiados através da técnica dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (8,0 mg/kg) e cloridrato de ketamina (140mg/kg), administrado por via intramuscular.

Foi feita ampla tricotomia da região dorsal e antissepsia com álcool iodado 2% no local cirúrgico e sem realizar distensão da pele efetuou com auxílio de molde metálico circular de 1 x 1 cm de diâmetro e caneta para retroprojeter 1mm a demarcação para confecção da ferida. Em cada rato, realizou-se uma ferida cutânea centralizada na região dorsal, a incisão com lâmina de bisturi frio nº 15 e tesoura de ponta romba com auxílio de pinça de dissecação para remoção e descarte da pele e tecido celular subcutâneo, expondo a fáscia muscular. O dia da produção da lesão cutânea foi intitulado como o dia 0.

O creme foi aplicado imediatamente após cirurgia e posteriormente a cada 24 h com auxílio de espátula estéril, em quantidade suficiente para cobertura total das lesões.

4.5.4 Avaliação macroscópica e morfométrica das lesões

As lesões cutâneas foram avaliadas diariamente quanto a presença de hiperemia, edema, sangramento, secreção, odor e crostas.

As áreas das feridas foram medidas diariamente nos diâmetros maior e menor empregando-se paquímetro. Os dados obtidos foram avaliados mediante a equação formulada por Prata et al., (1988): $A = \pi \cdot R \cdot r$. Onde A = área (cm²); $\pi = 3,14$; “R” o raio maior e “r” o raio menor.

4.5.5 Biopsia das feridas e avaliação histológica

Em todos os animais do grupo controle e experimental, foram realizadas biopsias nos 3º, 7º 14º e 21º dias após a produção das lesões. O mesmo protocolo anestésico utilizado para a realização das feridas foi adotado para a realização das biopsias. Retirou-se fragmentos de aproximadamente 1 cm² de tecido epitelial abrangendo toda a área da lesão os quais foram fixados em formalina a 10%. Os fragmentos fixados foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol, submetidos à inclusão em parafina, cortados a 5 µm de espessura, e

posteriormente, corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Para avaliação do colágeno realizou-se coloração pelo tricômico de Masson.

Após a confecção das laminas e coloração do material foram realizadas fotografias dos cortes histológicos com câmera digital Canon acoplada ao microscópio óptico convencional (Olympus modelo BX50) e conectado a um computador com programa específico de análise de imagem. A seguir fluxograma descritivo conforme as etapas e metodologia utilizada no delineamento experimental da avaliação da atividade cicatrizante (Figura 6)

A evolução do processo cicatricial foi avaliada pelos seguintes parâmetros histológicos: células polimorfonucleares, células mononucleares, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas. Os referidos parâmetros histológicos foram agrupados em ausente, leve, moderado ou intenso, seguindo os critérios descritos por Akkol et al., (2009). Para a crosta foi atribuída a classificação presente ou ausente, para a reepitelização foram considerados: ausente, parcial e total, seguindo a metodologia descrita por Iordanou et al., (2009).

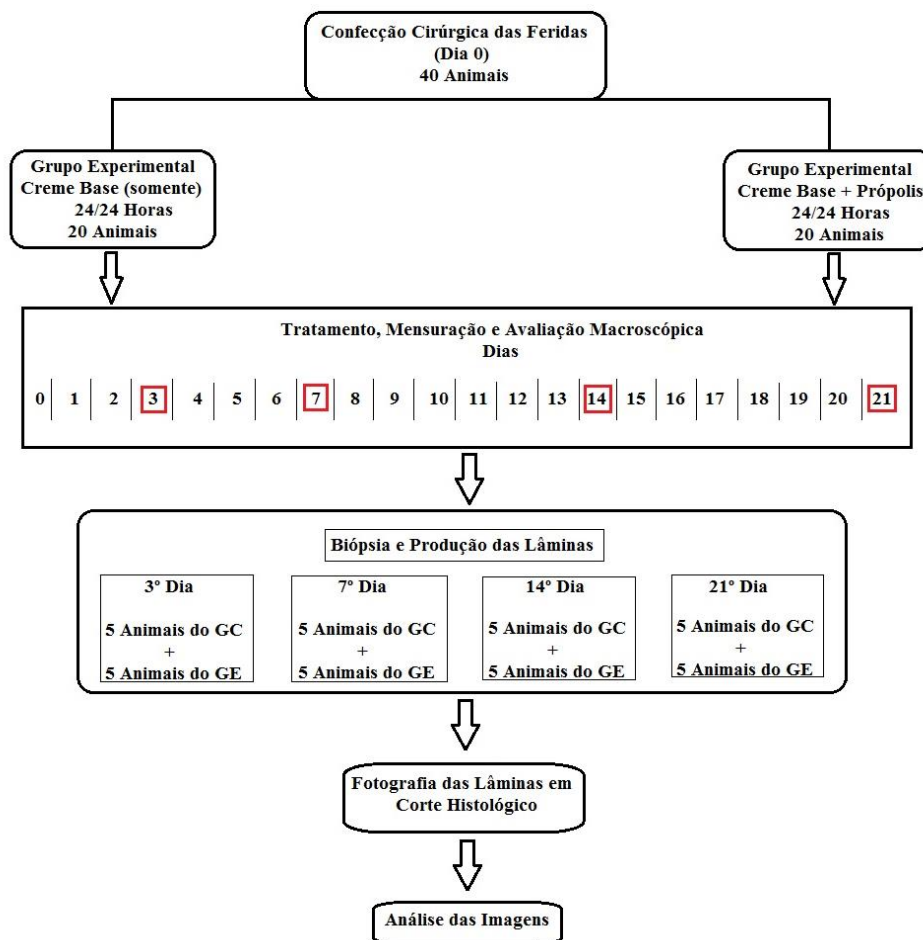


Figura 7- Fluxograma do delineamento do teste de cicatrização

4.6 MONITORAMENTO DINÂMICO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL – XCELLIGENCE SYSTEM

O uso de ensaios *in vitro* com células é crucial para o entendimento da eficácia, especificidade, permeabilidade, solubilidade, estabilidade e mecanismo de ação da interação entre uma substância e seus alvos celulares, porém, a maioria desses ensaios apresentam várias limitações. Outro fator importante é que alguns desses ensaios podem prover uma informação limitada sobre o mecanismo de interação da droga com seus alvos celulares (ROCHA, 2017).

O XCELLigence System RTCA DP (Dual Plate) permite um monitoramento dinâmica e livre da proliferação e viabilidade celular em tempo real. Esse equipamento é capaz de quantificar a proliferação e viabilidade de células aderidas em tempo real utilizando um sistema eletrônico de leitura, denominado impedância. As células são plaqueadas em placas de 16 poços que contêm sensores microeletrônicos. A interação das células com esses biosensores eletrônicos geram uma resposta de impedância que não apenas indica o status de viabilidade celular como também correlaciona com o número de células no poço (ROCHA, 2017).

Seguindo as sugestões do fabricante, foi realizada curva de concentração de células para a escolha do número de células ideal para o experimento. Para tal, as células L929 foram plaqueadas nas E-plates de 16 poços em concentração que variaram de 2.000 a 15.000 células/poço. A aderência, a disposição e proliferação das células foram monitoradas a cada 30 minutos utilizando o RT-DP system. A proliferação celular foi monitorada por 48-72 horas. Após o final dessa etapa, o número de células por poço foi escolhido baseado no Index celular máximo encontrado, chegando a concentração ótima de 10.000 células/poço.

Tratamento com a substância e ensaio de citotoxicidade. O número de células/poço selecionado foi plaqueado em 190 μ L de meio na placa. A aderência, disposição e proliferação das células foi monitorada a cada 30 minutos pelo sistema RT-DP. Aproximadamente 24 horas depois do plaqueamento, quando as células estavam em sua fase de crescimento logarítmica, as células foram tratadas com 10 μ L dos compostos dissolvidos em meio de cultura. As células do controle foram tratadas com DMSO, o qual serviu de veículo para a substância. A concentração final de DMSO não excedeu 0,1% em nenhum tratamento. A doxorrubicina (0,22 μ M) foi utilizada como controle positivo. As concentrações testadas de Própolis foram 43 μ g/ml, 86 μ g/ml, 172 μ g/ml.

O resultado de impedância celular foi expresso como uma unidade arbitrária chamada de Índice Celular (do inglês, Cell Index). O índice celular de cada ponto foi definido como $(R_n - R_b) / 15$, onde R_n é a impedância do poço com célula e R_b é a impedância do poço apenas com o meio.

4.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO et al, 2000).

A redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (Mosman, 1983). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. O ensaio do MTT tem sido usado frequentemente para determinação da viabilidade celular.

O controle negativo utilizado no estudo foi o DMSO, cuja concentração final em todas as culturas celulares (poços da placa) foi de 0,1 % (v/v). Como controle positivo (substância de referência) foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina nas concentrações iguais a 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,15; 0,07; 0,03 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$. A substância teste foi ensaiada em sete diferentes concentrações: 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$.

As células (linhagem L929 e SW620) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução composta dos antibióticos penicilina (100U/mL)/estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$). As placas de 96 poços foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO_2 por 24 h a fim de permitir a sedimentação e adesão celular. Após esse período, a substância teste, a substância de referência (doxorrubicina) e o controle negativo (DMSO) foram adicionadas as culturas celulares. Após os períodos de exposição de 24, 48 e 72 h, foi adicionado a cada poço 50 μL

de solução de MTT (0,5 mg/mL). As placas foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 3 h e logo após a solução de MTT foi removida e o precipitado de formazan foi ressuspensionado em 100 µL álcool isopropílico.

Para a quantificação do sal reduzido (formazan), as absorbâncias de cada poço foram obtidas com o auxílio do espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. A citotoxicidade foi estimada a partir da média das absorbâncias (570 nm) das réplicas de cada condição experimental subtraída dos valores do branco, a qual é comparada com a média obtida pelo controle do veículo DMSO, considerada como correspondente a 100% de viabilidade celular. Os dados foram analisados a partir de regressão não-linear para avaliação da citotoxicidade.

4.8 ATIVIDADE MUTAGÊNICA

O ensaio do micronúcleo para avaliação do potencial mutagênico da amostra de própolis foi realizado sobre fibroblastos murinos (linhagem L929). O controle negativo utilizado no estudo foi o DMSO, cuja concentração final em todas as culturas celulares foi de 0,1 % (v/v). Como controle positivo (substância de referência) foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina na concentração final nas culturas celulares igual a 10 µg/mL.

A substância teste foi ensaiada em três diferentes concentrações: 50, 100 e 250 µg/mL. As culturas celulares (linhagem L929) foram preparadas em tubos para centrifugação tipo Falcon. As células ($0,7 \times 10^5$ células/mL) foram semeadas em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução composta dos antibióticos penicilina (100U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL). Todas as culturas celulares foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

Após esse período, as culturas foram expostas a substância de referência (doxorrubicina), ao controle negativo (DMSO) e a substância teste durante 24 h. Ao término da exposição, adicionou-se citocalasina B em todas as culturas em uma concentração final de 3 µg/mL. Após 42 horas da adição de citocalasina B, as culturas foram tratadas com uma solução hipotônica de KCl (37°C) a 0,075M por 15 minutos e posteriormente fixadas com solução gelada (4°C) de etanol/ácido acético glacial (3:1). Após a fixação, as lâminas foram confeccionadas e coradas com laranja de acridina (50 µg/mL). As preparações celulares foram examinadas (teste cego) com o auxílio de um microscópio de fluorescência com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de emissão (barreira) amarelo (575 nm), usando a objetiva de

imersão. Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o Índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) como parâmetro que leva em consideração a proporção de células com 1, 2, 3 ou mais núcleos em 500 células viáveis por cultura experimental. Já os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2000). Assim, somente células binucleadas (2000 células/lâmina) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas.

