



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JARDEL BEZERRA DA SILVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA POR ABELHA (*Apis mellifera*) NO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

**MOSSORÓ-RN
2018**

JARDEL BEZERRA DA SILVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA POR ABELHA (*Apis mellifera*) NO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

Tese apresentada à 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

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Iberê Alves
Freitas

**MOSSORÓ-RN
2018**

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei n° 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei n° 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B574p BEZERRA DA SILVA , JARDEL .
POTENCIAL HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA
PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA POR ABELHA (*Apis
mellifera*) NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL. /
JARDEL BEZERRA DA SILVA . - 2018.
86 f. : il.

Orientador: JAEL SOARES BATISTA .
Coorientador: Carlos Iberê Alves Freitas.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-Árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2018.

1. Compostos fenólicos. 2. Genoproteção. 3.
Hepatoproteção. 4. Propriedade química . 5.
Potencial antioxidante. I. SOARES BATISTA , JAEL
, orient. II. Iberê Alves Freitas, Carlos ,
coorient. II. Título.

JARDEL BEZERRA DA SILVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA POR ABELHA (*Apis mellifera*) NO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

Tese apresentada à 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: 18/12/ 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr Jael Soares Batista (UFERSA)
Presidente

Prof^o Dr. Carlos Iberê Alves Freitas (UFERSA)
Membro examinador

Prof^o Dr. Wirton Peixoto Costa (UFERSA)
Membro examinador

Prof. Dr. Dejair Message (UFCEG)
Membro examinador

Prof.^a Dra. Juliana Fortes Vilarinho Braga (UFERSA)
Membro examinador

JARDEL BEZERRA DA SILVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA POR ABELHA (*Apis mellifera*) NO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

EQUIPE ENVOLVIDA

DOUTORANDO: Jardel Bezerra da Silva **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Sanidade animal
ENDEREÇO: Av. Professor Antônio Campos, 40 **CPF:** 019.507.743-17
E.MAIL: jardelbezerra@bol.com.br **TELEFONE:** (84) 99145-4549

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

COORIENTADOR: Carlos Iberê Alves Freitas **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Sanidade animal
ENDEREÇO: BR 110 Km 47 **CPF:** 774.420.327-53
E.MAIL: iberefreitas@bol.com.br **TELEFONE:** (84) 98868-4445

**MOSSORÓ-RN
2018**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JARDEL BEZERRA DA SILVA Iniciou em março de 2010 o curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), no qual efetivamente exerceu atividades de iniciação científica, ensino e extensão no decorrer de toda sua graduação como bolsista no Programa de Iniciação Científica Institucional (PICI), Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC) e Programa de Educação Tutorial-PET Produção Animal. Obteve o título de Médico Veterinário em outubro de 2013. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, na modalidade Mestrado, pela (UFERSA) em março de 2014, com a orientação do professor doutor Jael Soares Batista, desenvolveu sua pesquisa voltada a quantificação de fenóis, flavonóides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis produzida pela abelha *Plebeia* aff. *flavocincta* no semiárido do Rio Grande do Norte. No transcurso do mestrado foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), realizou estágio em docência nas disciplinas de Bioética e Medicina Legal, Patologia Geral e Patologia Veterinária nas turmas do curso de Medicina Veterinária da (UFERSA). Estagiou no laboratório de fitoquímica da Universidade de São Paulo (USP) no período de novembro a dezembro de 2014. Concluiu Mestrado em 2016. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, na modalidade Doutorado, pela (UFERSA) em 2016, com a orientação do professor doutor Jael Soares Batista, desenvolveu pesquisas sobre avaliação do potencial hepatoprotetor e genoprotetor da própolis vermelha produzida por abelha (*Apis mellifera*) no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me proporcionado até os dias de hoje muita força de vontade, perseverança, dedicação e saúde. Elementos esses indispensáveis para o sucesso em sobressair obstáculos impostos pela vida e alcançar os meus objetivos de forma satisfatória.

Aos meus pais, por terem oferecido desde minha infância educação e os ensinamentos básicos que serviram de pré-requisito para a conclusão de mais uma importante etapa na minha vida.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por todos os auxílios e oportunidades ofertadas.

Aos professores do programa que contribuíram na transmissão de conhecimentos e efetivos ensinamentos, em especial aos professores Jael Soares, Carlos Iberê e Jean Berg.

A todos os meus professores orientadores em minha vida acadêmica, em destaque a professora doutora Débora Andreia Façanha de Moraes, doutor Luiz Januário Magalhães Aroeira, doutora Jesane Alves de Lucena, em especial ao doutor Jael Soares Batista que nos últimos anos esteve sempre contribuindo com total dedicação para a evolução de nossas pesquisas.

As instituições de fomento à pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de apoio à pesquisa do Rio Grande do Norte (FAPERN), pelos auxílios financeiros e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA.

A todos meus familiares e amigos que torceram pela conclusão desta importante etapa da minha vida.

Aos amigos do Bizú de irmão Diego, Rubim, Breno, Alan, Leonardo e Pedro por vivenciarem e concluírem comigo um curso de formação para a vida.

Aos colegas do programa pelo excelente convívio, os quais compartilharam preocupações e vitórias, e me ajudaram no decorrer do doutorado, em especial Kizzy, Kaliane, Vitor, Geysa, Rayr, Manuela e Gerard.

Ao Marcos da citoclínica, Erinaldo e Nayna do laboratório de patologia clínica do HOVET, Felipe da BiotecCell. Todos pelo empenho na realização de importantes fases dos experimentos.

A todos os doutores que contribuíram para meu aprendizado durante o cumprimento das disciplinas.

A todos os componentes da banca avaliadora por terem aceitado o convite para participar da minha apresentação e contribuir com o enriquecimento desta tese. A todos os amigos presentes nesse momento de conclusão de mais uma importante etapa da minha vida.

A todos que não foram citados, mas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

POTENCIAL HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA POR ABELHA (*Apis mellifera*) NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL. **SILVA, Jardel Bezerra da.** Potencial hepatoprotetor e genoprotetor da própolis vermelha produzida por abelha (*Apis mellifera*) no Rio Grande do Norte, Brasil. **2018. 86 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2018.**

RESUMO: Atualmente um dos problemas de saúde que cada vez mais ganha destaque em escala mundial são as patologias hepáticas. Este fator contribui para que a indústria farmacêutica desenvolva novas drogas hepatoprotetoras e que sejam realizadas pesquisas testando produtos naturais que possuam potencial hepatoprotetor e que atuem deprimindo o estresse oxidativo e estimulando a proteção contra danos ao DNA. No Brasil, realiza-se várias pesquisas sobre a atividade hepatoprotetora e genoprotetora de diferentes própolis de *Apis mellifera*, entretanto não existem estudos com a própolis vermelha produzida no semiárido do Rio Grande do Norte. Sendo assim, a presente pesquisa teve por objetivos avaliar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha produzida pela abelha *Apis mellifera*, obtido junto a apicultores do semiárido do Rio Grande do Norte. Foram determinadas a composição química e atividade antioxidante da própolis da referida abelha, o potencial hepatoprotetor, através da indução da cirrose experimental em ratos; além da avaliação *in vitro* do potencial antineoplásico da própolis em linhagem de células de carcinoma hepático humano (HepG2), e também do potencial genoprotetor em linhagem de células normais (L929), expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As amostras apresentaram teores de fenóis totais de 74,92±0,51 a 141,07±1,27 mg GAE/100g, flavonoides de 2,42± 0,17 a 8,35±0,28 mg QE/100g e atividade antioxidante IC₅₀ de 129,10±0,49 a 54,14±1,50 µg/ml. O extrato da própolis não apresentou citotoxicidade em células normais e apresentou efeito antígeno-tóxico ou genoprotetor, com percentuais de redução de genotoxicidade de 90,17% ±3,01; 71,15%±2,64 e 43,07%±2,64 respectivamente, para as concentrações de 500, 250 e 100µl/ml do extrato. Os resultados dos níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão hepática alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), indicaram que o extrato hidroetanólico da própolis não causou toxicidade hepática e exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela tioacetamida (TAA). Através da avaliação macroscópica e histológica dos fígados foi possível também sugerir que o extrato da própolis analisado exerceu efeito hepatoprotetor na gravidade da cirrose, uma vez que nos fígados dos animais do grupo tratados foi possível constatar que os nódulos regenerativos característicos da cirrose foram menores e mais discretos, quando comparados aos dos animais do grupo cirrótico. Da mesma forma, houve redução significativa do percentual de colágeno do grupo tratado em relação ao grupo cirrótico, demonstrando o efeito hepatoprotetor da própolis, o qual foi capaz de reduzir o dano aos hepatócitos, embora não tenha sido verificada diferença estatística do peso dos fígados nos referidos grupos, a análise estereológica demonstrou que houve diferença significativa no percentual de hepatócitos e de colágenos entre esses grupos. Assim, conclui-se que o extrato da própolis vermelha apresenta composição química variada e promissoras atividades farmacológicas, destacando-se a antioxidante, não citotóxica, genoprotetora e hepatoprotetora, visto que exerceu efeito hepatoprotetor mediante a lesão hepática induzida pela TAA.

Palavras Chaves: **Própolis vermelha, composição química, atividade antioxidante, hepatoproteção**

POTENTIAL HEPATOPROTECTIVE AND GENOPROTECTIVE OF RED PROPOLIS PRODUCED BY BEES (*Apis mellifera*) IN RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL. **SILVA, Jardel Bezerra da.** Potential hepatoprotective and genoprotective of the red propolis produced by bee (*Apis mellifera*) in Rio Grande do Norte, Brazil. **2018.** 86 f. **Thesis (Doctorate in Animal Science) - Graduate Program in Animal Science, Federal Rural Semi-Arid University (UFERSA), Mossoró - RN, Brazil, 2018.**

ABSTRACT: At present, one of the health problems that is increasingly prominent worldwide is liver disease. This factor contributes to the pharmaceutical industry developing new hepatoprotective drugs and conducting research testing natural products that have potential hepatoprotective and that act to depress oxidative stress and stimulating protection against DNA damage. In Brazil, several studies on the hepatoprotective and genoprotective activity of different propolis of *Apis mellifera* are carried out, however there are no studies with the red propolis produced in the semi-arid region of Rio Grande do Norte. Therefore, the present research had the objective of evaluating the hepatoprotective effect of the hydroethanolic extract of the red propolis produced by *Apis mellifera* bee, obtained from beekeepers in the semi - arid region of Rio Grande do Norte. The chemical composition and antioxidant activity of the bee propolis, the hepatoprotective potential, through the induction of experimental cirrhosis in rats were determined; in addition to the in vitro evaluation of the antineoplastic potential of propolis in human hepatic carcinoma cell line (HepG2), and also the potential genotype in normal cell line (L929), exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂). The samples had total phenol contents from 74.92 ± 0.51 to 141.07 ± 1.27 mg GAE / 100g, flavonoids from 2.42 ± 0.17 to 8.35 ± 0.28 mg QE / 100g and antioxidant activity IC₅₀ of 129.10 ± 0.49 to 54.14 ± 1.50 µg / ml. The propolis extract did not present cytotoxicity in normal cells and presented antigenotoxic or genoprotective effect, with genotoxicity reduction percentages of 90.17% ± 3.01; 71.15% ± 2.64 and 43.07% ± 2.64, respectively, for the concentrations of 500, 250 and 100 µl / ml of the extract. The results of serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) hepatic enzymes indicated that the hydroethanolic extract of propolis did not cause liver toxicity and exerted a hepatoprotective effect against hepatic damage induced by thioacetamide (TAA). Through the macroscopic and histological evaluation of livers, it was also possible to suggest that the extract of the propolis analyzed exerted a hepatoprotective effect on the severity of cirrhosis, since in the livers of the animals of the treated group it was possible to verify that the

regenerative nodules characteristic of cirrhosis were smaller and more discrete, when compared to the animals in the cirrhotic group. Likewise, there was a significant reduction in the percentage of collagen in the treated group compared to the cirrhotic group, demonstrating the hepatoprotective effect of propolis, which was able to reduce damage to hepatocytes, although no statistical difference was observed in livers weight in the stereological analysis showed that there was a significant difference in the percentage of hepatocytes and collagens among these groups. Thus, it is concluded that the extract of red propolis presents a varied chemical composition and promising pharmacological activities, being outstanding the antioxidant, non-cytotoxic, genoprotective and hepatoprotective, since it exerted a hepatoprotective effect through the hepatic lesion induced by TAA.