4.9 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados da atividade cicatrizante foram expressos em média \pm desvio padrão avaliado pelo programa estatístico SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc) versão 12.0. Todos os dados foram primariamente avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade por Levene. Sempre quando necessário utilizou-se da transformação logarítmica para garantir os pressupostos paramétricos. Variável percentual como concentração sofreu transformação arcoseno. Entretanto, para apresentação nas tabelas, foram utilizados os resultados não transformados. Para evidenciar diferença estatística dentro dos grupos tratado e controle no decorrer dos dias utilizou-se Análise de variância (One Way ANOVA) seguida do teste de Dunnett utilizando como momento base o dia 03. Diferença entre os grupos experimentais dentro de cada dia foi calculada por teste t para amostras independentes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Em relação aos halos de inibição de crescimento bacteriano, os dados foram expressos em valores de média a desvio padrão através do programa estatístico SPSS 21.0. Após análise dos pressupostos paramétricos a diferença estatística entre grupos foi testada através da análise de variância (ANOVA) seguido de Tukey, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Para analisar os dados do potencial mutagênico os resultados foram expressos através da média \pm erro padrão da média e a significância estatística foi obtida através de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls. Para avaliar a atividade citotóxica os dados foram expressos em valores média a desvio padrão através do programa estatístico SPSS 21.0 para evidenciar diferença estatística significativa entre os grupos e dentro dos grupos, utilizou o Teste t independente e ANOVA seguido de Dunnet respectivamente, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

O resultado da prospecção fitoquímica preliminar do extrato sugeriu a presença de flavonoides (flavonas, flavonóis e xantonas), taninos, catequinas e saponinas como pode ser visto na tabela 1

Tabela 1 - Testes fitoquímicos qualitativos preliminares

Teste	Resultado
Fenóis e taninos	Positivo (taninos flavobenicicos)
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	Positivo (flavonas, flavonóis e xantonas)
Leucoantocianidinas, catequinas e flavaonas	Positivo (catequinas)
Flavonóis, flavonas, h fp flavononóis e xantonas	Negativo
Saponinas	Positivo

Devido a necessidade de obter mais informações acerca da composição química do extrato hidroalcoólico 70 % de própolis, foi realizada uma triagem por CCD com diferentes reveladores a fim de identificar as classes de compostos presentes no mesmo. A figura 8 ilustra as CCDs após eluição e revelação com os reagentes: vanilina sulfúrica, cloreto férrico, reagente natural (visualização no visível e no UV 365 nm) e dragendorff. Este estudo demonstrou que o extrato de própolis da abelha amarela é caracterizado por uma mistura complexa de compostos químicos interessantes, semelhante a vários outros própolis já estudados no Brasil.

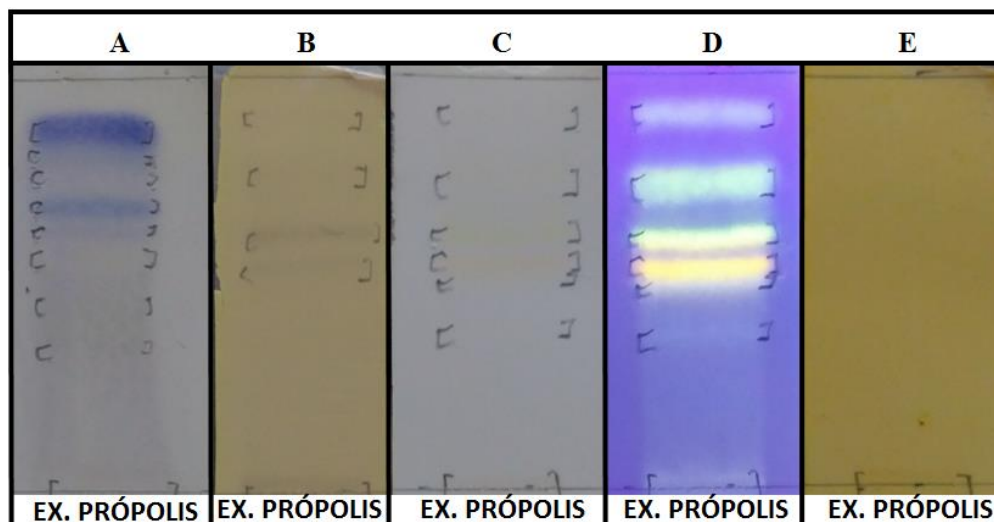


Figura 8 – Cromatografia em Camada Delgada do extrato hidroetanólico de própolis após revelação com diferentes reagentes.

Legenda: Fase estacionária: cromatoplasmas de alumínio com gel de sílica 60 F254. Fase móvel: tolueno: AcOEt: ácido fórmico (5:5:0,5, v/v/v). (A) Vanilina Sulfúrica + aquecimento, visualização visível. (B) Cloreto Férrico, visualização visível. (C) Reagente Natural A 0,2 %, visualização visível. (D) Reagente Natural A, visualização UV 365 nm. (E) Dragendorff, visualização visível.

Fonte: Resultados experimentais.

O primeiro revelador usado foi a vanilina sulfúrica. Esse revelador é conhecido por ser um revelador universal e detecta principalmente a presença de compostos amargos (que possuem estrutura de terpenos), saponinas e compostos de óleos essenciais. Os compostos amargos apresentam zonas vermelho-marrom, amarelo-marrom ou verde escura, azul, azul-violeta e amarelada. As saponinas apresentam coloração azul, azul-violeta, e, algumas vezes, vermelho ou amarelo-marrom. Os óleos essenciais apresentam coloração azul, marrom ou vermelha (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 1984). A partir da visualização da figura 1A foi observado que o extrato hidroetanólico da própolis da *Frieseomelitta doederleini* apresenta bandas de coloração azul, sugerindo a presença de saponinas.

As saponinas são glicosídeos de esteroides (27 carbonos) ou de terpenos policíclicos (30 carbonos). Essas substâncias possuem características anfífilas, pois, em sua estrutura, possuem uma parte lipofílica (aglicona ou sapogenina, de núcleo triterpênico ou esteroidal), e outra parte hidrofílica (heterosídeo). Assim, possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial da água e ação detergente e emulsificante (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

Prosseguindo com o processo de triagem por CCD, foi realizada revelação com Cloreto férrico ($FeCl_3$), que é usado na detecção de compostos fenólicos, pois estes são

facilmente oxidáveis por influência de metais como o ferro (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Os compostos podem apresentar-se corados de marrom ou azul após a revelação (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 1984). Na figura 8B, podemos visualizar a presença de bandas de coloração marrom, sugerindo a presença de compostos fenólicos.

A seguir foi utilizado o Reagente Natural A 0,2% é um revelador específico para flavonoides. Após revelação com esse reagente e observação sob luz UV 365 nm, os flavonoides apresentam zonas fluorescentes de intensidade amarela, laranja e verde (WAGNER; BLADT; ZGAINSKY, 1984). Podemos observar presença marcante de bandas características de flavonoides nas figuras 8C e 8D, sugerindo que o extrato da própolis possua flavonoides agliconas (flavonoides não ligados a moléculas de açúcar) devido a polaridade de fase móvel utilizada (ligados a uma ou mais moléculas de açúcar). Os flavonoides da espécie apresentaram coloração amarela e verde fluorescente quando visualizados no UV 365 nm após revelação com reagente Natural A (figura 8D).

A partir da análise por CCD, sugere-se a presença dos flavonóides luteolina (coloração amarelo fluorescente e R_f 0,57), canferol (coloração verde fluorescente e R_f 0,67) e quercetina (coloração amarelo-alaranjado fluorescente e R_f 0,55) pelas características de coloração e R_f apresentados. Para confirmação da presença dessas substâncias, foi realizada Co-CCD e pode-se sugerir a presença de quercetin (coloração amarelo fluorescente e R_f 0,57) e canferol (coloração verde fluorescente e R_f 0,67) no extrato hidroetanólico da própolis (figura 9).

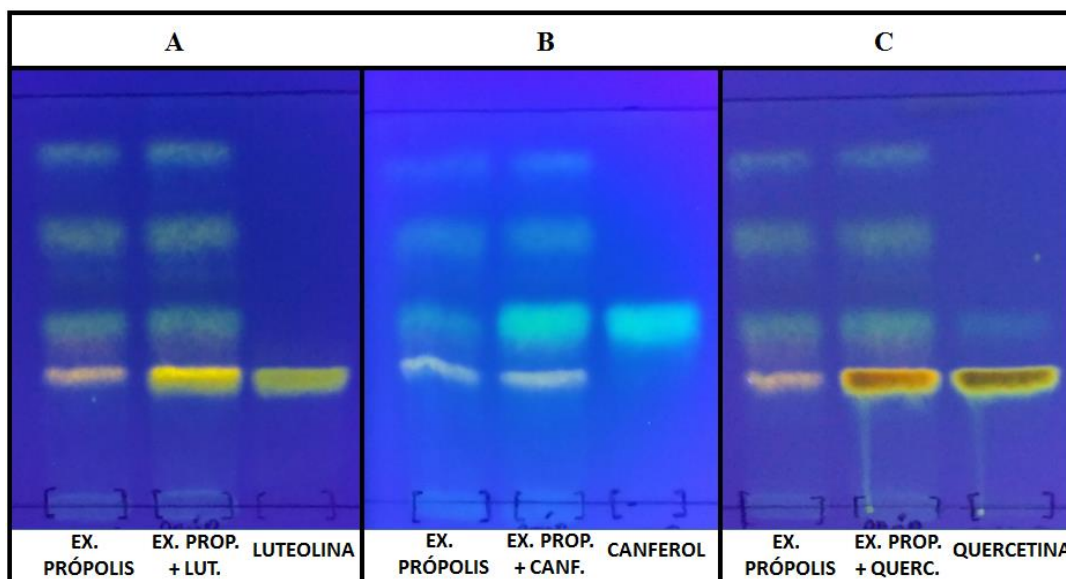


Figura 9 – Co-CCDs com o extrato hidroetanólico de própolis e os padrões luteolina, quercetina e canferol

Legenda: Fase estacionária: cromatoplasacas de vidro com gel de sílica 60 F254. Fase móvel: tolueno: AcOEt: ácido fórmico (5:5:0,5, v/v/v). Revelador: Reagente Natural A 0,2 %, visualização UV 365 nm. (A) Co-CCD com Luteolina. (B) Co-CCD com Canferol. (C) Co-CCD com Quercetina.

Fonte: Resultados experimentais.

No extrato etanólico da própolis verde, investigado no estudo de Roberto (2009), foi determinada a presença de ácido caféico, ácido ferúlico, rutina e quercetina, e no extrato etanólico do alecrim-do-campo foram encontrados estas mesmas substâncias, além do flavonóide canferol. Os ácidos caféico e ferúlico são ácidos fenólicos, enquanto que a rutina pertence ao grupo das flavonas derivadas (geralmente descrita como um bioflavonóide) e a quercetina e o canferol são flavonóides da classe flavonol.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓIS TOTAIS

Tabela 2 – Atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, e determinação da concentração de fenóis totais

Teste	Resultado
DPPH	Ic50 = 46,39ppm ¹ (µg/ml)
ABTS	Ic50 = 440,44ppm ² (µg/ml)
Fenóis Totais	R ³ = 35,55mg EAG/g EXT

Ic50 = concentração de extrato necessária para inibir 50% do radical; 1- R=0,99804; 2-R=0,9805; 3-Resultado expresso em miligramas de equivalente ao ácido gálico, para cada grama de extrato bruto.

Os compostos fenólicos estão presentes na composição da própolis da abelha amarela, apresentando concentração de 35,55mg EAG/g (Tabela 2). Estes compostos têm sido estudados por apresentarem propriedades antioxidantes, principalmente, decorrente da sua ação sobre os radicais livres, impulsionando os estudos sobre a atividade antioxidante da própolis e conseqüentemente aumentado o interesse em seu consumo.

Devido à ação antioxidante, os fenólicos cooperam com a redução dos danos oxidativos celulares originados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010).

Os conteúdos de compostos fenólicos têm sido sugeridos para desempenhar um papel preventivo no desenvolvimento de câncer e doenças cardíacas. Alguns autores afirmam que as atividades biológicas das própolis brasileiras são principalmente devidas aos altos níveis de ácidos fenólicos (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

Foram utilizados dois métodos diferentes para avaliação da atividade antioxidante da própolis estudada, o que possibilita obter informações durante os diferentes estágios da reação de oxidação. Tal atividade foi medida a partir da capacidade da própolis de eliminar os radicais DPPH e ABTS (IC_{50}). Desta forma, quanto menor for o valor da IC_{50} , maior é a potência antioxidante, haja vista que quantidade menor da substância será necessária para promover a redução de 50% do reagente. Estes métodos são amplamente utilizados devido à simplicidade, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade (SALGUEIRO; CASTRO; 2016). Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 2. Verificou-se uma capacidade de eliminação maior sobre o radical DPPH em relação ao radical ABTS.

Como a atividade antioxidante é atribuída a capacidade de eliminar as espécies reativas de oxigênio/radicais livres por doação de hidrogênio, utiliza-se o teste de redução de DPPH, um radical livre estável, com finalidade de verificar a atividade antioxidante de vários extratos de própolis de diferentes abelhas (AHN et al., 2007). DPPH é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante. Este ensaio simples e altamente sensível mede a capacidade do extrato para doar elétrons para o radical estável DPPH (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Neste estudo, a propriedade de extinguir radicais livres da própolis da abelha amarela foi verificado quanto a capacidade de eliminar o radical DPPH. As concentrações que proporcionaram atingir o IC_{50} (inibição de 50%) foram muito baixas, indicando alta atividade antioxidante. Segundo Melo et al. (2010) podemos classificar a atividade antioxidante dos extratos como boa ($IC_{50} < 65 \mu\text{g/ml}$), moderada ($65 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 152 \mu\text{g/ml}$) e baixa atividade

(IC₅₀>152 µg/ml). Usando essa classificação foi possível concluir que a propolis deste estudo apresenta boa atividade antioxidante.

Os antioxidantes são compostos que, quando presentes em baixas concentrações, retardam ou impedem a oxidação de substratos e são altamente benéficos para saúde devido às células de proteção e macromoléculas de agentes oxidantes (HALLIWELL et al., 1995).

Frozza et al. (2013) investigaram a capacidade de eliminação do radical DPPH da própolis vermelha coletada em Sergipe, o qual obteve um IC₅₀ de 270 µg/mL. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinheiro (2009) com própolis vermelho da mesma região geográfica, com IC₅₀ de 294 µg/mL. Tais resultados mostram que a própolis da abelha amarela coletada na região Oeste do Rio Grande do Norte demonstrou capacidade antioxidante, por este método, maior que as própolis vermelhas estudadas no estado de Sergipe.

Bonamigo et al. (2017) estudaram a atividade antioxidante da própolis de duas abelhas diferentes (*Scaptotrigona depilis* [EEP-S] e *Melipona quadrifasciata anthidioides* [EEP-M]). No ensaio de DPPH, EEP-M mostrou inibição de 50% de radicais livres (IC₅₀) a uma concentração de 60,91 µg/mL. O IC₅₀ não foi calculado para EEP-S. É possível observar que a própolis estudada apresentou uma capacidade de inibição do DPPH maior que as própolis em questão. Porém, quando comparado pelo ensaio de ABTS o nosso própolis mostrou capacidade de eliminação deste radical menor que os estudados pelos autores. Os valores de IC₅₀ dos EEPs foram de 80,04 ± 0,31 µg / mL (EEP-S) e 13,45 ± 1,81 µg / mL (EEP-M).

Silva et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante de 9 amostras de mel de *M. subnitida* coletados no estado da Paraíba, no Brasil. Foram analisados o mel puro e dois extratos em metanol (MeOH) e acetato de etila (EtOAc) pelos métodos através da eliminação do DPPH e do ABTS. Os valores de EC₅₀ variaram de 10,6 a 12,9 mg/mL para mel puro, 108,5 a 208,6 µg/mL para o extrato de MeOH e 43,5 a 87,8 µg/mL para a fração EtOAc no ensaio de eliminação de radicais DPPH. Os resultados EC₅₀ para o teste ABTS variaram de 6,1 a 9,7 mg / mL, 21,2 a 53,1 µg/mL e 13,2 a 33,9 µg/mL, para o mel puro, o extrato de MeOH e a fração EtOAc, respectivamente.

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato da própolis foi inicialmente testado pelo método de poços em ágar, contra onze microorganismos entre bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungo. Este

teste foi utilizado como análise preliminar para determinar a concentração a ser utilizada como ponto de partida para avaliar a CIM. Desta forma testou duas concentrações: 100 mg.mL⁻¹ e 50 mg.mL⁻¹. Ambas as concentrações inibiram o crescimento microbiano dos agentes testados, mostrando diferença ($p < 0,05$) quando comparamos as concentrações da própolis com os antibióticos controles utilizados (Tabela 3). As zonas de inibição variaram de 12 a 22 mm para concentração de 100 mg.mL⁻¹ e de 5.0 a 12.5 mm para a concentração de 50 mg.mL⁻¹. Como é possível observar, a concentração de 100 mg.mL⁻¹ exerceu atividade antimicrobiana sobre todos os agentes testados e a concentração de 50 mg.mL⁻¹ não exerceu atividade apenas contra *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*. Assim, resolveu utilizar como concentração de partida para a determinação da CIM a concentração de 50 mg.mL⁻¹ do extrato liofilizado da própolis.

O método de poços se baseia na difusão radial das substâncias, de acordo com Silveira et al. (2009) o método do poço é o mais adequado para testar a difusão de substâncias em extratos etanólicos, a cor não interfere na leitura dos resultados. Os autores concluíram que a técnica de ágar difusão em poço mostrou-se mais sensível que a técnica ágar difusão em disco na análise de extratos hidroalcoólicos, embora ambos tenham se mostrado úteis para esta finalidade, aliado ao fato de que estas técnicas são mais simples e requerem relativamente pouco recurso para a sua execução. O pequeno volume necessário e a possibilidade de testar vários compostos por placa frente a um único microorganismo é outra vantagem observada no emprego desse método (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

Tabela 3- Atividade antimicrobiana da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* sobre cepas de microrganismos patogênicos, pelo método de poços em ágar (expresso em média e desvio padrão).

Espécimes	Halo de inibição (mm)				
	Própolis-100 mg/ml	Própolis-50 mg/ml	Levofloxacino	Ceftriaxona	Fluconazol
<i>S. aureus</i>	16,17 + 0,76b	8,67 + 0,58c	23,5 + 1,32a	10,67 + 0,29c	-
<i>S. agalactiae</i>	18,5 + 0,71a	8,67 + 1,53b	19,0 + 1,0a	18,5 + 0,5a	-
<i>S. pyogenes</i>	14,5 + 0,5ab	8,33 + 0,58b	18,17 + 5,92a	14,0 + 1,0ab	-
<i>S. mutans</i>	18,0 + 1,0b	9,17 + 1,04c	20,5 + 0,87a	5,0 + 0,5d	-
<i>E. faecalis</i>	13,17 + 1,26c	5,17 + 1,04d	20,83 + 0,29b	24,83 + 0,76a	-
<i>S. flexneri</i>	12,33 + 0,58c	7,5 + 0,5d	30,17 + 0,76a	25,17 + 0,29b	-
<i>K. pneumoniae</i>	21,17 + 0,76a	10,0 + 1,0c	20,33 + 0,58a	17,83 + 0,76b	-
<i>S. typhimurium</i>	20,33 + 0,58b	9,33 + 0,76c	30,17 + 0,76a	17,17 + 5,97bc	-
<i>P. aeruginosa</i>	21,83 + 1,61a	10,33 + 0,76b	20,5 + 0,5a	19,5 + 0,5a	-
<i>E. coli</i>	18,33 + 0,58b	12,5 + 0,5c	24,5 + 0,5a	24,67 + 0,58a	-
<i>C. albicans</i>	12,5 + 0,05a	7,5 + 0,05b	-	-	13,5 + 1,32a

^{a,b,c} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$ – Tukey)

Para determinar a CIM utilizou-se 6 concentrações diferentes em ordem decrescente: 50,0, 25,0, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,562 mg.mL⁻¹. A própolis da *F. doederleini* foi ativa contra as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra a *C. albicans* (Tabela 3). Foi possível observar que a melhor resposta obtida foi contra *P. aeruginosa* (CIM= 3,125 mg.mL⁻¹), uma bactéria relacionada a resistência aos antimicrobianos, já a menor atividade foi observada sobre contra *S. pyogenes* (CIM= 25 mg.mL⁻¹).

Os microrganismos utilizados nos experimentos de avaliação da atividade antimicrobiana foram escolhidos por serem as bactérias e fungos empregados rotineiramente para esse tipo de estudo, sendo também responsáveis por várias formas de infecções em humanos e animais, e por adquirirem, com mais frequência, resistência aos antimicrobianos (OPLUSTIL et al., 2000). Ishii et al. (2011), em estudo envolvendo cães e gatos, verificaram que os agentes bacterianos encontrados com maior frequência foram *Staphylococcus spp.* e *Pseudomonas spp.* que estavam presentes principalmente nas feridas. Nas afecções do trato urinário, a maior parte das infecções ocorreu por bactérias Gram negativas. Nas afecções otológicas e ortopédicas prevaleceram as Gram positivas.

Tabela 4 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bacteriana Mínima (CBM) da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* sobre cepas de microrganismos patogênicos.

Microrganismo	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	25
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12,5	25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25	>50
<i>Streptococcus mutans</i>	12,5	25
<i>Enterococcus faecalis</i>	12,5	50
<i>Shigella flexneri</i>	6,25	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,5	12,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	6,25	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,125	6,25
<i>Escherichia coli</i>	12,5	12,5
<i>Candida albicans</i>	12,5	50

Segundo Rios et al. (1988) apud Duarte et al. (2003), extratos de produtos naturais que mostram atividade inibitória em concentrações menores que 100 mg.mL^{-1} podem ter um alto potencial antimicrobiano, já que os compostos podem ser isolados e usados em concentrações mais baixas.

Liberio et al. (2011), investigou a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, de diferentes estratos hidroalcoólicos da geoprópolis da abelha *Melipona fasciculata*, coletadas na região noroeste e central do Estado do Maranhão, no Nordeste do Brasil. É possível notar resultados semelhantes ao encontrado para a própolis investigada neste trabalho. Os autores mostraram que houve ação antimicrobiana dos extratos, com zonas de inibição variando de 10 a 13 mm para *S. mutans* e de 9 a 13 mm para *C. albicans*. Não foi detectada nenhuma atividade contra *L. acidophilus*. Já a CBM contra *S. mutans* foi de 6.25 mg.mL^{-1} para o estrato 2, e 12.5 mg.mL^{-1} para estrato 3.

Campos et al. (2011) avaliou a atividade antimicrobiana de amostras de própolis da abelha *Frieseomelitta varia* coletadas no estado de Minas Gerais. Os testes foram realizados através do ensaio de difusão em ágar com $300 \mu\text{L}$ de uma solução de própolis de 10 mg.mL^{-1} . O diâmetro da zona de inibição bacteriana encontrado foi: *Aeromonas hydrophila* (9.0 mm); *Bacillus subtilis* (7.5 mm); *Staphylococcus aureus* (8.0 mm). O crescimento de *P. aeruginosa* não foi afetado pela amostra de própolis. Os resultados encontrados são semelhantes os do trabalho em questão, porém é possível notar que a própolis da *F. doederleini* exerceu atividade sobre *P. aeruginosa*.

Campos et al. (2015) estudou o estrato etanólico produzidos de amostras de própolis da abelha *Tetragonisca fiebrigi* coletados do estado de Mato Grosso do Sul, na região

centro-oeste do Brasil. O extrato mostrou atividade antimicrobiana contra todos os microorganismos avaliados, porém com maior atividade contra bactérias Gram positivas (CIM de 0.55 a 1.02 mg.mL⁻¹) do que contra bactérias Gram negativas (2.25 a 7.91 mg.mL⁻¹). Os resultados encontrados no trabalho dos autores para bactérias Gram-negativas corroboram com o nosso trabalho que encontrou uma CIM para estas bactérias variando de 3.125 a 12.5 mg.mL⁻¹.