Key words: Red propolis, chemical composition, antioxidant activity, hepatoprotection

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Amostra de própolis vermelha produzida por abelhas *Apis mellifera*, obtida no Rio Grande do Norte, Brasil..... 42
- Figura 1 Aspecto macroscópico dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e G4 (tratados com TAA). Nota-se nos G1 e G2 fígados com aspecto morfológico normal, no G3 fígado cirrótico com pequenos nódulos regenerativos e nivelados com a superfície e no G4 fígado cirrótico com grandes nódulos regenerativos na superfície..... 72
- Figura 2 Fotomicrografias dos cortes histológico dos fígados de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina. (A) Grupos experimentais G1 (controle), (B) G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha) e corados pelo método de tricrômico de Gomori (C) G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e (D) G4 (tratados com TAA). Nota-se nos G1 e G2 fígados com aspecto histológico normal, no G3, nódulos regenerativos circundados por finos septos de tecido conjuntivo e no G4 nódulos regenerativos circundados por espessos septos de tecido conjuntivo fibroso..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média ± desvio-padrão dos teores de fenois, flavonoides totais e atividade antioxidante de quatro amostras de própolis vermelha de <i>Apis mellifera</i> obtidas no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.....	47
Tabela 2.	Média ± desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, após exposição das células hepáticas (hepatócitos ZF-L), por 02h em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e a água destilada estéril.....	49
Tabela 3.	Média ± desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em linhagem de hepatócitos ZF-L, co-tratadas com três concentrações de amostras de própolis e peróxido de hidrogênio.....	49
Tabela 1.	Média ± desvio-padrão dos teores de fenois, flavonoides totais e atividade antioxidante de quatro amostras de extrato hidroetanólico da própolis vermelha obtidas no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.....	67
Tabela 2.	Média ± desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, após exposição das células hepáticas (hepatócitos ZF-L), por 2h em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e a água destilada estéril.....	69
Tabela 3.	Média ± desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em linhagem de hepatócitos ZF-L, co-tratadas com três concentrações de amostras de própolis e peróxido de hidrogênio.....	69
Tabela 4.	Valores de média ± desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos, em ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA), G4 (tratados com TAA) e valores de referência.....	71
Tabela 5.	Valores de média ± desvio padrão do peso dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e G4 (tratados com TAA).....	73
Tabela 6.	Valores de média ± desvio padrão dos parâmetros estereológicos dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e G4 (tratados com TAA).....	76
Tabela 7.	Valores da concentração inibitória (IC ₅₀) promovidos pelo extrato hidroetanólico da própolis vermelha produzida pela abelha (<i>Apis mellifera</i>) e quimioterápico doxorrubicina frente às linhagens de células L929 e HepG2 pelo ensaio MTT após 72 horas de exposição.....	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
	2.1GERAL.....	18
	2.2 ESPECÍFICO	18
CAPITULO I		
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
	3.1 PROPOLIS VERMELHA.....	19
	3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	21
	3.3 FÍGADO: CONSIDERAÇÕES SOBRE FUNÇÕES E LESÕES HEPÁTICAS.	24
	3.4 CIRROSE HEPÁTICA.....	25
	3.5 CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	26
	3.6 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE CIRROSE HEPÁTICA.	27
	3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
	3.8 CITOTOXIDADE.....	30
	3.9 GENOTOXIDADE.....	32
CAPITULO II		
4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E GENOPROTETORA DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA PELA ABELHA <i>Apis mellifera</i> NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL	39
CAPITULO III		
5	POTENCIAL HEPATOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA PELA ABELHA <i>Apis mellifera</i> NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO 002/18 CEEA/UERN	84

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural que apresenta diversas ações biológicas, sendo produzida e armazenada pelas abelhas na colmeia, tendo eficácia não somente nesta, como também na terapêutica e ensaios *in vitro* (SOLTANI et al., 2017). Na colmeia, as abelhas utilizam a própolis para vedar aberturas, construir estruturas de proteção, sendo ainda observado o seu uso para embalsamar insetos intrusos daninhos, na prevenção da decomposição e da proliferação de microrganismos que possam infectar a colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997; BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000; ZUNINI et al., 2010; CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012).

In vitro inúmeras propriedades já foram testadas, sendo observado bons resultados. Inicialmente a própolis foi utilizada para combater agentes patogênicos, e devido sua ação despertou grande interesse em pesquisas com a finalidade de constatar outros importantes efeitos terapêuticos, seu uso demonstrou relevante desenvolvimento da medicina natural humana e veterinária, devido suas propriedades (SILVA et. al., 2015; GOMES et al., 2016).

Nos últimos anos, pesquisas tem demonstrado que as propriedades biológicas da própolis estão diretamente relacionadas com sua composição química, que é determinada pelas substâncias provenientes da vegetação visitada pelas abelhas, em conjunto com secreções salivares das abelhas, cera e pólen (FREITAS et al., 2008; LUSTOSA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2016), apresentam propriedades antivirais (YILDIRIM et al., 2016), antifúngicas (PORTILHO et al., 2013), anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladoras (FISCHER et al., 2008).

A origem dos compostos terpenóides e aromáticos, os quais são encontrados na própolis, apresentam relevante interesse biológico, apresentando variação de acordo com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas (SAWAYA, CUNHA e MARCUCCI, 2011). A própolis vermelha é produzida a partir da planta leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como “rabo-de-bugio”. A própolis vermelha apresenta em sua composição diversos compostos, dentre os quais podemos destacar os flavonóides e isoflavana, que conferem inúmeras propriedades biológicas de grande interesse para o combate e prevenção de uma série de doenças (LI et al., 2008).

Entre os maiores problemas de saúde na ordem mundial, podemos dar

destaque as patologias hepáticas, que estimulam diariamente a busca pela indústria farmacêutica a desenvolver novas drogas hepatoprotetoras com baixo preço de mercado e comprovada eficácia (SPIRA et al., 2002; ZHANG et al., 2008). Sendo assim, cresce o interesse por estudos relacionados ao efeito hepatoprotetor de produtos naturais (KUMAZAWA et al., 2004), pois, segundo Miranda-Vilela et al. (2008) antioxidantes naturais podem diminuir o estresse oxidativo e consequentemente promover proteção contra danos no DNA.

Dentre os diversos compostos químicos presentes na própolis vermelha, os flavonoides e os ácidos fenólicos se destacam por atuarem em diversos processos fisiológicos. No Brasil e em vários países, as atividades farmacológicas e composição química da própolis tem sido foco de investigação (LUSTOSA et al., 2008; BARTH et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011), com crescente interesse pelas inúmeras propriedades terapêuticas. Em específico a própolis vermelha apresenta em sua composição principalmente flavonas e isoflavonoides, álcoois triterpênicos, derivados de fenilpropeno (TRUSHEVA et al., 2006), chalconas (PICCINELLI et al., 2011) e benzofenonas polipreniladas (LÓPEZ et al., 2014; PICCINELLI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006).

Para a avaliação farmacognóstica e propriedades biológicas que a própolis venha apresentar, estudos tem usado extratos etanólicos, hidroetanólicos e aquosos (DUTRA et al., 2008; SOUZA et al., 2013). Em pesquisas com finalidade de verificar o efeito hepatoprotetor de produtos naturais, tem utilizado um modelo de cirrose hepática induzida em ratos Wistar. Observa-se, neste caso, nódulos regenerativos proeminentes e o padrão histológico mais próximo ao da cirrose micronodular humana e mimetizam, em vários graus, os processos patológicos (TRENNER; WARING, 1983; FAN et al., 2007).

No Brasil, realizam-se várias pesquisas sobre o efeito protetor da própolis de *Apis mellifera* contra danos quimicamente induzidos no DNA e atividade hepatoprotetora em nove diferentes própolis provenientes de Minas Gerais e São Paulo, sendo o semiárido da região nordeste brasileira pouco estudado (CAMPELLO et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; PARK et al., 2004; ALMEIDA, 2009). Tendo em vista a importância de se pesquisar amostras de própolis vermelha em áreas que nunca foram estudadas e considerando que a composição da própolis vermelha depende da vegetação, clima da área e espécie de abelha, faz-se necessário a caracterizar as amostras de própolis vermelha coletadas no estado do Rio Grande do

Norte (RN), identificando a atividade antioxidante e propriedades biológicas assim como seus efeitos hepatoprotetor, citotóxico e genoprotetor.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. C. **Efeito protetor da própolis contra danos quimicamente induzidos no DNA**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – FMCB, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- ARAÚJO et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**.v. 46(1) 2016: 61 - 68
- 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. 2, p. 239-246, 2000.
- BARTH, O. M.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do Rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico**, v. 19, n. 1, p. 277-290, 2009.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.
- CAMPELLO, F. B. et al. Diagnóstico florestal da região nordeste, Natal, n. 2, maio. 1999. Boletim técnico.
- CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNES-SILVA, C. G. Threats to the Stingless Bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. In: Florio, R. M. Em Bees: Biology, Threats and Colonies. New York, **Nova Science Publishers**, 2012. p. 147-168.
- DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada Maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.
- FAN, J., et al. Saikosaponin-d attenuates the development of liver fibrosis by preventing hepatocyte injury. **Biochem Cell Biol**, v. 85, p. 189-195, 2007.
- FISCHER G, et al. Imunomodulação pela própolis. **Arq Inst Biol**. São Paulo.75(2):247-53. 2008.
- FREITAS, B. M. **A vida das abelhas. Fortaleza: Craveiro & Craveiro**, 1999. CD-ROM.
- FREITAS, M. O. et al. Flavonoids and Triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 532-535, 2008.
- GOMES, M. F.F., et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesq. Vet. Bras.** 36(4):279-282, abril 2016
- KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004
- LI, F et al., Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorg. Med. Chem.** 16, 5434–5440. 2008.
- LOPEZ, B.G.C., - Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana/ Begoña Gimenez-Cassina Lopez.-Campinas, SP: [s.n], 2014.
- LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

- MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb.*) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.956-963, 2008.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Tecnapis, 1997. 447p.
- PARK, J. H. et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 429-436, 2004.
- PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high- performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-91, 2011.
- PORTILHO D. R., et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.6, n.2, Pub.1, Abril 2013
- SAWAYA, A. C.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 27, p. 1-10, 2011.
- 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.
- SOUZA, F. B. R. et al. Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. **Science and Animal Health**, v. 1, n. 1, p. 24-37, 2013.
- SOLTANI, E.K.et al. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses/ **Fish & Shellfish Immunology** 62 (2017) 57e67
- SPIRA, G. et al. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.
- SILVA et. al; Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 36, n. 2, p. 25-34, jul./dez. 2015.
- TRENNERY, P. N.; WARING, R. H. Early changes in thioacetamide-induced liver damage, **Toxicology Letter**, v. 19, n. 3, p. 299-307, 1983
- TRUSHEVA et al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis, e-CAM: **Evidence based complementary and alternative medicine**.3:249-254. 2006
- ZHANG, Z. et al. Severe dendritic cell perturbation is actively involved in the pathogenesis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 396-406, 2008.
- ZUNINI, M. P. et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 55, n. 1, p. 141-146, 2010.
- YILDIRIM A., et al. 2016. Antiviral activity of Hatay Propolis against replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. **Med. Sci. Monit.** 22:422-430.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha produzida pelas abelhas *Apis mellifera* no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os teores de fenois totais e flavonoides do extrato hidroetanólico da própolis vermelha potiguar;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da própolis vermelha a partir do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila);
- Avaliar *in vitro* o potencial genotóxico e genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha;
- Avaliar *in vivo* o potencial hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha na lesão hepática crônica experimental em ratos, induzida pela tioacetamida;
- Avaliar *in vitro* o efeito citotóxico do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em linhagem de hepatócitos (L929);
- Avaliar *in vitro* o potencial antineoplásico do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em linhagem de células de carcinoma hepático humano (HepG2).

CAPÍTULO I

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRÓPOLIS VERMELHA

A etiologia da palavra própolis, que é de origem grega, tem como significado (*pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade) (MIGUEL e ANTUNES, 2011).

Sua produção é realizada a partir da coleta de ceras e substâncias derivadas de plantas, como compostos voláteis e resinas. É tida como a arma química mais utilizada em defesa da colméia pelas abelhas, as quais utilizam contra micro-organismos patogênicos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colméia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (BANKOVA, 2005).

A composição química da própolis está intimamente relacionada a sua origem botânica, sendo que 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) levam a variações e transformações em sua composição (CARDINAULT, CAYEUX e SERT, 2012; NUNES e GUERREIRO, 2012). A própolis comumente é formada por cerca de 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e 5% de pólen (NIKOLAEV, 1978; apud ASHRY e AHMAD, 2012).

Já na composição química apresentada na própolis vermelha, a qual tem como origem áreas pertencentes a localidades da Mata Atlântica da região nordeste do Brasil (estados Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba), tipicamente apresenta sua fonte botânica bem caracterizada, apresentando traço da planta *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae), popularmente chamada de “rabo-de-bugio” (SILVA et al., 2008). O perfil químico investigado na própolis vermelha demonstrou presença de iquiritigenina, dalbergina, isoliquiritigenina, daidzeina, formononetina e biochanina A, sendo os três últimos compostos isoflavonóides (DAUGSCH et al., 2008).