As propriedades terapêuticas da própolis das abelhas sem ferrão estão diretamente relacionadas com a sua composição química. Dentre os compostos se destacam os polifenóis e os flavonoides, descritos como responsáveis pelas várias atividades biológicas da própolis, principalmente sua ação antimicrobiana (MARCUCCI, 1995). Segundo Liberio et al. (2011), os flavonóides estão entre os principais grupos que contribuem para os efeitos antimicrobianos observados na própolis das abelhas estudadas. Em seu estudo o extrato que apresentou a maior atividade antimicrobiana foi o que teve a maior concentração de flavonoides. Cushnie; Lamb (2005) também alegam haver uma ligação entre a presença de flavonoides e atividade inibitória em microorganismos. Os compostos fenólicos também são descritos como importantes agentes antibacterianos que inibem bactérias promovendo danos à membrana celular e inibindo a síntese de ácidos nucleicos e o metabolismo energético desses microorganismos (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Castro et al. (2011) usaram *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para compreender como a própolis afeta os fungos no nível celular e molecular, e influenciam o metabolismo deste organismo. Os autores verificaram que a própolis é capaz de induzir uma resposta à morte celular por apoptose mediado pela citocromo C. Observaram também que o gene Metacaspase YCA1 é importante para a morte celular mediada pela própolis.

5.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE

Na análise macroscópica demonstrada (Figura 9), no 3º dia pós-operatório, observou-se que os animais pertencentes aos GE e GC apresentaram feridas cirúrgicas hiperêmicas, com bordas edemaciadas. Foram observadas diferenças notórias entre os tratamentos no 7º dias de tratamento. Neste período, as feridas dos animais do GE apresentavam-se com aspectos limpo, seco, sem evidências de exsudato inflamatório, com superfície externa recoberta por uma crosta uniforme, bem formada, nivelada com a pele. No mesmo período, os animais pertencentes ao GC apresentaram feridas hiperêmicas, com

bordos edemaciados, recobertas com crostas finas, irregulares, úmida e com coloração vermelho escura ou violácea. Nas feridas dos animais pertencentes ao GE, as crostas se desprenderam espontaneamente entre o sétimo e décimo primeiro dia, enquanto que nos animais do GC o mesmo ocorreu entre o oitavo e décimo segundo dia. A avaliação macroscópicas das feridas no 14º dia demonstrou que os animais do GE apresentaram marcada redução do tamanho original das feridas, sendo que as mesmas apresentaram-se secas, com cicatrizes planas, de coloração esbranquiçada, nivelada com a pele (Figura 9 C). As feridas dos animais do GC apresentavam-se visivelmente maiores com coloração rósea, brilhante e úmidas, sendo que em dois animais a cicatrizes apresentavam-se elevadas, acima do nível da pele (Figura 9 F).

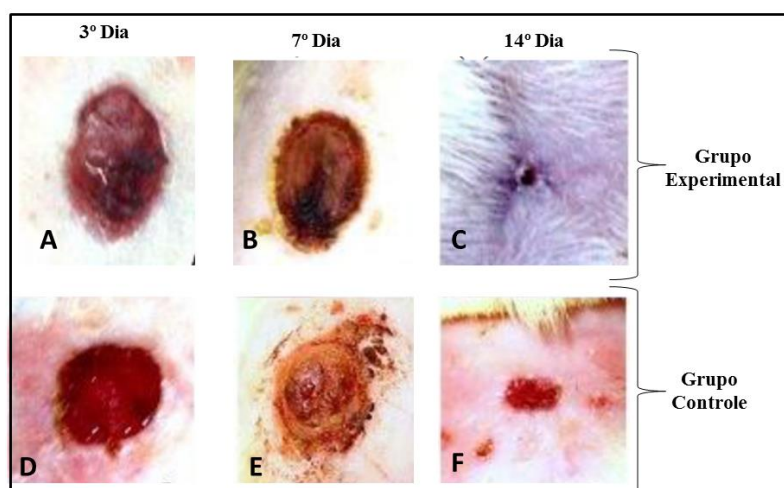


Figura 10 – Aspecto macroscópico das feridas cutâneas pós-cirúrgico em *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar ; Grupo Experimental (GE) no 3º dia(A); Grupo Controle no 3º dia (D); grupo experimental no 7º dia (B); grupo controle no 7º dia (E); grupo experimental no 14º dia (C); grupo controle no 14º dia (F)

Fonte: Autor

A avaliação microscópica dos cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina (HE) revelou que as amostras das feridas dos animais do GE apresentaram moderado inflamatório polimorfonuclear. No entanto, os animais do GC apresentaram intenso infiltrado polimorfonuclear. No 7º dia, no GE constatou-se a ausência de células polimorfonucleares, presença moderada densidade de células mononucleares, além, fibroblastos, vasos sanguíneos, fibras colágenas e ocorrência de repitelização parcial. Em relação à avaliação do GC no mesmo período, verificou-se moderado infiltrado inflamatório misto, composto de células polimorfonucleares e células mononucleares e discreta presença de vasos sanguíneos e

fibroblastos. No 14º dia, observou-se em todos aos animais do GE, reepitelização total, evidenciado pela presença de células epiteliais recobrando toda a superfície da ferida cirúrgica. No mesmo período, foi possível constatar ainda, presença de cicatriz dérmica extensa, evidenciada por intensa densidade de fibroblastos e fibras colágenas. No entanto, nos animais do GC verificou-se regeneração epitelial incompleta em quatro animais, presença de focos remanescentes de infiltrado inflamatório mononuclear e moderada quantidade de vasos sanguíneos, fibroblastos e de fibras colágenas.

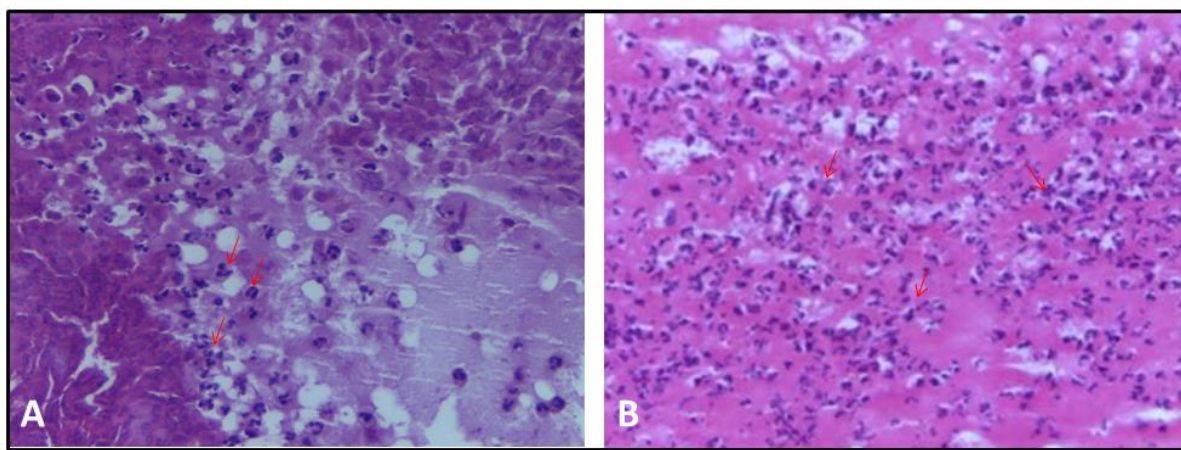


Figura 11 – Aspecto histológico das feridas cutâneas, (A) ao 3º dia de evolução pós-cirúrgica do grupo experimental nota-se discreto infiltrado de células polimorfonucleares; e no grupo controle (B) nota-se um intenso infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares. Obj. 20x – Coloração hematoxilina-eosina (HE)

Fonte: Autor

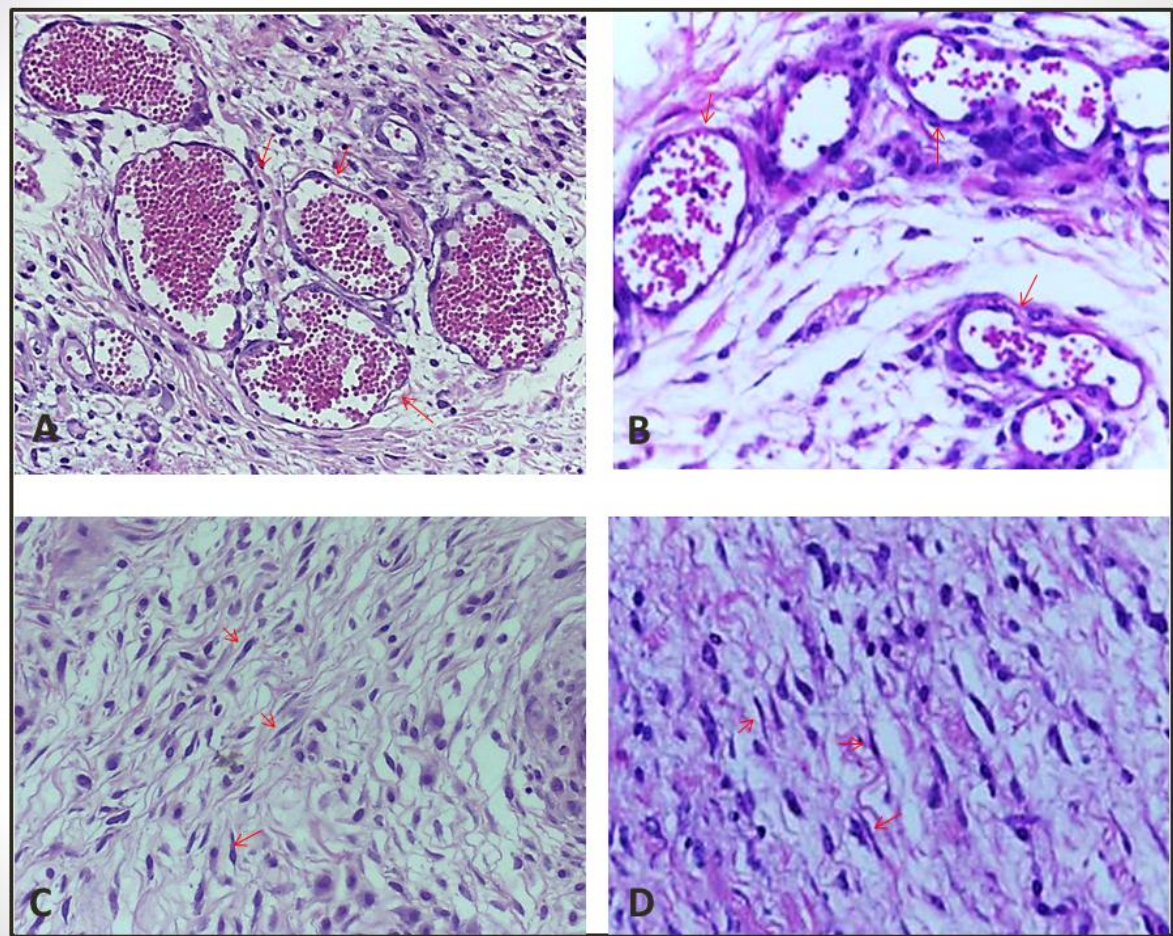


Figura 12 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 7º dia de evolução pós-cirúrgica, (A) no grupo experimental e (B) no grupo controle, nota-se presença de tecido de granulação com vasos sanguíneos e células mononucleares. Obj. 10x. (C) Nota-se a presença de maior quantidade de fibroblastos em GE e menor quantidade de fibroblastos em GC. Obj. 20x - Coloração hematoxilina-eosina (HE)

Fonte: Autor

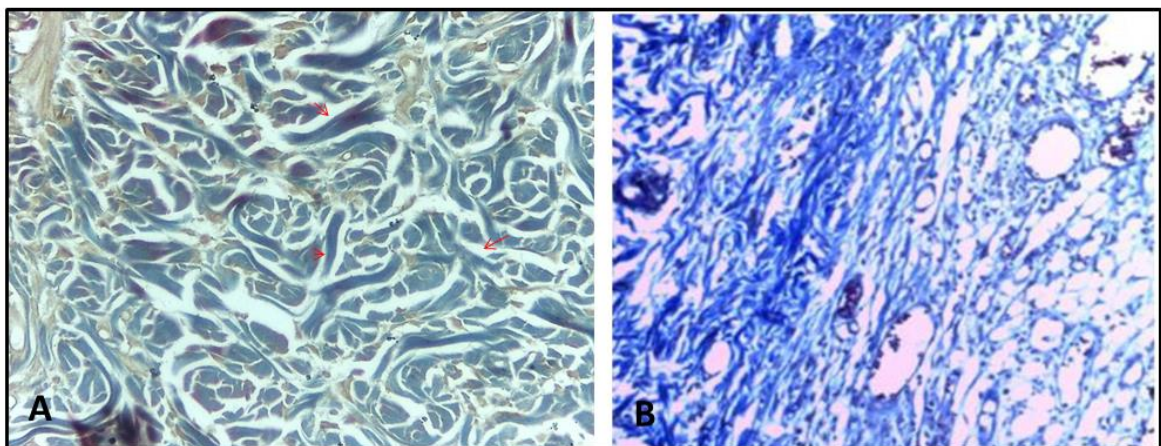


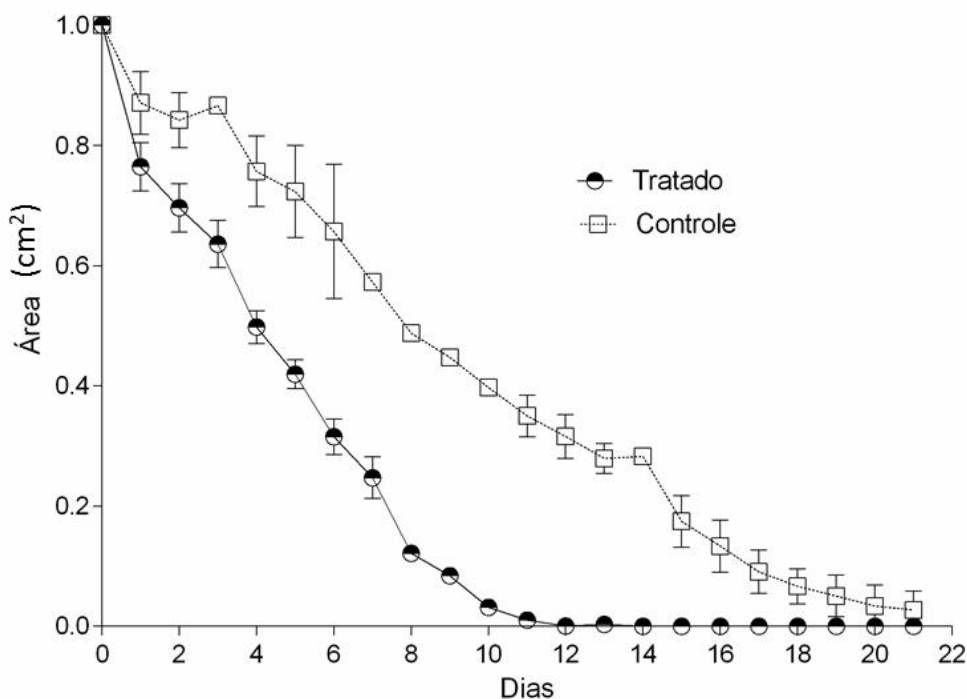
Figura 13 – Aspecto histológico das feridas cutâneas ao 14º dia de evolução pós-cirúrgica, (A) grupo experimental nota-se maior quantidade de fibras colágenas e menor quantidade no grupo controle (B). Obj. 20x – Coloração tricômico de Masson

Fonte: Autor

Os resultados das análises histológicas realizadas no presente estudo foram semelhantes aos obtidos por Berretta et al. (2012), que observaram diminuição do recrutamento de células inflamatórias e aumento da produção de colágeno em feridas cutâneas experimentais em ratos tratados com gel de própolis verde, após o terceiro dia de tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2016) que observou uma influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais utilizando creme à base de geoprópolis da abelha *P. aff. Flavocincta*. O uso de cremes ou extratos de própolis tem sido amplamente testado na dermatologia no tratamento de feridas abertas, queimaduras e úlceras externas, com resultados promissores, por apresentar propriedades anti-inflamatórias (PESSOLATO et al., 2011). Diaz et al. (1997) realizaram um estudo sobre a aplicação de própolis a 5% em feridas sépticas faciais em humanos e relataram que 90% dos pacientes apresentaram uma melhora total aos 7 dias de tratamento.

Quanto à área da ferida, verificou diminuição progressiva do tamanho ao longo do tempo, com diferença significativa entre o grupo experimental e o grupo controle. No decimo segundo dia as feridas dos animais do GE já estavam completamente fechadas, enquanto no GC o fechamento das feridas ocorreu no vigésimo segundo dia (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Gráfico do valor médio \pm desvio padrão das áreas das feridas nos animais do Grupo Experimental e do Grupo Controle



É possível notar que a própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* promoveu um processo de cicatrização mais rápido ao encontrado por Silva et al. (2016), o qual demonstrou o fechamento das feridas no grupo experimental no decimo sexto dia.

Levando-se em consideração os resultados aqui apresentados, torna-se relevante lembrar que o processo de cicatrização é dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Estas fases complexas e distintas, se sobrepõem afim de assegurar a reparação de tecidos. Essa série de eventos envolve vários tipos de células, que interagem entre si, proporcionando liberação de citocinas, fator de crescimento e outras moléculas bioativas, como radicais livres, culminando na restauração da integridade do tecido (BERRETTA et al., 2012). O processo inflamatório é importante na reparação tecidual, contudo inflamação exacerbada promove edema, quantidade excessiva de exsudato e adicionalmente a isto, mediadores químicos envolvidos na inflamação podem aumentar ainda mais a lesão tecidual, os quais favorecem deiscência e crescimento bacteriano (ROBBINS, COTRAN e KUMAR, 2009). Desta forma as evidencias de edema e hiperemia discreta e a baixa densidade de células polimorfonucleares observadas nas feridas do GE e em relação ao GC, sugere uma atividade anti-inflamatória da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini*.

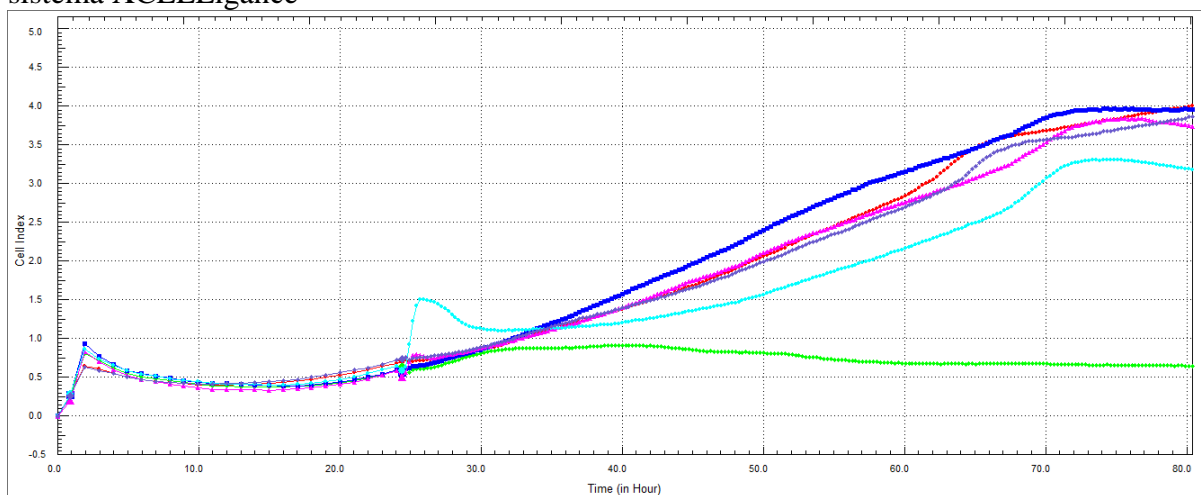
Tem sido relatado que compostos fenólicos exercem uma grande variedade de atividades bioigcas, como a capacidade antioxidante por sequestro de radicais livres, dentre eles os derivados de oxido nítrico, o que pode acelerar a cicatrização de feridas cutâneas (SEHN, E. et al, 2009). Outras atividades em animais experimentais têm revelado efeitos benéficos na inflamação crônica e aguda (PAULINO et al., 2008). A própolis tem apresentado, especialmente em feridas cutâneas, uma atividade antiinflamatória e antimicrobiana que conseqüentemente melhora a cicatrização das feridas (RAMOS; MIRANDA, 2007).

5.5 MONITORAMENTO DINÂMICO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM TEMPO REAL – XCELLIGENCE SYSTEM

O comportamento cinético dos fibroblastos (linhagem L929) submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da própolis foi avaliado através do XCELLigence, num período total de incubação de 120 horas, porém no tempo 80 h devido a privação de nutrientes as culturas começaram a declinar. Vale salientar que esse é um estudo pioneiro, não sendo encontrados na literatura dados relativos a avaliação do crescimento celular em tempo real por algum tipo de própolis.

O programa gerou um gráfico (Gráfico 2) onde é possível ver que as concentrações de 43ug/ml e de 86ug/ml estimularem o crescimento celular entre os tempos de 25 a 70 horas. Importante destacar que a concentração da própolis de 43ug/ml promoveu um crescimento celular superior aos dois controles negativos, o contendo apenas as células L929 e o contendo as células L929 contendo DMSO 0,1%.

Gráfico 2 – Avaliação do crescimento de fibroblastos (linhagem L929) em tempo real pelo sistema XCELLigance



Legenda:

	L929 CONTROLE NEGATIVO
	L929 DOXORRUBICINA
	L929 PROPOLIS 43ug/ml
	L929 PROPOLIS 86ug/ml
	L929 PROPOLIS 172ug/ml
	L929 CONTROLE NEGATIVO COM DMSO 0,1%

Foram utilizadas 10.000 células para o experimento. Os poços dos controles receberam a mesma concentração de solvente que a amostra na sua maior concentração. A doxorubicina (DOX, 0,22 μ M) foi utilizada como controle citotóxico

A medição da impedância não é um processo invasivo, fazendo com que as células permaneçam em seu mais normal estado fisiológico durante o ensaio de proliferação celular, desta forma a técnica permite a avaliação da proliferação, viabilidade, morte e mudanças morfológicas nas células estudadas (ROCHA, 2017).

Freire (2010) avaliou o tratamento de lesões epiteliais em ratos com própolis a 10% por 3, 7, 14 e 21 dias e demonstrou um aumento na contagem de fibroblastos no 3º e 7º dia. O estudo de Jeon et al. (2007) mostrou efeito pró-angiogênicos do flavonóide quercetina encontrada em própolis, o qual, segundo os autores, estaria suprarregulando o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células epiteliais de cólon em modelo de

inflamação. De acordo com o estudo, ainda, as células epiteliais do cólon estimuladas com VEGF e tratadas com quercetina, realizaram tubulogênese e a indução observada mostrou ser dependente da ativação do HIF-1.

Evidências sugerem que compostos fenólicos podem atuar por meio de vários mecanismos, como capacidade antioxidante, modulação da atividade de enzimas telomerase, lipoxigenase, COX, entre outras, assim como por interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outros mecanismos essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011a).