Os principais marcadores químicos encontrados na própolis vermelha produzida a partir da leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, são isoflavonas. Exatamente quinze compostos foram encontrado nesse tipo de própolis, sendo identificados o trans-anetol, metil eugenol, trans-metil isoeugenol, elemicina, trans-isoelemicina, 20(29)-

lupen-3-one, α - e β -amirina, cicloartenol, lupeol, isosativana, medicarpina, gutiferone E, xantocimol, 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4- naftalenediona, sendo este último encontrado pela primeira vez em um produto natural (TRUSHEVA et al., 2006). Alencar et al. (2007), encontraram e identificaram outros 20 compostos após análise em cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotômetro de massa (CG-EM), apresentando as isoflavonas homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxy-2'- isoflavonol, sendo esses os compostos mais abundantes. Posteriormente, Li et al. (2008) isolaram outros flavonóides de um extrato hidroetanólico da própolis vermelha: a flavanona 7-hidroxi-6-metoxiflavanona e a isoflavana mucronulatol, tendo estes compostos apresentado forte atividade citóxica.

A própolis pesquisada por Silva et al (2008), demonstrou percentagens significantes dos isoflavonóides 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano e medicarpina em um extrato hidroetanólico. Já em um extrato etanólico e na sua fração clorofórmica, apenas o flavonóide quercetina, as isoflavonas formononetina e daidzeina e o ácido ferúlico foram identificados (CABRAL et al., 2009).

No extrato, a fração clorofórmica revelou presença de isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina) (OLDONI et al., 2011). Righi et al. (2011), ainda no mesmo ano, analisaram os extratos metanólico e clorofórmico da própolis vermelha, sendo a 3,4,2',3'- tetrahidroxichalcona eleito como principal composto encontrado. Outros constituintes importantes foram: a chalcona isoliquiritigenina, as isoflavanas (3S)-vestitol e (3S)-7-Ometilvestitol, o pterocarpano medicarpina, os fenilpropenos trans-anetol, metileugenol, elimicina, metoxieugenol e cis-asarone, e por fim, os álcoois triterpenos lupeol e α - e β - amirinas. Mesmo sendo encontrado em baixas concentrações, um C-glicósido foi reportado pela primeira vez: naringenina-8-C-hexósido.

A retusapurpurina A e a retusapurpurina B são identificadas como duas C30 isoflavanas, estas são responsáveis pela pigmentação a qual confere a coloração rubra da própolis vermelha (PICCINELLI et al., 2011). A partir de espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta (HR-DIMS), foi possível determinar como compostos principais da própolis vermelha as isoflavonas formononetina e biochanina A. A liquiritigenina também é comumente encontrada (FROZZA et al., 2013).

Em pesquisa realizada por Marcucci et al. (2001), analisando própolis vermelha obtida do estado do Paraná foram identificados no extrato etanólico os seguintes compostos: ác. 3-prenil-4- hidroxicinâmico (PHCA), 2,2-dimetil-6-

carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN), ác. 3,5- diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA – artepilina C) e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H- 1-benzopirano (DPB).

A partir da análise de um extrato oleoso obtido na mesma região foram identificados o PHCA, o ácido 3,4-dihidroxi-5-prenil-cinâmico, isosacuranetina, canferide, artepilina C, diidrocanferide, o ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-fenilfenil}-2-propenóico por Carvalho et al. (2011). Mesmo se tendo uma série de estudos realizados com a própolis obtida no estado do Paraná, ainda sim a pinocebrina tem sido indicada como o principal marcador químico (SALATINO et al., 2011).

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Para se obter melhor compreensão da biotividade presente na própolis se torna necessária a caracterização química da mesma, se obtendo a partir do estudo em seu extrato, o qual é testado suas atividades biológicas (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Existe uma relação diretamente proporcional às propriedades farmacológicas da própolis, com a sua composição química, que por sua vez depende da flora local e sazonalidade (SILVA et al., 2006). A própolis brasileira possui grande variabilidade em sua composição química se diferenciando da composição encontrada na própolis europeia, que em virtude da restrita diversidade vegetal em seu território não consegue apresentar os mesmos índices da própolis produzida no Brasil, país caracterizado por apresentar abundante diversidade vegetal (CASTRO et al., 2007; NUNES e GUERREIRO, 2012).

A presença de compostos fenólicos e terpenóides e a ausência de compostos nitrogenados, tais como alcalóides, glucosinolatos e compostos cianogênicos caracteriza a composição da própolis. Muitos dos compostos os quais não estão presentes na própolis se explica sua ausência por conta de não serem 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).

Os autores Park, Alencar e Aguiar (2002) delinearam o perfil de flavonoides presentes em amostras de própolis pertencentes a três grupos. No grupo correspondente a região sul, as amostras eram ricas em pinobanksina, pinocebrina, pinobanksina 3-acetato, crisina e galangina, compostos frequentemente encontrados em fontes vegetais

de regiões de clima temperado. No grupo que correspondia a região sudeste, as amostras são compostas dos flavonoides canferide, isosakuranetina e pequenas quantidades de canferol. Nas amostras pertencentes ao grupo correspondente a região nordeste não foi identificada a presença de flavonóides.

O artepilina C é o componente majoritário presente na composição da própolis verde (FUNARI e FERRO, 2006).

Através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), foi possível identificar em amostras de própolis verde sua principal fonte vegetal a *Baccharis dracunculifolia*, como também compostos fenólicos tais com o ácido cumárico, rutina, pinobanksina, quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, pinobanksina-3-acetato, crisina, galangina, canferide e tectocrisina foram evidenciados (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008); ramnocitrina, eupalitina, acacetina, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, ácido (E)-3-[4-(3- fenilpropanoiloxi)]-3,5-diprenil-cinâmico e os triterpenos α - e β -amirina e lupeol por Ressonância nuclear magnética (1D- e 2D-NMR), Espectroscopia de massa (MS) e Espectroscopia do infravermelho (IR) também foram encontrados (TAVARES et al., 2010)

Outros compostos foram, ainda, posteriormente isolados: procrim A (lupeol-3-(3-Rhidroxi)- hexa-decanoato), bacarina (ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico), beturetol, isosacuranetina, ácido (E)-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-cinâmico, diidrocanferide e drupanina (ácido 3-prenil-p-cumárico) (HATTORI et al., 2011).

Em um extrato etanólico de própolis verde foram encontrados compostos alifáticos, esses merecem destaque pois são não absorverem luz ultra-violeta (UV), não sendo normalmente reportados na literatura (CHANG et al., 2008). Já os extratos aquosos possuem composição semelhante aos extratos etanólicos, tendo como componentes majoritários os derivados das ácidos cafeoilquínico (ácido 3,4-di-Ocafeoilquínico, ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, ácido clorogênico) e cinâmico (ácido p-cumárico, artepilina C, drupanina, bacarina) (NAKAJIMA et al., 2007; MOURA et al., 2011).

Através de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (CG-EM) foi possível identificar 23 substâncias, sendo 17 presentes em ambos os óleos essenciais da própolis verde e *Baccharis*. O nerolidol foi o composto volátil majoritário em ambos os óleos essenciais (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008). Fora o nerolidol, outros sesquiterpenos foram identificados no óleo essencial de própolis verde: β -

cariofileno e selina-3,7 dieno, ressaltando a caracterização de odor característico a esse tipo de própolis (ALBUQUERQUE et al., 2008).

A *Baccharis dracunculifolia* pertence a família Asteraceae e está presente como principal fonte botânica da própolis verde que se torna conhecida pela sua significativa diversidade em possuir ácidos clorogênicos. Entretanto, nem todas as suas espécies são capazes de esterificar todas as quatro hidroxilas do ácido quínico, não somente com vários ácidos cinâmicos, mas também com ácido succínico (CLIFFORD et al., 2006; apud MOURA et al., 2011).

Segundo pesquisa realizada por Fabris et al. (2013) que comparou amostras de própolis obtidas em três estados diferentes, foi possível observar que amostras de Minas Gerais continham significante quantidade de pinocembrina, e pequenas quantidade de ácido caféico, canferol, galangina e quercetina. Já amostras de São Paulo continham principalmente ácido caféico, canferol e fenetil éster do ácido caféico (CAPE) e somente em uma amostra, concentrações consideráveis de pinocembrina e quercetina foram encontradas. Por fim, em Mato Grosso continham principalmente apigenina, galangina e 1,1-dimetilalilcafeato (DMAC) e em uma amostra, encontrou-se CAPE e quercetina em concentrações significantes. O estudo aponta a grande variedade na composição química dessas amostras, como também a grande diversidade vegetal encontrada no território brasileiro.

Pesquisa realizada por Teixeira et al. (2006), aponta que a própolis obtida na região do estado de Minas Gerais, que apresentava coloração castanha, com manchas brancas e dureza inferior à própolis verde foi descrita por possuir como composto majoritário um triterpeno pentacíclico, o acetato de Bauer-7-en-3 β -il. É provável que a principal fonte botânica deste tipo de própolis seja a soja.

Na região norte do Brasil, mais especificamente na região da Amazônia brasileira, Ishida et al. (2011) relata como principais compostos, benzofenonas polipreniladas: 7- epi-nemorosona, 7- epi-clusianona xantochimol e gambogenona. Além destes compostos, triterpenóides (β - amirinas, β -amirenona, lupeol e lupenona) foram ubíquos em algumas dessas amostras.

Estudos para avaliar a atividade hepatoprotetora foram realizados visando conferir à própolis brasileira, através do modelo de morte celular induzida por D-galactosamina e TNF- α em cultura primária de hepatócito, a constatação da referida atividade (BANSKOTA et al., 2000; BANSKOTA et al., 2001).

3.3 FÍGADO: CONSIDERAÇÕES SOBRE FUNÇÕES E LESÕES HEPÁTICAS

O fígado apresenta como característica marcante o título de ser o maior órgão glandular do corpo e o segundo órgão em tamanho, perdendo neste último quesito somente para a pele. Apresentando peso médio de 5% do peso corporal nos animais jovens e 3% nos adultos, o fígado ainda apresenta a capacidade de receber aproximadamente 25% do débito cardíaco total.

Suas numerosas funções vitais, indispensáveis à manutenção da homeostasia corporal, confere-lhe a capacidade de efetuar aproximadamente mais de 500 funções, sendo que alguns autores chegam a afirmar que o fígado tem de mais de mil funções diferentes, todas interligadas e co-relacionadas (GIANNINI et al., 2005).

Funções de processamento e síntese de substâncias são inerentes ao fígado. Esse órgão desenvolve a capacidade de armazenamento, desintoxificação e defesa do organismo, sendo, portanto, considerado uma interface entre o aparelho digestivo e o sangue, pelo fato de que os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para serem utilizados pelo organismo (GOWDA et al., 2009).

Merece destaque fora outras funções desenvolvidas pelo fígado, a síntese de proteínas plasmáticas como a albumina, aminoácidos não-essenciais, fibrinogênio e fatores da coagulação, e ainda a responsabilidade em realizar lipogênese, sintetiza lipoproteínas, triglicérides, colesterol e fosfolipídios; produção e armazenamento da vitaminas A (a partir do β -caroteno), D, E, K (lipossolúveis) e do complexo B; degradação hormonal e a inativação e excreção de drogas e toxinas. As funções do fígado ainda incluem filtragem e armazenamento de sangue, assim como do ferro e conversão de amônia em ureia (JAESCHKE, 2011).

A enorme capacidade de regeneração permite afirmar que, mesmo que ocorra a remoção de 70% a 80% do órgão, ainda sim existe a provável ausência de prejuízos à função hepática, podendo resultar em nenhum efeito clínico notável. A massa hepática apresenta regenera significativa em pouco tempo (CARLTON, E MCGAVIN, 1998).

Por essa razão, o diagnóstico das enfermidades no fígado tem como dificuldade o fato de que, geralmente, enquanto não houver perda em torno de 75% da capacidade funcional hepática, pode não haver manifestações clínica. Desse modo, a maior parte das hepatopatias só são diagnosticadas quando apresentam lesões avançadas ou doenças terminais, o que complica o tratamento e agrava o prognóstico, que poderá se tornar desfavorável (WEBSTER, 2004).

Apesar da notória capacidade de regeneração e a enorme reserva funcional do fígado, este quando exposto a um agente lesivo de forma intensa e contínua por um período prolongado levam as células hepáticas perderem a capacidade de adaptação e com a propagação das lesões, ocorrem degeneração e morte celular desencadeando como resultado final a insuficiência hepática (JALAN et al., 2012).

A insuficiência hepática é definida como perda da função hepática normal, apresenta-se a partir de uma lesão hepática aguda ou crônica, sendo caracterizada por ampla variedade de apresentações clínicas patológicas os quais podem ser constatados a presença de colestase, icterícia, encefalopatia, alterações da coagulação sanguínea, edema e fotossensibilização (CARLTON, E MCGAVIN, 1998, PATIDAR E BAJAJ, 2015).

Indivíduos sem doença hepática prévia ou com doença hepática compensada que venha a desenvolver uma rápida insuficiência hepática são por definição portadoras de insuficiência hepática aguda (SALIBA e SAMUEL, 2013). A agressão hepática induzida por fármacos, principalmente por acetaminofeno ou paracetamol, é considerada a causa mais comum de insuficiência hepática aguda na Europa e na América do Norte, enquanto que a hepatite viral predomina nos países em vias de desenvolvimento (YOON, 2016).