5.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA

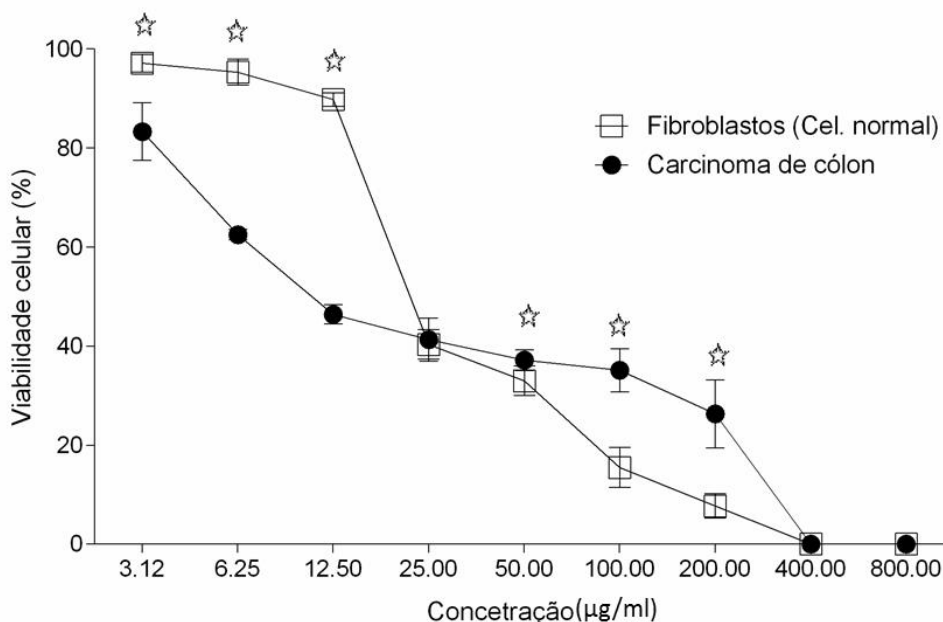
Devido à praticidade, sensibilidade, rapidez e baixo custo o método por MTT é um dos ensaios mais amplamente utilizados para avaliar o efeito citotóxico de diversos compostos, assim sendo, os resultados obtidos neste estudo foram baseados em nesse protocolo experimental.

Tabela 5 – Avaliação da Citotoxicidade do Extrato da Própolis da abelha amarela pelo Método de MTT sobre fibroblastos murinos (Linhagem L929) e sobre células de carcinoma de cólon humano (linhagem SW620) (Valores de média \pm desvio padrão)

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Carcinoma de Cólon	Fibroblastos (células normais)	p-valor
3,12	83,32 \pm 5,8 ^A	97,12 \pm 1,83 ^A	0,001*
6,25	62,51 \pm 1,06 ^B	95,33 \pm 2,61 ^A	<0,001*
12,5	46,43 \pm 1,96 ^B	89,82 \pm 1,36 ^B	<0,001*
25	41,34 \pm 4,34 ^B	40,35 \pm 2,95 ^B	0,653
50	37,18 \pm 2,11 ^B	33,38 \pm 3,0 ^B	0,029*
100	35,12 \pm 4,35 ^B	15,51 \pm 3,99 ^B	<0,001*
200	26,34 \pm 6,87 ^B	7,72 \pm 2,45 ^B	<0,001*
400	0 \pm 0	0 \pm 0	-
800	0 \pm 0	0 \pm 0	-

^{A, B} Letras diferentes na coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$ - Dunnet (Grupo base 3,12 $\mu\text{g/ml}$); * Significa diferença estatística na linha ($p < 0,05$ – Teste t independente).

Gráfico 3 - Avaliação da viabilidade celular do extrato da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* pelo Método de MTT sobre fibroblastos murinos (Linhagem L929) e sobre células de carcinoma de cólon humano (linhagem SW620)



A atividade citotóxica foi testada sobre fibroblastos murinos (Linhagem L929) e sobre células de carcinoma de cólon humano (linhagem SW620). Foram encontrados valores de IC50 bem semelhantes, porém menor para a linhagem não tumoral em relação a tumoral. Assim como, foi possível identificar uma inibição da viabilidade celular nas concentrações mais baixas da própolis sobre linhagem tumoral em detrimento a linhagem não tumoral (Gráfico 1). É possível observar uma atividade citotóxica para as células de carcinoma de colón já nas concentrações de 3,12 µg/mL, 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL, inclusive esta ultima já inibindo mais de 50% da proliferação celular, enquanto as células de fibroblastos praticamente não foram afetadas. Desta forma é possível sugerir que há uma seletividade aumentada para linhagem cancerígena, que pode correlacionar-se com o menor índice proliferativo das células tumorais em relação as células normais, uma vez que a mesma concentração de extrato foi capaz de inibir a proliferação celular de forma mais eficiente nas linhas tumorais investigadas.

A determinação do valor de IC50 é uma etapa importante em estudos de citotoxicidade. Como descrito às células foram submetidas a concentrações variadas da própolis; desta forma procurou-se determinar a concentração que provoque morte

significativa em 50% do total de células testadas. Esse valor de concentração é chamado de IC50. Assim, quanto menor o valor de IC50 mais citotóxica é a substância.

Tabela 6 – Valor da IC50 nas duas linhagens celulares (L929 e SW620) em relação ao tempo.

Linhagem celular	IC50		
	24 h	48 h	72 h
L929	> 250 µg/ml	> 250 µg/ml	28,33 µg/ml
SW620	> 250 µg/ml	> 250 µg/ml	18,87 µg/ml

É possível observar que a atividade citotóxica da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* é tanto dependente de concentração como dependente de tempo, apresentando uma IC50 significativa apenas quando as células foram expostas a própolis por um período de 72 h (Tabela 9).

De acordo com o *U.S. National Cancer Institute*, apenas compostos de extratos naturais com valor de IC50 igual ou menor do que 50 µg/mL merecem ser submetidos a análises de citotoxicidade mais detalhadas (MANS et al., 2000).

Campos et al. (2014) testou a citotoxicidade do extrato etanólico da própolis da abelha *Melipona orbigny* coletadas no estado de Mato Grosso do Sul, em células de eritroleucemia K562. Os testes demonstraram uma citotoxicidade dependente da concentração; só ocorrendo citotoxicidade na concentração mais alta testada (500 µg/mL). Os autores ainda avaliaram que a própolis promoveu a morte celular por necrose.

Esta mesma seletividade foi encontrada por Frozza et al (2013), porém o mesmo verificou os efeitos inibitórios do extrato hidroalcoólico de própolis vermelho foram mais significativos sobre as linhas celulares tumorais quando comparados aos não tumorais em concentrações mais elevadas. Sabe-se que a seletividade é um parâmetro importante na prevenção do câncer, onde novos e efetivos medicamentos com efeitos colaterais reduzidos são descobertos.

Os extratos de etanol de própolis estudados por Bonamigo et al. (2017) mostraram citotoxicidade dependente da concentração. Na concentração mais alta testada (500 µg/mL), o crescimento celular de células eritroleucêmicas (K562) foi de 32,6 % (EEP-S) e 21,2% (EEP-M), mostrando assim uma baixa atividade citotóxica das própolis em questão. No estudo não foi possível avaliar seletividade entre celular tumorais e não tumorais, haja vista que o autor usou apenas linhagem neoplásicas.

O efeito inibitório contra o crescimento de células cancerígenas exibido por diferentes amostras de própolis pode estar relacionado ao efeito geral dos compostos fenólicos

presentes em cada extrato, região e ano em que o material foi coletado (FROZZA et al., 2013).

Há constatações de que essa atividade inibidora da própolis no crescimento de células tumorais, está intimamente associada com a indução de apoptose (CHEN et al., 2007), demonstrada tanto pela análise de eletroforese de gel (AKAO et al., 2003) como pela citometria de fluxo (ISHIHARA et al., 2009).

Além da indução de apoptose, uma outra possibilidade para a ação antiproliferativa da própolis, é o possível envolvimento dos componentes da própolis, na regulação do ciclo celular, através da estimulação da expressão de certos genes que regulam o ciclo celular, como por exemplo, p21, p53, ciclina, CDK. Resultados obtidos de estudos *in vitro* mostraram que a apigenina modula reguladores do ciclo celular, induzindo um bloqueio na fronteira G2/M em queratinócitos de camundongos (C50) e em células leucêmicas humanas (HL-60) (LEPLEY et al., 1996).

Os resultados encontrados confirmam os efeitos citotóxicos *in vitro* da própolis estudada em diferentes linhagens de células (tumoral e não tumoral), indicando uma clara atividade antineoplásica por inibição da proliferação do crescimento celular em diferentes concentrações.

5.7 POTENCIAL MUTAGÊNICO

A amostra da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* foi avaliada para indução de mutagenicidade pelo teste de detecção *in vitro* de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular utilizando como sistema teste a linhagem L929 de fibroblasto murino. A escolha das concentrações da amostra a serem testadas foi baseada em ensaios prévios de citotoxicidade (Teste do MTT) após 24 h de exposição utilizando como sistema teste a linhagem L929 (Tabela 10). Desta forma, a amostra foi diluída em DMSO em 3 concentrações diferentes (50, 100 e 250 µg/mL).

A amostra da própolis apresentou redução da taxa de divisão nuclear (citotoxicidade) apenas na concentração de 250 µg/mL conforme análise do Índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese ou *Cytokinesis-Block Proliferation Index* (CBPI). Da mesma forma, a própolis induziu aumento na frequência de células micronucleadas (Tabela 2) apenas na maior concentração avaliada (250 µg/mL).

Tabela 7. Análise do percentual da viabilidade celular em fibroblastos murinos L929 após exposição à amostra da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini*.

Concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	10	25	50	100	250	350	600
VC (%)	94.96	91.69	91.75	87.78	58.17	45.03	20.88

VC (%): Viabilidade celular em porcentagem, relativa ao controle negativo (DMSO).

Tabela 8. Análise da frequência de fibroblastos murinos L-929 micronucleados após exposição à amostra da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini*.

Tratamento	% CBPm
CN ^a	0.10±0.022
CP ^b	3.04±0.146*
50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0.06±0.019
100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0.09±0.022
250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0.461±0.044*

% CBPm: Frequência em percentual de células binucleadas portadoras de micronúcleo ^acontrole negativo (DMSO); ^bcontrole positivo (doxorubicina, 10 $\mu\text{g/mL}$); ^ctrês experimentos independentes em triplicata; ^derro padrão da média. * $p < 0,05$

Não existe na literatura, com exceção de alguns estudos realizados com propolis verde de *Apis mellífera*, qualquer avaliação de mutagenicidade ou até mesmo de antimutagenicidade com própolis de abelhas sem ferrão, principalmente utilizando-se este sistema-teste em. Tal falta ressalta a ineditismo deste estudo. Desta forma, as ações e efeitos do extrato da propolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* foram associados com os resultados de outros autores, que utilizaram diversos organismos e metodos, tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*.

A amostra de própolis induziu o aumento, estatisticamente significativo, no número total de micronúcleos apenas na concentração mais elevada (250 $\mu\text{g/mL}$) utilizada nos testes. Este resultado indica que a própolis só é capazes de induzir mutações cromossômicas em células animais em concentrações muito elevadas.

Avaliar o efeito tóxico de compostos ambientais e industriais, e de substâncias químicas, candidatas à novos fármacos, é um desafio cada vez mais recorrente no mundo moderno. O contato com moléculas recém descobertas, ainda sem conhecimento sobre suas atividades biológicas, pode trazer prejuízos a curto e longo prazo para a saúde humana (MASLOV et al., 2015).

Tavares et al. (2006) estudou possíveis efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do extrato etanólico de própolis verde preparado a partir de própolis in natura produzidos na região de Oliveira (estado de Minas Gerais, Brasil), uma região rica em *Baccharis dracunculifolia*. Os efeitos foram estudados a partir da avaliação do índice mitótico e no aparecimento de aberrações cromossômicas sobre células de ovário de hamster chinês (CHO). Os autores não observaram diferenças significativas no índice mitótico entre culturas tratadas com diferentes concentrações do extrato de própolis e os respectivos controles negativos e solvente, indicando que as diferentes concentrações não foram citotóxicas. Também não foram observadas diferenças significativas na frequência de aberrações cromossômicas entre as culturas tratadas com 12,5, 25 ou 50 µg/mL do extrato. Observou-se um pequeno aumento na frequência de aberrações cromossômicas significativa apenas para a concentração de 100 µg/mL. Tais resultados corroboram com os encontrados neste estudo, no qual a própolis testada só mostrou atividade mutagênica na concentração mais elevada.

Da mesma forma, Lima et al. (2005) observaram que as concentrações mais baixas de própolis reduziram o dano do DNA induzido pela 1,2-dimetilidrazina nas células do cólon do rato, enquanto a maior concentração por si só aumentou as lesões do DNA.

Roberto (2009) avaliou a atividade mutagênica de extratos etanólicos da própolis verde, coletadas na cidade de Carvalhópolis, sul do estado de Minas Gerais, Brasil. A atividade mutagênica foi realizada através do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese usando células de hepatoma de rato (HTC). A análise estatística dos resultados mostrou que os extratos etanólicos estudados não induziram a formação de micronúcleo, portanto não apresentaram atividades mutagênicas.

O autor ainda evidenciou que a própolis verde testada apresenta uma atividade antimutagênica, possuindo uma capacidade protetora após passarem por um período de incubação. A porcentagem de redução de micronúcleos, do tratamento simultâneo após período de incubação, foi de 86,67%. Além de um efeito protetor dos extratos contra os efeitos de um agente comprovadamente mutagênico (Metilmetano Sulfonato - MMS) em células de mamíferos.

Roberto (2009) também avaliou a mutagenicidade do extrato etanólico da própolis verde *Allium cepa* e verificaram que as amostras testadas não induziram mutagenicidade e foram eficientes na proteção de células meristemáticas e da geração F1 de *Allium cepa*, inibindo a clastogenicidade do Metilmetano Sulfonato.

Pereira et al. (2008) avaliou o efeito mutagênico da própolis verde brasileira do estado de Minas Gerais pelos teste de ensaio cometas e de micronúcleos, realizados nas células periféricas de ratos suíços. Considerando as doses e os resultados obtidos, a administração aguda de própolis verde produziu alguns efeitos mutagênicos nas células sanguíneas de camundongos, mostrando um aumento no dano ao DNA nas células. Da mesma forma, o número médio de eritrócitos micronucleados mostrou um aumento nas três doses testadas.

Santos (2011) avaliou o efeito da própolis brasileira procedente de Rio Grande do Sul (AF 08) em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e em células tumorais de próstata (PC3), irradiadas com ^{60}Co . Foi possível observar que a própolis não induziu qualquer efeito genotóxico nas concentrações testadas em ambas as linhagens celulares. Os dados citogenéticos obtidos, mostraram um efeito radioprotetor da própolis (5 – 100 $\mu\text{g/ml}$) na indução de dano ao DNA em ambas as linhagens celulares, irradiadas. Houve uma queda na quantidade de dano ao DNA em função da concentração de própolis. No entanto, o ensaio de citotoxicidade mostrou um efeito antiproliferativo pronunciado da própolis (50 – 400 $\mu\text{g/ml}$) em células PC3 irradiadas.

De acordo com Horn; Vargas (2008), entre vários compostos fitoquímicos, os flavonóides e os taninos são compostos que apresentam atividades mutagênicas e antimutagênicas. Da mesma forma, Tavares et al. (2006) sugerem que os flavonóides são os principais componentes responsáveis pelos efeitos mutagênicos e antimutagênicos da própolis. Os autores atribuem ao extrato de própolis, a característica de atuar como um composto com “efeito Janus”, ou seja, pode se comportar como agente genotóxico ou antigenotóxico, dependendo da condição experimental utilizada. Em seu trabalho, quando aplicado em altas concentrações (100 $\mu\text{g/mL}$), o extrato foi genotóxico, mas quando usado em baixas concentrações (12.5 $\mu\text{g/mL}$), exerceu atividades quimiopreventivas (antigenotóxica).

Uma substância que consegue prevenir ou reduzir a mutagenicidade de um agente mutagênico poder ser chamado de agente antimutagênico. No entanto, o modo de ação preventivo desta substância pode ocorrer de duas maneiras: pela inativação do mutágeno, antes do seu ataque ao DNA, ou pela inibição da fixação de uma mutação no DNA de um organismo. Desta forma, estes autores sugerem as denominações agentes “desmutagênicos” (inativam a substância) e “bio-antimutagênicos” (inibem a fixação da mutação) (KADA; SHIMOI, 1987; ROBERTO, 2009)

Baseado no teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, Roberto (2009) sugere que a ação dos extratos da própolis verde seja mais por ação desmutagênica do que bio-antimutagênica. Isto se deve aos melhores resultados obtidos pelos tratamentos realizados com pré-incubação. Desta maneira, os extratos foram capazes de inativar grande parte da potencialidade clastogênica do MMS e reduzir a taxa de indução de micronúcleos nas células HTC.

Apesar dos diversos estudos realizados quanto ao potencial antimutagênico e/ou antígenotóxico de extratos vegetais, os mecanismos de antimutagenicidade ainda não estão completamente esclarecidos ou são, até mesmo, desconhecidos. Esta ação antimutagênica pode ser resultado da atividade antioxidante ou da interferência de um ou mais compostos ativos nas vias metabólicas, onde os agentes mutagênicos atuam (RESENDE et al., 2007).

O efeito antimutagênico observado pelo extrato etanólico da propolis pode ser devido ao seu efeito antioxidante, uma vez que a ação genotóxica da doxorubicina (DXR) está relacionada à sua capacidade de produzir radicais livres (KEIZER et al., 1990), o que causa diferentes tipos de dano celular, incluindo quebras de DNA.

A atividade antioxidante da própolis e sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio foram investigadas por Simões et al. (2004), que estudaram os efeitos biológicos de diferentes extratos e frações de própolis verde. Observou-se correlação entre a atividade antioxidante e a composição química de suas frações diárias, com ênfase especial na presença de flavonoides e derivados de ácido p-coumarico. O estudo concluiu que os componentes da própolis atuam por mecanismos diferentes que sequestram espécies reativas de oxigênio.

Os flavonoides são metabolizados em vários tipos de ácidos fenólicos, muitos dos quais também são capazes de inibir a ação dos radicais livres (PIETTA, 2000). Os polifenóis possuem propriedades que incluem efeitos antioxidantes, anti-mutagênicos, antiestrogênicos, anti-cancerígenos e anti-inflamatórios que podem ser benéficos na prevenção de doenças e na proteção do genoma celular. No entanto, nem todos os polifenóis são necessariamente benéficos. Alguns podem apresentar efeitos mutagênicos e/ou pró-oxidantes, além de interferir nas vias bioquímicas essenciais, como em atividades enzimáticas das topoisomerasas e na biossíntese prostanóide (FERGUSON, 2001).

6. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que o extrato hidroalcoólico da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* apresentou em sua composição saponinas, compostos fenólicos, flavonoides agliconas, além de quercetina e canferol. A própolis destacou-se pelo seu elevado potencial antioxidante e antineoplásico, inibindo em doses pequenas a proliferação de células cancerígenas; além do baixo potencial mutagênico, promovendo alteração apenas na concentração mais elevada.

A própolis caracterizou-se pelo seu elevado potencial antioxidante e cicatrizante, apresentando influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais; além de uma promissora atividade antimicrobiana sobre fungo, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.J.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chem.**101:1400–9. 2007.

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n.7, p.1057-1059, 2003.

AKKOL, E.K.; KOCA, U.; PEŞİN, I.; YILMAZER, D.; TOKER, G.; YEŞİLADA, E. Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb by *in vivo* models. **J. Ethnopharmacol.** 124(1):137-141. 2009.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 34(1):37-41; 2013.

ASHRY, E. S.; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n.1, p. 31-39, 2012.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-9, 2008.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie.** 31(1):3-15. 2000.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p.239-246, 2000.

BASTOS, E. M. A. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.

BERRETTA A.A., NASCIMENTO A.P., BUENO P.C.P., VAZ M.M.O.L.L. & MARCHETTI J.M. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **Int. J. Biol. Sci.** 8(4):512-521. 2012.

BONAMIGO, T.; CAMPOS, J.F.; ALFREDO, T.M. *et al.* Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v.2017, n.2017, p.1-12, 2017.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study Among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 5195, 2004.

BRANDE-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical Method to evaluate antioxidant activity. **Lebenson Wiss Technol.** 28: 25-30, 1995.

BRASIL. **Portaria nº 3.916/MS/GM, de 30 de outubro de 1998.** Brasília, 1998.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001.** Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

BRUENING, H. **Abelha jandaíra.** 2 ed. Mossoró: Coleção Mossoroense, 1990.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CÁMARA, J. Q. et al. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 4, n. 1, 2004.

CAMPOS, V. A. C. et al. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PROPOLIS PRODUCED BY *Frieseomelitta varia*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1043-1049, nov./dez., 2011.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, 65, 374–380, 2014.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; ROCHA, P. S.; DAMIÃO, M. J.; BALESTIERI, J. B. P.; CARDOSO, C. A. L.; PAREDES-GAMERO, E. J.; ESTEVINHO, L. M.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

CARDINAULT, N.; CAYEUX, M. O.; SERT, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 6ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2007.

CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C.; SCARCELLI, E.; MANHANI, M.R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.** 16(3):521-526. 2014.

CASTRO, P. A.; SAVOLDI, M.; BONATTO, D.; BARROS, M. H.; GOLDMAN, M. H.; BERRETTA, A.A.; GOLDMAN G. H. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**. vol. 10, no. 3, 398–411, 2011.

CASTRO, M. S. de. **Manejo Sustentado e Preservação de Abelhas sem Ferrão em Pequenas Propriedades do Estado da Bahia**. Relatório final de projeto pesquisa meta 10, apresentado ao PRONAF (Programa Nacional de Apoio a Agricultura Familiar). 2005.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; LIN, J. K. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. **Cancer Letters**, v.245, n.1-2, p.218-231, 2007.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S25**. 25^a ed. Informational Supplement, Organisms by Clinical Laboratories. 2015.

COSTA, L. Nutrição de operárias de uruçú-amarela, *Melipona flavolineata* Friese, 1900 (Apidae: Meliponina). **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal do Pará Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2008.

CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 13, p. 23, 2013.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**. 26(5):343-356, 2005.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB. A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 38 (2): 99-107. 2011.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DIAZ, J.C.Q. et al. Empleo de la tintura de propóleo al 5 em la cura de heridas sépticas faciales. **Rev. Cuva Estomatol**. V. 34, n1, p. 347-351, 1997.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of Mutans Streptococci. **Biol. Pharm. Bull**. 26(4):527-531. 2003.

FABRIS, S. et al. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and brazilians propolis. **Pharmacology and Pharmacy**, v. 4, p. 46-51, 2013.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81 – 95, 2000.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 eta and TNF-alpha. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 709-715, 2012.

FREIRE, M. C. G. S. **Estudo histológico comparativo entre laser de baixa potência, própolis e associação de ambos sobre lesões de pele de *Rattus norvegicus albinus***. 105f. Dissertação (Mestrado em Saúde). Programa de Pós-Graduação em Saúde, Universidade José do Rosário Vellano. 2010.

FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 206-212, 2007.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. **Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective**. Mutation Research, v. 455, p. 21-28, 2000.

GONSALES, G. Z. et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

GROVE, D.C.; RANDALL, W.A. **Assay methods of antibiotic: a laboratory manual (antibiotics monographs 02)**. Medical Encyclopedia Inc., New York. 238p. 1955.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 33, no. 7, pp. 601–617, 1995.

HORN, R.; VARGAS, V. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 22, pp. 1043-1049, 2008.

ISHIHARA, M.; NAOI, K.; HASHITA, M.; ITOH, Y.; SUZUI, M. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v.22, n.2, p.349-354, 2009.

ISHII, J. B.; FREITAS, J. C.; ARIAS, M. V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesq. Vet. Bras.** 31(6):533-537, junho 2011

IORDANOU, P.; LYKOUKDIS, E. G.; ATHANASIOU, A.; KONIARIS, E.; PAPADEVANGELOU, M.; FATSEA, T.; BELLOU, P. Effect of visible and infrared polarized light on the healing process of fullthickness skin wounds: an experimental study. **Photomed. Laser Surg.** 27(2):261-267. 2009.