3.4 CIRROSE HEPÁTICA

O contínuo e progressivo processo patológico o qual vem envolver múltiplos eventos celulares e moleculares levando à deposição de matriz extracelular no fígado caracteriza a formação de fibrose hepática, e quando esse processo é combinado com regeneração e reparo sem eficácia, é observado uma distorção hepática normal resultando no Tabela anatomopatológico de cirrose (ZHENG, 2002).

Agressões prolongadas aos hepatócitos, faz com que ocorra o desenvolvimento de extensas lesões hepatocelular e gradual aumento acentuado da quantidade de tecido conjuntivo fibroso que substituirá os hepatócitos danificados (CARLTON, E MCGAVIN, 1998). Verificando-se dentro do espaço de Disse o acúmulo de matriz extracelular e a substituição do colágeno tipo IV, pelo colágeno tipo I, como resultado final.

Em uma pesquisa realizada no Brasil em 2015, aponta que a prevalência do consumo abusivo de álcool no referido ano foi de 13,7% na população adulta, sendo 3,3

vezes superior entre os homens em relação às mulheres. Os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o Brasil, em 2013, indicam uma prevalência de abuso/dependência de álcool de 5,6% para ambos os sexos, 8,2% entre os homens e 3,2% entre as mulheres. O excesso no consumo do álcool ainda é considerado a principal causa de cirrose, evidenciando um aumento de incidência das hepatites de caráter crônico, contribuindo para os altos índices de mortalidade causadas pela cirrose (MELO et al., 2017).

3.5 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O fígado apresenta amplo espectro de possibilidade de desenvolver tumores epiteliais, mesenquimatosos e vasculares em virtude da grande quantidade de componentes celulares o qual possui. Neste caso, a variedade de tipos de tumores hepáticos primários pode surgir de componentes celulares do fígado: hepatócitos (carcinoma hepatocelular), epitélio dos ductos biliares (colangiocarcinoma), células do estroma (sarcomas) e células neuroendócrinas (carcinoide) (HONGMING et al., 2003).

A terceira causa de morte por câncer no mundo são causados por um conjunto de neoplasias malignas do fígado e das vias biliares intra-hepáticas. Tendo como perfil predominante a ocorrer em países tidos como em desenvolvimento, em indivíduos pertencente majoritariamente ao sexo masculino e habitando determinadas regiões da África Subsaariana e do sudeste da Ásia (PAN, 2011).

A neoplasia mais frequente do fígado é o carcinoma hepatocelular, representando uma frequência de 90% das neoplasias malignas hepáticas primárias em humanos. Essa neoplasia é a sexta neoplasia maligna mais comumente diagnosticada no mundo e tem apresentado importante aumento de sua incidência, tornando-se a terceira causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer (CHEDID et al., 2017).

O consumo de álcool, a exposição à aflatoxina e a infecção crônica pelo vírus da hepatite B e C, são considerados os principais fatores de risco em populações com elevada ocorrência desse tipo de câncer (TROJANA et al., 2016)

Apesar dos estudos realizados e dos investimentos aplicados em pesquisas, à quimioterapia do câncer ainda desestimula estudiosos, devido à múltipla resistência às drogas e aos sérios efeitos colaterais resultantes das similaridades morfológicas e fisiológicas entre as células normais e transformadas (KAMB, 2005).

A baixa especificidade dos fármacos às células tumorais faz com que o uso de

quimioterápicos afetem também células normais que tem sua divisão celular mais rápida, como as da pele, do trato gastrointestinal e do sangue. Baseado nesta problemática o principal objetivo das pesquisas realizadas na área de quimioterapia é encontrar um fármaco seletivo que tenha capacidade de atuar exclusivamente em células tumorais não afetando as células normais (ANAZETTI et al., 2003).

Por esses motivos, é de grande importância os estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade antineoplásica de produtos naturais, uma vez que tais estudos possibilitarão a descoberta de compostos bioativos com atividade antitumoral mais efetiva e menos tóxica (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

3.6 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE CIRROSE HEPÁTICA

A partir de pesquisas moleculares, celulares e funcionais em animais pode se evidenciar consideráveis contribuições no entendimento dos mecanismos que são responsáveis por causarem lesões hepatotóxicas. As lesões patológicas causadas por hepatotoxinas em modelos experimentais podem assemelhar-se às lesões de qualquer tipo conhecido de doença do fígado em humanos (BASKARANA et al., 2010).

A variedade de modelos animais que reproduzem lesão hepática, pode ser tanto cirúrgica como químicas, sendo que os procedimentos químicos são desenvolvidos por meio da administração de substâncias hepatotóxicas, a exemplo os fármacos paracetamol (APAP), a tioacetamida (TAA) e o tetracloreto de carbono (CCl_4) (HUANG et al., 2011, PETTIE e DOW, 2013).

Por ser a melhor substância para induzir lesão hepática e também receber o título de hepatotoxina clássica, o tetracloreto de carbono (CCl_4), é comumente usado como modelo para testar o efeito hepatoprotetor de drogas e substâncias naturais, para investigação de hepatotoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo, tanto para estudos *in vivo* quanto *in vitro* (HUANG et al., 2011).

A utilização de CCl_4 na indução de lesão hepática se dá pelo mecanismo de formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO), que ao se ligar em moléculas celulares promovem a inibição da síntese protéica e a peroxidação lipídica, além de afetar a homeostase do cálcio e causar danos em DNA.

O N-Acetyl-p-aminofenol, conhecido popularmente por paracetamol ou acetaminofeno, é um fármaco que apresenta propriedades analgésicas e antitérmicas e seu uso em superdosagem, tem sido frequentemente reportado como fármaco associados

à ocorrência de hepatotoxicidade e ocasionando prejuízos em curto intervalo de tempo da função hepática em indivíduos sem patologia hepática pré-existente (PETTIE e DOW, 2013).

A explicação clara e simples do mecanismo de ação da lesão induzida pelo paracetamol em superdosagens se dá através da saturação da via do Citocromo P- 450, que em virtude da biotransformação do paracetamol, ocasionando maior formação de metabólito tóxico e radicais livres, desencadeando aumento da permeabilidade pelas mitocôndrias e consequente morte dos hepatócitos. A partir da liberação do DNA do hepatócito morto ocorre a indução da produção de citocinas e o associado processo inflamatório do fígado. Por essa razão, o paracetamol tem sido amplamente utilizado como modelo experimental para indução de hepatopatia tóxica aguda, e assim avaliar a atividade hepatoprotetora de fármacos e compostos vegetais (STIRNIMANN, 2010).

Dentre a gama de modelos experimentais de indução cirrose, a tioacetamida (TAA) demonstrou ser a opção adequada, apresentou reprodução de padrões histológico próximos ao da cirrose humana, além de promover menor mortalidade dos animais experimentais, maior reprodutibilidade e segurança, requerendo apenas 14 semanas para completa indução experimental (PASSOS et al., 2010).

Inicialmente utilizada como fungicida para proteger laranjas contra a deterioração, a droga tioacetamida (TAA), passou também a ser usada por suas outras propriedades, em sua composição apresenta uma potente hepatotoxina que atua como agente carcinogênico, sendo também evidenciado em estudos que a exposição crônica a tioacetamida produziu cirrose em ratos (LI et al., 2002).

A hepatotoxicidade dessa droga se dá devido os compostos derivados da TAA, formados durante sua metabolização serem tóxicos, induzindo assim a produção de radicais livres, o qual reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica no fígado, provocam aumentos no cálcio citosólico, inibição da glutatona e redução dos grupos tiol (-SH), promovendo o rompimento de endomembranas e perda da matriz citoplasmática, levando à morte celular. Além disso, a TAA altera o ciclo da uréia, o metabolismo lipídico e lipoprotéico e a síntese de ácidos graxos, além de inibir o transporte de RNA do núcleo para o citoplasma (DAVID et al., 2002).

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dentre as amostras de própolis testadas do Brasil, foram observados os menores valores de concentração capaz de inibir em 50% o radical DPPH (IC₅₀%), variando entre 2-20mg/L. Dentre essas amostras, a própolis verde exibiu maior potencial antioxidante quando comparada às própolis do Pantanal e de São Paulo (FABRIS et al., 2013).

Pesquisa realizada por Capucho et al (2012), avaliando extrato aquoso de própolis verde em ratos Wistar machos, demonstraram ocorrer uma maior produção de espermatozoides e maior altura do segmento inicial do epitélio do epidídimo (sem indução de estresse oxidativo) nesses animais, quando comparados a animais do grupo controle. O estudo indica que devido à sua capacidade antioxidante, a própolis verde foi capaz de melhorar a função reprodutiva dos ratos.

A própolis vermelha se destaca por possuir efeito antioxidante significativo. A pesquisa comparou o potencial antioxidante de diferentes frações obtidas de um extrato hidroetanólico da própolis vermelha, através dos métodos de sequestro de radical DPPH e inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico. O primeiro método aponta que a fração hexânica apresentou maior atividade antioxidante (74,4%), enquanto que no segundo método a fração clorofórmica apresentou maior atividade (64,8%). 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).

De acordo com Righi et al (2011), os compostos ativos como a isoflavonas e a chalconas, têm maior afinidade pela fase orgânica. Em um estudo posterior, isolou-se os seguintes compostos da fração clorofórmica: dois isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina). Dentre esses compostos, o vestitol mostrou maior atividade antioxidante em relação aos demais, através do modelo β -caroteno/ácido linoléico (OLDONI et al., 2011).

Em estudo que analisou um extrato hidroetanólico de própolis vermelha se obteve como resultado IC₅₀% = 270 μ g/ml e acentuada atividade enzimática tipo superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT), importantes no estresse oxidativo (FROZZA et al., 2013). Existem uma correlação positiva com a atividade antioxidante e às propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. No caso da própolis marrom, observou-se redução das lesões extra-vaginais e danos histológicos causados pela infecção pelo vírus *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2) em tecidos vaginais de animais por agir em processos oxidativos e inflamatórios (SARTORI et al., 2011).

3.8 CITOTOXIDADE

O crescente controle e o maior rigor para usar animais de laboratórios, faz necessário o desenvolvimento e a padronização de teste *in vitro* que possam apontar a toxicidade de substâncias que futuramente possam ser utilizadas em seres humanos e animais, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo (FROZZA, 2013).

A realização de diferentes estudos demonstra que *in vitro* e *in vivo*, têm sido realizados testes com o intuito de demonstrar o potencial antiproliferativo da própolis brasileira e de seus constituintes isolados (CARVALHO et al., 2011; MIGUEL e ANTUNES, 2011; SALATINO et al., 2011; SFORCIN e BANKOVA, 2011; CARDINAULT, CAYEUX e DU SERT, 2012).

Em pesquisa realizada por Li et al. (2008), foi possível demonstrar que amostras de própolis obtidas do nordeste brasileiro apresentaram potencial antitumoral.

A presença de flavonóides e pterocarpanos presentes na própolis vermelha, aponta a relação de responsabilidade para atividade citotóxica encontrada. Dentre os compostos avaliados, a flavanona 7-hidroxi-6-metoxiflavanona e a isoflavana mucronulatol exibiram potente ação citotóxica contra as linhagens de melanoma (B16-BL6), carcinoma de pulmão de Lewis (LLC), adenocarcinoma pulmonar humano (A549), fibrocarcinoma metastático (HT-1080) e LLC, A549, respectivamente.

Nas flavanonas, a ausência ou presença da hidroxila no carbono 3 (C-3) pode estar envolvida no potencial citotóxico desses compostos. Em relação às isoflavanos, o aumento no número de grupos metoxila na estrutura base das isoflavanos, necessariamente aumentou o potencial citotóxico.

Na mesma linha de raciocínio Awale et al. (2008) pesquisaram a atividade citotóxica do extrato metanólico de própolis e alguns de seus compostos isolados revelando que, tanto o extrato hidroetanólico da própolis 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 ação da substância testada até chegar ao resultado de morte celular 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 hidroetanólico da própolis vermelha, 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).

Torna-se importante destacar também que de uma amostra de própolis obtida do estado da Bahia foi isolada o benzofenona prenilada, a hiperibona A, que apresentou efeitos citotóxicos contra células tumorais HeLa (CASTRO et al., 2009).

O que determina se uma substância em uma determinada concentração é citotóxica ou não é seu potencial de promover alteração metabólica e morte celular em cultura de células (AWALE et al., 2008).

O potencial citotóxico de um produto natural ou sintético é analisado através de ensaios quantitativos pelo método colorimétrico do MTT, que segundo MOSMANN (1983), é um dos testes mais utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação da atividade antineoplásica na rotina de triagem de drogas anticâncer. O ensaio de MTT é um teste que analisa a viabilidade ou proliferação celular através do dano celular, uma vez que a enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias das células vivas reduz o sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio]}, de coloração amarela, a um produto chamado formazana, de coloração azul/violeta. Dessa maneira a quantidade de formazan medida por espectrofotometria é diretamente proporcional ao número de células viáveis (PORTO et al., 2011).

Os testes de citotoxicidade realizados *in vitro*, são parte do *screening* inicial para determinar o possível potencial antitumoral de um produto natural (OLIVEIRA et al., 2012). Em pesquisas realizadas com teste de citotoxicidade *in vitro* utilizando própolis produzida pela abelha *Apis mellifera* no Brasil, CINEGAGLIA et al. (2013) verificaram que exposição da própolis a cultura celular primária de osteossarcoma, utilizando o método colorimétrico MTT, foram capazes de proporcionar ação de citotoxicidade significativas frente às células tumorais analisadas. Após constatar que a própolis de Portugal é rica em compostos fenólicos, que exibe um amplo espectro de atividades biológicas, Calhelha et al. (2014), pesquisaram as propriedades antineoplásica do extrato fenólico da própolis obtidas de diferentes origens em Portugal. O extrato hidroetanólico da própolis foi testado em linhas de células tumorais humanas (MCF7 - adenocarcinoma da mama, NCI-H460 - carcinoma pulmonar de células não pequenas, HCT15 - carcinoma do cólon, HeLa - carcinoma cervical e HepG2 –

hepatocelular carcinoma. A própolis pesquisada apresentou elevado potencial citotóxico para células tumorais testadas, principalmente para HCT15.

A replicação e a transcrição são processos celulares essenciais o qual o DNA tem participação, um dano que desestabiliza este ácido nucleico pode gerar interferências nestas fases da divisão celular, como também levar à morte celular e a indução de mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento. Torna-se importante avaliar possíveis eventos que levam à instabilidade genômica bem como àqueles ligados à manutenção da estabilidade do genoma (HOEIJMAKERS, 2009).

3.9 GENOTOXIDADE

Com o propósito de se obter novas estruturas químicas menos tóxicas e identificar um produto que contenha potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica, se faz necessário nos estágios iniciais da pesquisa a realização de estudos de genotoxicidade, este teste representando uma ótima alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos (NIWA et al., 2013).

A genotoxicidade ou toxicologia genética é uma especialidade que estuda e identifica a ação de qualquer agente que produz efeitos tóxicos e genotóxicos, sobre o material genético (AQUINO, 2010).

As estimativas de danos no DNA podem ser mensuradas a partir do teste de mutagenotoxicidade que vem a ser um fator relevante no inicial do desenvolvimento de células neoplásicas. Os testes de toxicidade genética e carcinogênese, são utilizados com frequência para uma varredura do espectro toxicológico de substâncias químicas e medicamentos, e também para a descoberta de genoprotetores para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA (NIWA et al., 2013).

É possível detectar danos no DNA celular utilizando-se do ensaio cometa, método o qual utiliza o material genético da célula, realizando fragmentação com o uso de substâncias químicas ou radiação, e a seguir é submetido a uma eletroforese, dessa forma, ocorre a migração do DNA fragmentado sobre o gel de agarose e extremidades quebradas da molécula de DNA, de carga negativa, tornando-se livres para migrar no campo eléctrico em sentido ao ânodo, formando assim uma estrutura que se assemelha a um cometa. O comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa refletem o dano ao material genético (FIKROVÁ, 2011).

A atividade mutagênica de extratos etanólicos da própolis verde foi pesquisado por Roberto (2009), este obteve a própolis no sudeste do Brasil, na cidade de Carvalhópolis-MG. A atividade mutagênica foi realizada através do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese usando células de hepatoma de rato (HTC).

Não houve a formação de micronúcleo nos extratos etanólicos estudados, portanto não apresentaram atividades mutagênicas. O Roberto (2009), evidenciou ainda que a própolis verde testada apresenta uma atividade antimutagênica, possuindo uma capacidade protetora, uma vez que células de mamíferos quando submetidas a um agente comprovadamente mutagênico (Metilmetano Sulfonato - MMS) e incubadas juntamente com o extrato de própolis apresentaram redução de micronúcleos em 86,67%.

Toda e qualquer substância que atuar na prevenção ou redução da mutagenicidade de um agente mutagênico recebe o título 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 e SHIMOI, 1987).

Segundo 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 hidroetanólico da 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 µg/ml), o extrato hidroetanólico da própolis foi genotóxico, mas quando usado em baixas concentrações (12.5 µg/ml), exerceu atividades quimiopreventivas (antigenotóxica).

REFERÊNCIAS

- 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.
- ASHRY, E. S.; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 31-39, 2012.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALBUQUERQUE, I. L. et al. Constituents of the essential oil of Brazilian green própolis from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 5, p. 414-415, 2008.
- AQUINO, I. EFEITO GENOTÓXICO DA ARTEMISININA E DO ARTESUNATO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Geral e Aplicada, Departamento de Biomoléculas, Universidade Estadual Paulista "julio Mesquita Filho", Botucatu – Sp, 2010.
- ANAZETTI, M.C., MELO, P.S., DURAN, N., HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leucemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.
- 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. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2001.
- BASKARANA, Y., PERIYASAMYB, V., VENKATRAMANA, A. C. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicol.** v. 268, p. 204–212, 2010.
- _____. 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.
- BRANDÃO, D. F. , RAMALHO, L. N. Z., ZUCOLOTO, S., MARTINELLI, A. L. C., SILVA, O. C. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21 (Suplemento 1), 2006.
- 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.
- CARDINAULT, N.; CAYEUX, M. O.; SERT, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.
- CALHELHA R. C et al. Cytotoxicity of Portuguese Propolis: The Proximity of the In Vitro Doses for Tumor and Normal Cell Lines. **BioMed Research International**. Volume 2014, Article ID 897361, 7 pages
- CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512, 2007.
- CARVALHO, A. A. et al. In vivo antitumoral activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.
- CARDINAULT, N.; CAYEUX, M. O.; SERT, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.
- CARLTON, W. W., MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**, 2a. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998, 672 pp.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512, 2007.

_____. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5332-5, 2009.

_____. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian própolis from Bahia state. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 9, p. 25, 2009.

CHANG, R. et al. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 549- 556, 2008.

CHEDID, M. F., KRUEL, C. R. P., PINTO, M. A., TOMAZ, J. M. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and operative management. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**. v. 30, n. 4, p. 272-278, 2017.

CLIFFORD, M. N. et al. Characterization by LC-MS of four new classes of p-coumaric acidcontaining diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4095-4101, 2006.

CINEGAGLIA, N. C., BERSANO, P. R. O., BUFALO, M. C. Cytotoxic action of brazilian propolis in vitro on canine osteosarcoma cells. **Wiley Online Library**, v. 27, p. 1277-1278, 2013.

CAPUCHO, C. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. **Food Chemistry Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 3956-62, 2012.

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.

DAVID P. et al., Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminaemic rats. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 2, p. 158-164, 2002.

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

FIKROVÁ, P. Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 123, n. 23-24, p. 693-9, 2011.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. ANÁLISE DE PRÓPOLIS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

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.

GIANNINI, E. G., TESTA, R., SAVARIN, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Journal List**, v.72, n. 3, p. 367-379, 2005.

GOWDA, S., et al. A review on laboratory liver function tests. **The Pan African Medical Journal**. v. 3, n. 17, p. 1-11, 2009.

HATTORI, H. et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5392-5401, 2011.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475-1485, 2009.

HUANG, C.C.; TUNG, Y.T.; CHENG, K. C.; WU, J. H. Phytocompounds from vitiskelungensis stem prevent carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. **Food chemistry**, London v. 125, n. 2, p. 726-773, 2011.

- ISHIDA, V. F. C. et al. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 966-972, 2011.
- JAESCHKE, H. J. et al. A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity – A clinically relevant model to test the efficacy of natural products. **Life Sciences**, Oxford, v. 88, n. 17-18, p. 737-745, 2011
- JALAN, R., GINES, P., OLSON, J. C., MOOKERJEE, P., MOREAU, R. Acute-on chronic liver failure. **Journal of Hepatology**, v 57, p. 1336–1348, 2012.
- KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**. v.4, p. 161-165, 2005.
- KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens - their modes of action. **Bioassays**. v 7, n 3, p. 113-6, 1987.
- LI, X., BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of hioacetamide- induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.
- LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-40, 2008.
- LOTUFO, C. L. V et al A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual Química**. v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.16, p. 55-63, 1983.
- 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.
- MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.
- MARÓSTICA JUNIOR, M. R. et al. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 28, n. 1, p. 178-181, 2008.
- MELO, A. P. S., FRANÇAL, E. B., MALTA, D. C., GARCIA, L. P.V. Mortalidade por cirrose, câncer hepático e transtornos devidos ao uso de álcool: Carga Global de Doenças no Brasil, 1990 e 2015. **Revista Brasileira Epidemiologia**. v. 20, p. 61-74, 2017.
- MOURA, S. A. et al. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1- 7, 2011.
- NAKAJIMA, Y. et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Science**, v. 80, n. 4, p. 370-377, 2007.
- NIKOLAEV, A. B. A Remarkable Hive Product, Propolis: scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. Bucharest: APIMONDIA **Standing Commission on Beekeeping Technology and Equipment**, 1978.
- NIWA A. M., OLIVEIRA, R. J., MANTOVANI, M. S. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of soy phytoestrogens using micronucleus and comet assays of the peripheral blood of mice. **Genetics and molecular research**. v. 12, n. 1, p. 519-527, 2013.
- NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433-438, 2012.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208-213, 2011.

OLIVERIRA, C. R., MENEZES, A. C. S., MORAES, M. O., VIEIRA, L. M., PEREIRA, A. G. Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART. ex. Schult.) G. Dom. (Celastraceae). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**. v. 41, n. 2, p. 133-142, 2012.

PASSOS, C.C. et al. Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 183-190, 2010.

PATIDAR, K. R, BAJAJ, J. S. Covert and Overt Hepatic Encephalopathy: Diagnosis and Management. Clinical gastroenterology and hepatology: The Official Clinical Practice **Journal of the American Gastroenterological Association**. v. 13, n. 12, p. 2048-2061, 2015.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502- 2506, 2002.

PAN, H., P., XIANGHUI, F., WENDONG, H. Molecular Mechanisms of Liver Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 11, n 6, P. 909–915, 2011.

PETTIE, J. E DOW, M. Assessment and management of paracetamol poisoning in adults. **Nurs Stand**, 27, pp. 39-47. 2013

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 2011.

PORTO, I. C. C. M., OLIVEIRA, D. C., RAELE, R .A., RIBAS, K. H. S., MONTES, M. A. J. R.,CASTRO, C. M. M.B. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. **Dental Materials**, v. 27, p. 221-228, 2011.

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.

ROBERTO, M. M. Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato hidroetanólico da própolis vermelhaEtanólico 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.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a newtype of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, R. A. D. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, 2006.

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

SARTORI, G. et al. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by Herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and antiinflammatory mechanisms. **Cell Biochemistry & Function**, v. 30, p. 1-10, 2011.

STIRNIMANN, G. K. Liver injury caused by drugs: an update. **The European Journal of Medical Sciences**. v. 140, n. 18, p. 13-27, 2010.

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.

- TAVARES, D. C. et al. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1154-1158, 2006.
- TAVARES, L. C. et al. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2051-2054, 2010.
- TEIXEIRA, T. W. et al. Bauer-7-en-3 beta-yl acetate: A major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 245-246, 2006.
- TROJANA, J., ZANGOSB, B. S., SCHNITZBAUERB, A. A. Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments. **Visceral Medicine**, n. 32, p. 116-120, 2016.
- TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.
- ZHENG M, CAI WM, WENG HL, LIU RH. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. **World Journal. Gastroenterol.** v. 8, n. 6, p. 1073-1076, 2002.
- YOON, E., BABAR, A., CHOUDHARY, M., KUTNER, M. Minophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. **Journal of clinical and translational hepatology**. v. 28, n. 2, p. 131-142, 2016.
- WEBSTER L. C. R. Diagnóstico laboratorial de doenças hepatobiliares, **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2156p, p.1348-1364, 2004.

CAPITULO II

4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E GENOPROTETORA DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA PELA ABELHA *Apis mellifera* NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND GENOPROTETIC ACTIVITY OF RED PROPOLIS PRODUCED BY THE BEE *Apis mellifera* IN RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL

Artigo submetido ao periódico
REVISTA SEMINA

Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica e genoprotetora da própolis vermelha produzida pela abelha *Apis mellifera* no Rio Grande do Norte, Brasil

Evaluation of the antioxidant, cytotoxic and genoprotective activities of the red propolis produced by *Apis mellifera* bee in Rio Grande do Norte, Brazil

RESUMO: Este estudo objetivou avaliar os teores de fenóis e flavonoides totais, bem como determinar atividade antioxidante, potencial citotóxico e genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha produzidas por *Apis mellifera*, oriundas das cidades de Parnamirim-RN e Mossoró-RN. Foram utilizados os métodos de Folin Ciocalteu e Dowd para quantificar respectivamente os teores de fenóis e flavonoides totais do extrato hidroetanólico da própolis e o método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) para avaliar a atividade antioxidante. O potencial citotóxico do extrato hidroetanólico foi avaliado através do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) em linhagem celular de fibroblasto (L929), além do ensaio cometa em linhagem de células hepáticas (hepatócitos ZF-L) para avaliar o potencial genoprotetor. Constatou-se que o extrato hidroetanólico apresentou expressivos teores de fenóis e flavonoides totais, o qual variou respectivamente, entre $74,92 \pm 0,51$ a $141,07 \pm 1,27$ mg GAE 100 g^{-1} e $2,42 \pm 0,17$ a $8,35 \pm 0,28$ mg QE 100 g^{-1} . Os extratos apresentaram também satisfatória atividade antioxidante com IC_{50} que variou de $141,07 \pm 0,21\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ a $54,14 \pm 1,50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$. O extrato hidroetanólico não exerceu efeito citotóxico nas concentrações testadas, o que indica segurança em uso. Não foram observados efeitos genotóxico do extrato nas concentrações de 500, 250 e $100\text{ }\mu\text{l ml}^{-1}$. Também foi possível constatar o efeito genoprotetor, uma vez que as médias dos danos promovidos ao DNA em células da linhagem (hepatócitos ZF-L), quando testada em contato com o extrato, foi significativamente inferior à média do controle positivo (peróxido de hidrogênio).