JEON, H., KIM, H., CHOI, D., KIM, D., PARK, S.Y., KIM, Y.J., KIM, Y.M., JUNG, Y. Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. **Mol. Pharmacol.** 71: 1676-1684. 2007.

JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**. v.36, n.1, jan-fev, 2006.

JUNIOR, W. B. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens - theirs modes of action. **Bioassays**. 7(3): 113-6. 1987.

KE, N; WANG, X; XU, X; ABASSI, Y. A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. **Methods Mol Biol**. 2011; 740:33-43.

KEIZER, HG; PINEDO, HM; SCHUURHUIS, GJ; JOENJE, H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacol Ther.**;47(2):219-31. 1990.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha uruçu: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte/MG: Fundação Acangaú, 1996..

KERR, W. E. A importância da meliponicultura para o país. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 1, p. 42-44, 1997.

LEPLEY, D. M.; LI, B., BIRT, D. F.; PELLING, J. C. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*, v.17, n.11, p.2367-2375, 1996.

LIBERIO, S. A.; PEREIRA, A. L. A; DUTRA, R. P.; Reis, A. S.; ARAÚJO, M. J. A. M.; MATTAR, N. S.; SILVA, L. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. I. F.; GUERRA, R. N. M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 11:108, 2011.

LIMA, R.O.A., BAZO, A.P., SAID, R.A., SFORCIN, J.M., BANKOVA, V., DARROS, B.R., SALVADORI, D.M.F. Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 45, 8–16. 2005

MANS, D. R., DA ROCHA, A. B., SCHWARTSMANN, G.; Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist**, v.5, 185-98, 2000.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** 26, 83–99. 1995.

MARQUELE, F. D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 455-462, 2005.

MASLOV, A.Y.; TINTAYA, W.Q; GORBACHEVA, T. *et al.* High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests?. *Mutat. Res.*, v.776, n.1, p.1-8, 2015.

MATOS, F. J. D. A. **Introdução da fitoquímica experimental**. Fortaleza: edição UFC, 2009.

MELO J.G., ARAÚJO T.A.S., CASTRO V.T.N.A. *et al.* Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. *Molecules*, v.15, n.12, p.8534-8542, 2010.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15: 127-130. 2001.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D. Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 3, n. 4, p. 479-495, 2011.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food. Chem.* 57, 1655–1666, 2009

MORAES, C. S. *et al.* Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 539-543, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, Vol. 21, No 2. 2010.

NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

NUNES, F. O. **Distribuição Potencial das Espécies de Abelhas Sem Ferrão do Gênero Frieseomelitta (Meliponini) na Bahia, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Modelagem em Ciências da Terra e do Ambiente) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

OLIVEIRA, F. F. **Revisão do Gênero Frieseomelitta Von Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), com Notas Bionômicas de Algumas Espécies**. 327 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2003.

OLIVEIRA, D.M; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*. 34 (6): 1051-1056. 2011a.

OLIVEIRA, F. F., URBAN, D. ENGEL, M. S. The Identity of the Neotropical Stingless Bee *Frieseomelitta meadewaldoi* (Cockerell, 1915) (Hymenoptera, Apidae). *Zookeys*. v.111, p. 19 – 31, 2011b.

OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

OSTROSKY, N. ET AL. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 301 – 307, 2008.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc Tecnol Aliment**.18(3):313-8, 1998.

PAULINO, N. et al. Antiinflammatory effects of a bioavailable compound, artemillin C, in Brazilian propolis. **Eur. J. Pharmacol**. V587, p. 296-301, 2008.

PEREIRA, A. D. et al. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2580-2584, 2008.

PERUCHI, C. M.S.; SILVA, E. B.; ANDRADE, R. A.; FRANCO, S. L.; RAMATHO, L. T. O. Efecto del propóleo en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Rev Fac Odontol Univ Chile**.19(2):23-34, 2001.

PESSOLATO A.G.T., MARTINS D.S., AMBRÓSIO C.E., MANÇANARES C.A.F. & CARVALHO A.F. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns** 37(70):1192-1201. 2011.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod** 63: 1035-1042. 2000.

PINHEIRO, M.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, SE. 71f. 2009.

PRATA, M.B.; HADDAD, C.M.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M. J.; MOURA, L. A. R.; TRABULSI, L.R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta Cir. Bras**. 3(2):43-48. 1988.

RAMOS, A. F. N.; MIRANDA, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v. 13, n 14, p. 697-710, 2007.

RESENDE, F.; ALVES, J.; MUNARI, C.; SENEDESE, J.; SOUSA, J.; BASTOS, J.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, pp. 112-118, 2007.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAW, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Burjassot, v.2, p.127-149, 1988.

ROBERTO, M. M. **Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato Etanólico de Própolis Verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por Meio de Sistema-Teste de *Allium cepa* e Células de Mamíferos (HTC)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2009.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

ROCHA, G. G. G. **Atividade citotóxica das frações, subfrações eannonacina obtidas de sementes de *Annona muricata* L.** 2017. 91f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – CE, 2017.

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Toxicology in Vitro, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

SALATINO, A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Products Report**, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.

SALGUEIRO F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Quim. Nova**, Vol. 39, No. 10, 1192-1199, 2016.

SAMPAIO, J. A.; CASTRO, M. S. de; SILVA, F. O. da. Uso da Cera de Abelhas pelos Índios Pankararé no Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 67, p. 3 - 12, 2009.

SANTOS, M. J.; VIANNA, L. A. C.; GAMBA, M.A. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paul Enferm.** 20(2):199-204, 2007.

SANTOS, G.S. **Avaliação do efeito radiomodificador da própolis em células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) e em células tumorais de próstata (PC3), irradiadas com CO-60**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, SP. 65f. 2011.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciênc. Rural**. 37(3): 803-808. 2007.

SAWAYA, A. C.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 1-10, 2011.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; JANIN, G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1324-1329, 1989.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-333, 2006.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 6ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2007.

SEHN, E. et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 115-120, 2009.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHENG, J. et al. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 249-253, 2007.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **J Nat Prod**. 61: 1053 – 1071, 1998

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis:UFRGS: 821p. 2004.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, n. 6, p. 507-511, 2006.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza Online**, Santa Teresa, v. 10, n. 3, p. 146-152, 2012.

SILVA, T.M.S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaí'ra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis** 29 (2013) 10–18, 2013.

SILVA J.B., COSTA K.M.F.M., COELHO W.A.C., PAIVA K.A.R., COSTA G.A.V., SALATINO A., FREITAS C.I.A. E BATISTA J.S. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia* aff. *Flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras**. 36(9):874-880. 2016.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A. R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, MG, Min. Meio Ambiente/Fund. Araucaria. 2002.

SILVEIRA L.M.S., OLEA R.S.G., MESQUITA J.S., CRUZ A.L.N. & MENDES J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** 90(2): 124-128. 2009.

SOUZA, B. D. A. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004.

SOUZA, B. D. A. et al. **Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

TAVARES, D.; BARCELOS, G.; SILVA, L. *et al.* Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicol. in Vitro**, v.20, n.7, p.1154-1158, 2006.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (Eds.). **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 47-69. 1991.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 320 p. 1984.


WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation - study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 237-243, 2004.

ZANELLA, F. C. V. Apifauna da caatinga (NE do Brasil): biogeografia histórica, incluindo um estudo sobre a sistemática, filogenia e distribuição das espécies de *Caenonomada ashmead*, 1899 e *Centris (paracentris) cameron*, 1903 (Hymenoptera, apoidea, apidae). 1999. 162f. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo, 1999.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. **Ecologia e conservação da Caatinga**, p. 75-134, 2003.

ANEXO

ANEXO A – Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte

 **Governo do Estado do Rio Grande do Norte**
Secretaria de Estado da Educação e da Cultura - SEEC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA
BR 110, KM 48 – Rua Prof. Antonio Campos, s/n - Costa e Silva – Fone: (84)3318 - 2596
Home Page: <http://www.uern.br> – e-mail: ceua@uem.br – CEP: 59610-090- Mossoró -RN

PARECER CONSUBSTANCIADO CEEA/UERN Nº 001/15

Nº PROTOCOLO (CEEA)	001/15
Título do Projeto	Atividades biológicas, ação antioxidante e quantificação dos teores de fenóis totais e flavonoides dos própolis das abelhas amarela (<i>Frasiomelitta varia</i>), cupira (<i>Partomona cupira</i>), jandaira (<i>Melipona subnitida</i>) e mosquito <i>Plebeia aff. flavocincta</i> (Cockerell, 1912).

1 – RESUMO (Média de 250 palavras) Elaborado pelo(a) relator(a)

Própolis é um material resinoso que apresenta diversas propriedades sendo produzido por diferentes espécies de abelhas. Pouco se conhece da constituição química e atividades biológicas das própolis das abelhas amarela (*Frasiomelitta varia*), cupira (*Partomona cupira*), jandaira (*Melipona subnitida*) e mosquito *Plebeia aff. flavocincta* (Cockerell, 1912), podendo essas representarem uma alternativa terapêutica para várias doenças. Neste estudo será realizada uma análise da composição química e avaliação das atividades biológicas das própolis produzida por abelhas sem ferrão. Para avaliar a ação antibacteriana *in vitro* será utilizado o método de difusão em agar, na atividade antioxidante o método sequestrador de radicais livres DPPH, na ação cicatrizante serão feitos estudos em ratos, sendo os mesmos submetidos a lesão circular em cirurgia única de 1x1cm de diâmetro na região dorso-lombar onde receberão a aplicação imediata do creme a base de própolis após cirurgia, as aplicações serão diárias com intervalo de 24 horas, durante os períodos experimentais de 3,7,14 e 21 dias, posteriormente aspectos histológicos serão avaliados. Serão 5 tratamentos (um para cada própolis testada e um controle), cada um com 4 grupos de 6 animais cada, num total de 120 animais. Serão utilizados ratos mantidos no biotério da UERN em condições padronizadas. Detalhamento experimental. para a realização das feridas cutâneas, os animais serão anestesiados através da técnica dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (10mg kg-1) e cloridrato de cetamina (50mg kg-1), administrado por via intramuscular. Após anestesia, será feitas tricotomia e antisepsia do local cirúrgico com iodopovidona 1%. Com auxílio de um molde ($\varnothing = 1,0$ cm de diâmetro), a pele da região dorsolombar será divulsionada, expondo a fáscia muscular. O creme será aplicado imediatamente após cirurgia e, posteriormente, uma vez ao dia, nos três primeiros dias será utilizado analgésico (meloxicam 2 mg/kg). As lesões serão medidas diariamente, em seu diâmetro maior e menor, empregando-se paquímetro. No 3º, 7º, 14º e 21º dia pós-operatório, será realizado eutanásia dos respectivos grupos de animais com uma superdose de cloridrato de xilazina (30mg/mL-1) e cloridrato de cetamina (150mg/mL-1) administrado por via intramuscular, associado ao cloreto de potássio (3ml) intracardiaco. Será retirado fragmentos de 1,5 X 1,5cm da pele, abrangendo a área da lesão e a pele íntegra, os quais serão fixados em formalina a 10%. Os tecidos fixados serão incluídos em parafina, cortados a uma espessura de 5 micrômetros e corados pela HE. Os cortes histológicos serão examinados para quantificação de células polimorfonucleares, macrófagos, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas,

Comissão de Ética em Experimentação Animal- CEEA/UERN Home Page: www.uern.br e-mail: ceua@uern.br

1/2

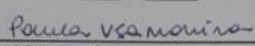
2 – ENTEDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O projeto apresentado pode ser executado, a partir da liberação deste parecer. Após o período de realização da pesquisa, o pesquisador deverá preparar um relatório final e em seguida encaminhá-lo a este CEEA.

3- PARECER

Protocolo de Pesquisa Aprovado.

Mossoró, 09 de 09 de 2015.


Paula Vivianne Souza de Queiroz Moreira
Vice-coordenadora do CEEA/UERN