Palavras-chave: Atividade antioxidante DPPH, ensaio cometa, genoproteção, nordeste, própolis vermelha

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the total phenol and flavonoid content, as well as to determine the antioxidant activity, cytotoxic potential and genoprotective of the red propolis hydroethanolic extract produced by *Apis mellifera* from the cities of Parnamirim-RN and Mossoró- RN. Folin Ciocalteu and Dowd methods were used to quantify the total phenol and flavonoid contents of the propolis hydroethanolic extract and *in vitro* photochromic method of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) to evaluate the antioxidant activity. The cytotoxic potential of the hydroethanolic extract was evaluated by the colorimetric test MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) in fibroblast cell line (L929), in addition to the comet assay in hepatic cell line (ZF-L hepatocytes) to evaluate the potential genotype. It was verified that the hydroethanolic extract had expressive contents of total phenols and flavonoids, which varied, respectively, between 74.92 ± 0.51 to 141.07 ± 1.27 mg GAE 100 g^{-1} and 2.42 ± 0.17 to 8.35 ± 0.28 mg QE 100 g^{-1} . The extracts also showed satisfactory antioxidant activity with IC_{50} ranging from $141.07 \pm 0.21\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ to $54.14 \pm 1.50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$. The hydroethanolic extract had no cytotoxic effect at the concentrations tested, indicating safety in use. In the genotoxic effects of the extract were observed at the concentrations of 500, 250 and $100\text{ }\mu\text{l ml}^{-1}$. It was also possible to verify the genoprotective effect, since the means of damage

promoted to DNA in cells of the lineage (ZF-L hepatocytes), when tested in contact with the extract, was significantly lower than the mean of the positive control (peroxide).

Keywords: Antioxidant activity DPPH, comet assay, genoprotection, northeast, red propolis

Introdução

A própolis é um produto natural que apresenta diversas ações biológicas, sendo produzida e armazenada pelas abelhas na colmeia, tendo eficácia não somente nesta, como também na terapêutica e ensaios *in vitro* (SOLTANI et al., 2017).

A própolis vermelha é produzida por uma significativa quantia da planta leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como “rabo-de-bugio” e apresenta em sua composição diversos compostos, os quais podemos destacar os flavonoides e isoflavonas, que conferem inúmeras propriedades biológicas de grande interesse para o combate e prevenção de uma série de doenças (LI et al., 2008).

Dentre os diversos compostos químicos presentes na própolis vermelha, os flavonoides e os ácidos fenólicos se destacam por atuarem em diversos processos fisiológicos. No Brasil e em vários países as atividades farmacológicas e composição química da própolis tem sido foco de investigação (LUSTOSA et al., 2008; BARTH et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011), com crescente interesse pelas inúmeras propriedades terapêuticas da própolis.

Nos últimos anos, pesquisas tem demonstrado que as propriedades biológicas da própolis estão diretamente relacionadas com sua composição química, que é determinada pelas substâncias provenientes da vegetação visitada pelas abelhas, que em conjunto com secreções salivares das abelhas, cera e pólen (FREITAS et al., 2008; LUSTOSA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2016), reafirmam e reforçam cientificamente as propriedades antivirais (YILDIRIM et al., 2016), antifúngicas (PORTILHO et al., 2013) anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladoras (FISCHER et al., 2008).

Pesquisas demonstram que quantias significativas de antioxidantes na dieta atuam contribuindo para prevenção de doenças graves e crônicas e enfermidades inflamatórias, que possuem associação com a formação de radicais durante o processo de oxidação (CARRATU; SANZINI, 2005; HORST; LAJOLO, 2012; TEERASRIPREECHA et al., 2012; DALEPRANE; ABDALLA, 2013), pois segundo Miranda-Vilela et al. (2008) antioxidantes naturais podem diminuir o estresse oxidativo e conseqüentemente promover proteção contra danos no DNA.

No Brasil já foram realizadas pesquisas sobre o efeito protetor da própolis de *Apis mellifera* contra danos quimicamente induzidos no DNA, provenientes de Minas Gerais e São Paulo, sendo escassos os estudos com a própolis vermelha obtida no semiárido da região nordestina brasileira (CAMPELLO et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; PARK et al., 2004; ALMEIDA, 2009). Tendo em vista a importância de se pesquisar amostras de própolis vermelha em áreas que nunca foram estudadas e considerando que a composição da própolis vermelha depende da vegetação, clima da área e espécie de abelha, faz-se necessário caracterizar as amostras de própolis vermelha coletadas em uma região do semiárido do Rio Grande do Norte (RN) e identificar os teores de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante e seu efeito genoprotetor testado com extrato hidroetanólico da própolis vermelha hidroetanólico da própolis vermelha de *A. mellifera*.

Material e Métodos

Aquisição e elaboração do extrato hidroetanólico da própolis vermelha

Figura 1. Amostra de própolis vermelha produzida por abelhas *Apis mellifera*, obtida no Rio Grande do Norte, Brasil



Foram coletadas quatro amostras da própolis vermelha produzidas pela abelha *A. mellifera*, em colmeias instaladas nos municípios de Parnamirim-RN (Lat 05° 54' 56'' S / Long 35° 15' 46'' W) e Mossoró-RN (Lat 05° 11' 15'' S / Long 37° 20' 39'' W), no período de fevereiro a março de 2018. Para a confecção dos extratos foram utilizadas amostras de 200 g da própolis, subdivididas em pequenas porções, submetidas a secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C por 48h, sendo em seguida trituradas

em liquidificador doméstico. Realizou-se a maceração a frio, na proporção de 1:6,25 (m. v⁻¹), ou seja, para cada 1 g de própolis triturada utilizou 6,25 ml de álcool cereal 70 °GL. As amostras foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar devidamente identificados e agitados manualmente por 30 segundos, diariamente, durante 20 dias consecutivos, conforme Garcia et al. (2004). Na etapa seguinte, realizou-se processo de filtragem do sobrenadante em papel filtro e posteriormente em algodão, para retenção de partículas insolúveis.

Para remoção da cera, o filtrado permaneceu sob refrigeração em freezer (-20 °C) por 45 min e em seguida realizou-se nova filtragem do sobrenadante em papel filtro seguido de centrifugação, obtendo-se assim os extratos etanólico da própolis.

Estimativa dos teores de fenois totais

O método de Folin Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999) foi utilizado para determinar o conteúdo fenólico. Cada amostra do extrato hidroetanólico da própolis vermelhidroetanólico da própolis (5 ml) foi diluída para 50 ml com água destilada. Esta solução (0,5 ml) foi então misturada com 2,5 ml de reagente 0,2 N Folin Ciocalteu (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) por 5 min e 2 ml de carbonato de sódio a 75 g.l⁻¹ (Na₂CO₃) (Labosi, Paris, França).

Após incubação à temperatura ambiente por 02h, a absorbância da mistura de reação foi medida a 760 nm, contra um branco de metanol em espectrofotômetro (Série 2000, CECIL instrumentos, Cambridge, Inglaterra). O ácido gálico (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) (0-200 mg. l⁻¹) foi usado como padrão para produzir a calibração da curva. A média de três leituras foi utilizada e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de ácido gálico equivalentes GAE 100 g⁻¹ de própolis.

Estimativa dos teores de flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados usando o Método Dowd adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994). Resumidamente 5 ml de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% (Labosi, Paris, França) em metanol (Fluka Chemie, Switeland) foi misturado com o mesmo volume de uma solução de extrato hidroetanólico da própolis vermelhidroetanólico de própolis (0,01 mg ml⁻¹). Em seguida preparou-se uma solução de branco constituída por uma solução de 5 ml de extrato hidroetanólico da

própolis vermelha de própolis adicionado a 5 ml de metanol sem AlCl_3 e após foi realizada as leituras das absorvâncias a 415 nm em espectrofotômetro (Série 2000, CECIL CE 2041, Cambridge, Inglaterra). Os teores de flavonoides totais foram determinados usando uma curva padrão com quercetina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) ($0\text{-}50\text{ mg l}^{-1}$) como padrão. A média de três leituras foi usada e expressa como mg de quercetina equivalentes QE 100 g^{-1} da própolis.

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). Os extratos hidroetanólicos foram diluídos em metanol em diferentes concentrações (100, 50, 40, 20, 5 e 2 ppm), 1 ml de cada concentração foi adicionado em tubos de ensaio com 1 ml de uma solução metanólica de DPPH $60\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Após 30 min foi medida a absorvância 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 concentração do extrato hidroetanólico da própolis vermelha foi obtida a partir da relação da absorvância do mesmo com a de uma solução contendo 1 ml de metanol e 1 ml da solução de DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmos foram analisados em Software Oringin 7.0 com a finalidade de se obter um gráfico, que apresentasse valores capazes de calcular a concentração inibitória de 50% do radical DPPH (IC_{50}).

Efeito citotóxico

A avaliação da atividade citotóxica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha foi avaliado pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) em linhagem de célula de fibroblasto (L929), de acordo com a metodologia descrita por Mosman (1983). As células foram adicionadas em placa de 96 poço ($1,5 \times 10^5$ células/poço), suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratadas com extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha nas diluições de 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,81; 3,90; 1,95 e $0,97\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$. Em seguida, foram incubadas por 24h em estufa a

5% de CO₂ e 37 °C e posteriormente foram adicionados 25 µL da solução de MTT e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

Avaliação do potencial genoprotetor

A análise do efeito genoprotetor da própolis vermelha foi realizado através do ensaio cometa em linhagem de células hepáticas (hepatócitos ZF-L) (0,7 x 10⁵ células ml⁻¹), cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO®, Thermo Fisher Scientific, USA), suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células hepáticas foram expostas a 150 µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 02h, para indução da genotoxicidade (controle positivo) e a água destilada estéril (controle negativo). As culturas celulares também foram co-tratadas com concentrações crescentes de amostras de própolis (100, 250 e 500 µg ml⁻¹) e H₂O₂ (150 µM), durante 02h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ (grupo teste).

As células foram homogeneizadas em agarose 0,8% e espalhadas em lâminas preparadas, depois imersas em solução de lise por 01h, seguida de neutralização. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em tampão de eletroforese a 4 °C por 20 min, seguido de corrida por 20 min, 1,6 V cm⁻¹. Após coradas em uma solução de brometo de etídio (20 µg ml⁻¹) e analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. O grau de lesão do DNA foi identificado visualmente através da análise da cauda formada pelos fragmentos de DNA, com tamanho da cauda proporcional à dimensão do dano causado (MEZZALIRA et al., 2014). Foram analisados 100 cometas por lâmina e classificados por análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula (LOVELL et al., 1999).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4).

O efeito de proteção das amostras testes sobre a genotoxicidade induzida pelo H₂O₂ (50 µM por 02h de exposição) foi calculado de acordo com Waters et al. (1990), segundo a fórmula: % Redução = (A - B / A - C) x 100, onde A corresponde ao ID induzido pelo H₂O₂, B corresponde ao ID induzido pelo tratamento genoprotetor (H₂O₂ + amostra teste) e C corresponde ao ID atribuído ao controle negativo (água destilada).

Análise estatística

Para análise estatística dos efeitos genotóxico e genoprotetor foram utilizados os testes ANOVA e Newman-Keuls no software Prism®, versão 5.0 (GraphPad Prism Software), sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Teores de fenois e flavonoides totais

Os teores de fenois e flavonoides totais variaram, respectivamente de $74,92 \pm 0,51$ a $141,07 \pm 1,27$ mg GAE 100 g^{-1} e $2,42 \pm 0,17$ a $8,35 \pm 0,28$ mg QE 100 g^{-1} (Tabela 1). Os extratos confeccionados com própolis vermelha oriundos de Parnamirim-RN apresentaram maiores teores de fenois e flavonoides totais. Percebe-se assim que os teores variam de acordo com o local que foi obtido a própolis. Dessa forma, esse fato está de acordo com aqueles publicados na literatura, no qual afirmam que os teores de fenois e flavonoides totais presentes em uma amostra de própolis está intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (CARDINAULT et al., 2012; NUNES; GUERREIRO, 2012). Outros estudos também revelaram que a própolis vermelha coletada em Alagoas, Brasil (FROZZA et al., 2013), Cuba (PICCINELLI et al., 2005) e China (HATANO et al., 2012) apresentaram composição química variada e continham quantidades significativas de fenois e flavonoides totais. Diversos estudos destacam que muitas funções biológicas da própolis podem ser atribuídas aos seus componentes antioxidantes e anti-inflamatórios, os quais são promovidos pelos compostos fenólicos (FREITAS et al., 2008; LUSTOSA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2016). A constatação de elevados teores de fenois e flavonoides totais são indicadores de qualidade da própolis vermelha oriunda do Rio Grande do Norte, Brasil.

Atividade antioxidante

Foi observado que atividade antioxidante variou respectivamente, de $141,07 \pm 0,21 \mu\text{g ml}^{-1}$ a $54,14 \pm 1,50 \mu\text{g ml}^{-1}$, para as amostras de própolis coletadas de Mossoró-

RN e Parnamirim-RN (Tabela 1). Melo et al. (2010), classifica a atividade antioxidante de um extrato hidroetanólico da própolis vermelha como boa quando apresenta ($IC_{50} < 65 \mu\text{g ml}^{-1}$), moderada ($IC_{50} < 152 \mu\text{g ml}^{-1}$) e baixa atividade ($IC_{50} > 152 \mu\text{g ml}^{-1}$). Usando essa classificação observou-se que, no geral, a própolis vermelha do presente estudo apresenta boa atividade antioxidante. Em um estudo realizado por (FROZZA et al., 2013), a própolis vermelha coletada em Sergipe, apresentou um IC_{50} de $270 \mu\text{g ml}^{-1}$. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinheiro (2009) com própolis vermelha da mesma região geográfica, com IC_{50} de $294 \mu\text{g ml}^{-1}$. Desta forma, as amostras de própolis vermelhas do presente estudo apresentaram expressivos $IC_{50}\%$, quando comparado com os referidos autores.

Tabela 1. Média \pm desvio-padrão dos teores de fenois, flavonoides totais e atividade antioxidante de quatro amostras de própolis vermelha de *Apis mellifera* obtidas no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil

Amostra	Origem Geográfica	Fenois totais (mg GAE 100 g ⁻¹ \pm DP)	Flavonoides totais (mg QE 100 g ⁻¹ \pm DP)	RSA IC_{50} ($\mu\text{g ml}^{-1}$ \pm DP)
A	Parnamirim-RN	141,07 \pm 1,27	8,35 \pm 0,28	61,04 \pm 0,31
B	Parnamirim-RN	120,41 \pm 1,13	6,12 \pm 0,30	54,14 \pm 1,50
C	Mossoró-RN	74,92 \pm 0,51	2,42 \pm 0,17	141,07 \pm 0,21
D	Mossoró-RN	86,09 \pm 0,47	3,60 \pm 0,40	129,10 \pm 0,49

GAE: Ácido gálico equivalente; IC_{50} : Concentração inibitória de 50%; QEAC: Quercetina teor antioxidante equivalente; RSA (IC_{50}): Atividade sequestrante de radicais; DP: Desvio padrão.

Após constatar alta atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas, Aguiar et al. (2018) sugerem que esta pode ser usada como auxiliar no tratamento de doenças degenerativas, entre estas o Alzheimer. Sob o ponto de vista da composição química e atividade antioxidante, os resultados obtidos no presente estudo são bastante promissores podendo a própolis vermelha do Rio Grande do Norte constituir uma alternativa viável do ponto de vista econômico e com eficácia farmacológica.

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 produtos naturais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo (FROZZA et al., 2013). A citotoxicidade é o potencial de determinada substância em promover alteração

metabólica em cultura de células, possibilitando culminar ou não em morte celular (AWALE et al., 2008). No presente estudo constatamos que o extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis vermelha, em todas as concentrações testadas não exerceu efeito citotóxico, o que indica segurança em uso.

Efeito genoprotetor

O dano ao DNA pode interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição, além de poder levar à morte celular e induzir mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento, com isso, torna-se importante avaliar possíveis eventos que levam à instabilidade genômica, bem como àqueles ligados à manutenção da estabilidade do genoma (HOEIJMAKERS, 2009). Os estudos de genotoxicidade representam um papel importante na produção de novos fármacos, devendo ser realizados nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, a fim de se identificar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas. Os testes de genotoxicidade são utilizados como uma varredura do espectro toxicológico de substâncias naturais ou sintéticas capazes de produzir efeitos tóxicos e genotóxicos, sobre o material genético, bem como auxilia na descoberta de substâncias antígenotóxicas ou genoprotetoras para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA (AQUINO, 2010; NIWA et al., 2013).

O ensaio cometa é utilizado para detecção de danos ao DNA. Nesse ensaio, o material genético da célula é fragmentado com o uso de substâncias químicas ou radiação e a seguir é submetido a uma eletroforese, dessa forma, ocorre a migração do DNA fragmentado sobre o gel de agarose e as extremidades quebradas da molécula de DNA, de carga negativa, tornar-se livres para migrar no campo elétrico em sentido ao ânion, formando assim uma estrutura que se assemelha a um cometa. O comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa refletem o dano ao material genético (FIKROVÁ et al., 2011).

Com esta finalidade, no presente estudo, foram realizados testes *in vitro* com objetivo de avaliar o efeito genotóxico e o possível efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha do Rio Grande do Norte, contra os danos causados no DNA pelo peróxido de hidrogênio. Os resultados demonstraram que não foram encontrados efeitos genotóxicos do extrato hidroetanólico

da própolis vermelhada, uma vez que na comparação das médias dos índices de dano ao DNA da célula, utilizado a linhagem celular derivado de hepatócito (hepatócitos ZF-L (zebrafish)), em todas as concentrações testadas do extrato, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle negativo (água destilada) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Média \pm desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, após exposição das células hepáticas (hepatócitos ZF-L), por 02h em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a água destilada estéril.

Parâmetro	Concentração do Extrato hidroetanólico da própolis vermelha ($\mu\text{l ml}^{-1}$)			Controle +	Controle -
	500	250	100		
IdDNA	$8,15 \pm 2,05$ a	$7,99 \pm 2,32$ a	$6,97 \pm 2,42$ a	$158,38 \pm 13,25$ b	$7,80 \pm 2,32$ a

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0.05$) e as médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. IdDNA: Índice de dano ao DNA; controle positivo (+): Peroxido de hidrogênio (H_2O_2); controle negativo (-): Água destilada.

Também foi possível constatar que as médias dos danos promovidos ao DNA em todas as concentrações testadas do extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis foi significativamente inferior à média do controle positivo (peróxido de hidrogênio), o qual é frequentemente utilizado como substância genotóxica padrão em exposições *in vitro*, capaz de promover fragmentação do DNA. Os percentuais de redução da genotoxicidade foram $90,17 \pm 3,01$; $71,15 \pm 2,64$ e $43,07 \pm 4,99$, respectivamente, para as concentrações de 500, 250 e $100 \mu\text{l ml}^{-1}$ do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico (Tabela 3). Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a própolis vermelha apresentou efeito antígenotóxico ou genoprotetor.

Tabela 3. Média \pm desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em linhagem de hepatócitos ZF-L, co-tratadas com três concentrações de amostras de própolis e peróxido de hidrogênio

Parâmetro analisado	Concentração do extrato hidroetanólico da própolis vermelha ($\mu\text{l ml}^{-1}$)		
	500	250	100
% de redução da genotoxicidade	$90,17 \pm 3,01$	$71,15 \pm 2,64$	$43,07 \pm 4,99$

A literatura frequentemente ressalta que as propriedades biológicas da própolis estão relacionadas a presença de uma variedade de compostos biologicamente ativos, principalmente de compostos fenólicos, os quais englobam os flavonoides (NAGGAR et al., 2016). É justamente nessa constatação que a própolis vermelha analisada no presente estudo se enquadra, pois, na avaliação da composição química do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico, constatamos altos teores de compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, além de alta atividade antioxidante. Esses compostos já foram descritos por apresentar atividade antígenotóxica por causa de sua atividade antioxidante (GONTIJO et al., 2014).

Com isso, a atividade antioxidante da própolis vermelha pode ser a possível explicação para efeito genoprotetor. As substâncias bioativas com capacidade antioxidante presentes no extrato hidroetanólico da própolis vermelh provavelmente interagiram com o peróxido de hidrogênio, bloqueando seu efeito genotóxico, protegendo o DNA. Não existe na literatura estudos sobre avaliação do efeito genotóxico ou genoprotetor da própolis vermelha utilizando ensaio cometa. Tal falta ressalta o ineditismo deste estudo. A constatação do efeito genoprotetor em linhagem de hepatócitos ZF-L, permite sugerir que a própolis vermelha obtida no Rio Grande do Norte pode ser capaz de auxiliar na prevenção de doenças desencadeadas por danos ao DNA.

De acordo com os resultados obtidos, sob as condições experimentais empregadas no presente estudo, pode-se concluir que o extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha obtido no Rio Grande do Norte, apresenta expressivos teores de fenóis e flavonoides totais, expressiva atividade antioxidante e ausência do efeito citotóxico e genotóxico em todas as concentrações testadas, sendo o último, verificado pela atividade genoprotetor sobre os danos ao DNA induzido por peróxido de hidrogênio.

Referências Bibliográficas

- AGUIAR, G. R.; LEMOS, T. L. G.; DORNELAS, C. A.; SILVA, A. M.; ALMEIDA, M. C. S.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, I. R.; NASCIMENTO P. G. G. Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas. *Revista Virtual de Química*, Niterói, v. 10, n. 1, 2018. No prelo.
- AHN, M.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, England, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- ALMEIDA, D. C. Efeito protetor da própolis contra danos quimicamente induzidos no DNA. 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- AQUINO, I. Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ARAÚJO, K. S. S.; SANTOS JÚNIOR, J. F.; SATO, M. O.; FINCO, F. D. B. A.; SOARES, I. M.; BARBOSA, R. S.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARIANO, S. M. B. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 46, n. 1, p. 61-68, 2016.
- ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; POURRAT, A.; LEGRET, P. [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *Journal de Pharmacie de Belgique*, Bélgica, v. 49, n. 6, p. 462-468, 1994.
- AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Estados Unidos, v. 16, n. 1, p. 181-189, 2008.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A.; KADOTA, S. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 239-246, 2000.
- BARTH, O. M.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do Rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil. *Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico*, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, p. 277-290, 2009.

CAMPELLO, F. B.; GARIGLIO, M. A.; SILVA, J. A.; LEAL, A. M. A. Diagnóstico florestal da região nordeste. *Embrapa Tabuleiros Costeiros*, Natal, n. 2, maio 1999, Boletim técnico.

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

CARRATÚ, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, Roma, v. 41, n. 1, p. 7-16, 2005.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-8, 2013.

FIKROVÁ, P.; STĚTINA, R.; HRONEK, M.; HYŠPLER, R.; TICHÁ, A.; ZADÁK, Z. Application of the comet assay method in clinical studies. *Wiener klinische Wochenschrift*, Áustria, v. 123, n. 23-24, p. 693-699, 2011.

FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FREITAS, M. O.; PONTE, F. A. F.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 532-535, 2008.

FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, Espanha, v. 52, p. 137-142, 2013.

GARCIA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research*, v. 556, n. 1-2, p. 25-34, 2004.

GONTIJO, D. C.; FIETTO, L. C.; LEITE, J. P. V. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Paulínia, v. 16, n. 4, p. 874-880, 2014.

HATANO, A.; NONAKA, T.; YOSHINO, M.; AHN, M. R.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; KUMAZAWA S. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. *Food Science and Technology Research*, Basel, v. 18, n. 4, p. 577-584, 2012.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, England, v. 361, n. 15, p. 1475-1485, 2009.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: COZZOLINO, S. M. F. (Ed.). *Biodisponibilidade de Nutrientes*, 2012. p. 879-914.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Estados Unidos, v. 16, n. 10, p. 5434-5440, 2008.

LOVELL, M. A.; GABBITA, S. P.; MARKESBERY, W. R. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *Journal of Neurochemistry*, Aachen, v. 72, n. 2, p. 771-776, 1999.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; CABRAL, D. L. V.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. *Molecules*, Basel, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; 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. *Phytotherapy Research*, Nápoles, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEZZALIRA, B.; FUNCHAL, C.; DANI, C. Ensaio cometa: avaliação da atividade dos calcogênio. *Ciência em Movimento*, Porto Alegre, v. 2, n. 33, p. 47-55, 2014.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, v.31, n. 4, p.956-963, 2008.

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

NAGGAR, Y. A.; SUN, J.; ROBERTSON, A.; GIESY, J. P.; WISEMAN, S. Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian própolis. *Journal of Apicultural Research*, Alexandria, v. 55, n. 4, p. 305-314, 2016.

NIWA, A. M.; OLIVEIRA, R. J.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of soy phytoestrogens using micronucleus and comet assays of the peripheral blood of mice. *Genetics and molecular research*, v. 12, n. 1, p. 519-527, 2013.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Nova Jersey, v. 92, n. 2, p. 433-438, 2012.

PARK, J. H.; LEE, J. K.; KIM, H. S.; CHUNG, S. T.; EOM, J. H.; KIM, K. A.; CHUNG, S. J.; PAIK, S. Y.; OH, H. Y. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, Estados Unidos, v. 4, n. 3, p. 429-436, 2004.

PICCINELLI, A. L.; CAMPO, F. M.; CUESTA-RUBIO, O.; MÁRQUEZ, H. I.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 53, n. 23, p. 9010-9016, 2005.

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

PORTILHO, D. R.; MELO, I. A.; GUERRA, R. C.; BATISTA, H. L.; FERNANDES, C. H. C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. *Revista Científica do ITPAC*, Araguaína, v. 6, n. 2, p. 1-8, 2013.

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

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Estados Unidos, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOLTANI, E. K.; CEREUZUELA, R.; CHAREF, N.; MEZAACHE-AICHOOR, S.; ESTEBAN, M. A.; ZERROUG, M. M. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and *in vitro* effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, Estados Unidos, v. 62, p. 57-67, 2017.

TEERASRIPREECHA, D.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANCHAO, C. *In vitro* antiproliferative/ cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, London, v. 30, n. 1, p. 12-27, 2012.

YILDIRIM, A., DURAN, G. G.; DURAN, N.; JENEDI, K.; BOLGUL, B. S.; MIRALOGLU, M.; MUZ, M. Antiviral activity of Hatay Propolis against replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Medical Science Monitor*, Melville, v. 22, p. 422-430, 2016.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutation Research*, Estados Unidos, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

CAPITULO III**5 POTENCIAL HEPATOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA PELA ABELHA *Apis mellifera* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

HEPATOPROTECTIVE POTENCIAL OF RED PROPOLIS PRODUCED BY THE BEES *Apis mellifera* IN THE SEMIÁRIDES OF RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL.

Artigo submetido ao periódico
PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA -PVB

Potencial hepatoprotetor da própolis vermelha produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil¹

Jardel B. da Silva^{2*}, Kaliane A.R. Paiva², Kizzy M.F.M. Costa², Geysa A. Viana², Robério G. de Olinda³, Lorena S. Bezerra³, Carlos I.A. Freitas² e Jael S. Batista²

ABSTRACT.- Silva J.B., Paiva K.A.R., Costa K.M.F.M., Viana G.A., Olinda R.G., Santos L.B., Freitas C.I.A. & Batista J.S. 2018. [**Hepatoprotective potencial of red propolis produced by the bees *Apis mellifera* in the semiáridos of Rio Grande do Norte, Brazil**]. Potencial hepatoprotetor da própolis vermelha produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: jardelbezerra@bol.com.br

ABSTRACT This study aimed to evaluate the hepatoprotective effect of the ethanolic extract of the red propolis obtained in four municipalities of the Rio Grande do Norte semi-arid region. The *in vitro* antineoplastic potential in human hepatic carcinoma cell line (HepG2) and in normal cell lines (L929), as well as the comet assay in hepatic cell lines (ZF-L hepatocytes) was evaluated to evaluate the genotoxic and genoprotective potential of the extract. The hepatoprotective potential of propolis was evaluated *in vivo* by inducing chronic experimental hepatic lesions in rodents of the *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 species, wistar line by intraperitoneal administration of thioacetamide (TAA) at the dose of 0.2g/kg. The animals were distributed in the following experimental groups G1 (control), G2 (treated with 500mg/kg propolis ethanolic extract), G3 (treated with 500mg/kg ethanolic extract and TAA) and G4 (treated with TAA). All animals were submitted to biochemical exams and macroscopic and histological anatomopathological of the liver. The percentage of hepatocytes, sinusoids and collagen in hepatic tissue fragments were quantified through the stereological evaluation. No genotoxic effects of the extracts were observed at the concentrations of 500, 250 and 100µl/ml, and the genoprotective effect was observed, since the means of the damage promoted to the DNA in cells tested with the extract were significantly lower than the mean of the positive control (hydrogen peroxide). The results of the serum biochemical evaluation showed that serum levels of the enzyme aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) did not change in G1, G2 and G3, indicating that the administration of the extract did not cause liver toxicity, as well as exerted a hepatoprotective effect to liver damage induced by TAA. The livers of the animals of the G1 and G2 groups presented a normal morphological aspect, whereas in G3 and G4 the animals developed cirrhosis, but in G3 the livers were characterized by the presence of small regenerative nodules and level with the surface, while in G4 the livers showed large regenerative nodules on the surface. Also in the histological examination it was possible to verify that the livers of the G1 and G2 animals presented normal histological appearance, whereas the livers of the G3 animals showed regenerative nodules surrounded by thin septa of connective tissue and in the G4 regenerative nodules were surrounded by thick tissue septa fibrous connective tissue. Analysis of liver tissue by means of stereology showed that there was no statistical difference between the

percentage of hepatocytes, sinusoids and collagens in G1 and G2. While in G3 the percentage of hepatocytes, sinusoids and collagen did not differ significantly from the other groups.

INDEX TERMS: Red propolis, northeast, cytotoxicity, genoprotection, hepatoprotection.

RESUMO.- Este estudo objetivou avaliar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha obtido em quatro propriedades do semiárido do Rio Grande do Norte. Foi avaliado o potencial antineoplásico *in vitro* em linhagem de célula de carcinoma hepático humano (HepG2) e em linhagens de células normais (L929), além do ensaio cometa em linhagens de células hepáticas (hepatócitos ZF-L) para avaliar o potencial genotóxico e genoprotetor do extrato. O potencial hepatoprotetor da própolis foi avaliado *in vivo*, após aprovação da (CEUA/UERN protocolo 002/2018), através da indução de lesões hepática experimental crônica em 40 roedores, pela administração intraperitoneal de tioacetamida (TAA) na dose de 0,2g/kg. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com 500mg/kg de extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis), G3 (tratados com 500 mg/kg de extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico e TAA) e G4 (tratados com TAA). Todos os animais foram submetidos aos exames bioquímico sérico e anatomopatológico macroscópico e histológico do fígado. Foram quantificados através da avaliação estereológica os percentuais de hepatócitos, sinusóides e colágeno em fragmentos de tecido hepático. Não foram observados efeitos genotóxicos dos extratos nas concentrações de 500, 250 e 100µl/ml, sendo constatado o efeito genoprotetor, uma vez que, as médias dos danos promovidos ao DNA em células testadas com o extrato hidroetanólico da própolis vermelha foram significativamente inferiores à média do controle positivo (peróxido de hidrogênio). Os resultados da avaliação bioquímica sérica demonstraram que os níveis séricos das enzimas aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) não sofreram alterações nos G1, G2 e G3, indicando que a administração do extrato hidroetanólico da própolis vermelha não causou toxicidade hepática, bem como exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela TAA. Os fígados dos animais dos grupos G1 e G2 apresentaram aspecto morfológico normal, enquanto que nos G3 e G4 os animais desenvolveram cirrose, porém no G3 os fígados caracterizaram-se pela presença de pequenos nódulos regenerativos e nivelados com a superfície, enquanto que no G4 os fígados apresentaram grandes nódulos regenerativos na superfície. Também no exame histológico foi possível constatar que os fígados dos animais G1 e G2 apresentaram aspecto histológico normal, enquanto que os fígados dos animais do G3 apresentaram nódulos regenerativos circundados por finos septos de tecido conjuntivo e no G4 nódulos regenerativos foram circundados por espessos septos de tecido conjuntivo fibroso. A análise dos tecidos hepáticos por meio de estereologia mostrou que não houve diferença estatística entre o percentual de hepatócitos, sinusóides e colágenos nos G1 e G2. Enquanto que no G3 o percentual de hepatócitos, sinusóides e colágeno não diferiu significativamente dos demais grupos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico, nordeste, citotoxicidade, genoproteção, hepatoproteção.

INTRODUÇÃO

A própolis é formada por material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas nos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores. Trata-se de uma mistura complexa, à qual, na colmeia, as abelhas adicionam secreções salivares. Esta resina é utilizada pelas abelhas na proteção da colmeia contra a proliferação de microrganismos, além de manutenção da temperatura interna, reparo dos favos de mel, embalsamar insetos, para fechar os buracos e rachaduras (Silva et al. 2006, Carvalho-Zilse & Nunes-Silva 2012).

Diferenciados pela cor, pelo odor e pela consistência, as características da própolis estão associadas com a sua região de origem, fonte botânica e composição química. Assim a própolis pode possuir colorações que variam do verde, vermelho ao marrom, preta e amarela (Bankova 2005, Lopes 2014). A própolis vermelha está entre as mais novas de todas já classificadas, sendo o 13º tipo de própolis catalogada, que revelou composição química rica em isoflavonoides. Apresenta sua origem botânica da planta *Dalbergia ecastophyllum*, uma leguminosa rica em flavonoides. Esta espécie é relatada como sendo proveniente de Cuba e Venezuela, originada das plantas *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata*, respectivamente, família Clusiaceae (Li et al. 2008, Bueno-Silva et al. 2013).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de própolis, exportando anualmente cerca de 160 toneladas, perdendo apenas para a China. O consumo de produtos orgânicos, além de fazer bem à saúde, incentiva produtores rurais a manterem boas práticas agrícolas para preservação ambiental, utilizando de forma responsável o solo, a água, o ar e demais recursos naturais (Lima 2006, Oldoni et al. 2015).

A literatura frequentemente ressalta que as propriedades biológicas da própolis estão relacionadas à presença de uma variedade de compostos biologicamente ativos, principalmente de compostos fenólicos, os quais englobam os flavonoides, que apresentam destacadas atividades e componentes antioxidantes e anti-inflamatórios (Naggar et al. 2016). Pesquisas vem demonstrando que quantias significativas de antioxidantes na dieta atuam contribuindo para prevenção de doenças graves e crônicas e enfermidades inflamatórias, que possuem associação com a formação de radicais durante o processo de oxidação, uma vez que antioxidantes naturais podem diminuir o estresse oxidativo, conseqüentemente, promover proteção contra danos no DNA

(Carratu & Sanzini 2005, Horst & Lajolo 2012, Teerasripreecha et al. 2012, Daleprane & Abdalla 2013).

Como o fígado é o órgão principal de metabolização de compostos, muitas doenças hepáticas são decorrentes da sua exposição a substâncias tóxicas, sendo que o estresse oxidativo promovido por essas substâncias tem grande importância nos mecanismos fisiopatológicos das doenças hepáticas (Voican et al. 2011). Uma vez que a própolis possui substâncias bioativas com potencial antioxidante, anti-inflamatório e genoprotetor, o extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha pode apresentar capacidade de prevenir ou minimizar danos às células hepáticas, quando expostas a substâncias hepatotóxicas, com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial hepatoprotetor da própolis vermelha produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição e elaboração do extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis. Foram coletadas quatro amostras da própolis vermelha produzidas pela abelha *A. mellifera*, em colmeias instaladas nos municípios, de Parnamirim-RN e Mossoró-RN, no período de fevereiro a março de 2018. Para a confecção dos extratos foram utilizadas amostras de 200g da própolis, subdivididas em pequenas porções, essas foram submetidas a secagem em estufa de circulação de ar a 40°C por 48h, sendo em seguida trituradas em liquidificador doméstico. Realizou-se a maceração a frio, na proporção de 1:6,25 (m/v), para cada 1g de própolis triturada, utilizou 6,25ml de álcool cereal 70°GL. As amostras foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar devidamente identificados e agitados manualmente por 30 segundos, diariamente durante 20 dias consecutivos de infusão, conforme Garcia et al. (2004a). Na etapa seguinte, realizou-se processo de filtração do sobrenadante em papel filtro e posteriormente em algodão, para retenção de partículas insolúveis. Para remoção da cera, o filtrado permaneceu sobre refrigeração em freezer (-20°C) por 45 minutos e em seguida realizou-se nova filtração do sobrenadante em papel filtro seguido de centrifugação, obtendo-se assim os extratos etanólico da própolis.

Estimativa do teor de fenois totais. O método de Folin Ciocalteu (Singleton et al. 1999) foi utilizado para determinar o conteúdo fenólico. Cada amostra do extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis (5ml) foi diluída para 50ml com água

destilada. Esta solução (0,5ml) foi então misturada com 2,5ml de reagente 0,2N Folin Ciocalteu por 5 minutos e 2ml de carbonato de sódio a 75g/L (Na_2CO_3).

Após incubação à temperatura ambiente por 2h, a absorvância da mistura de reação foi medida a 760nm contra um branco de metanol em espectrofotômetro (Série 2000, CECIL instrumentos, Cambridge, Inglaterra). O ácido gálico (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) (0-200mg/L) foi usado como padrão para produzir a calibração da curva. A média de três leituras foi utilizada e o conteúdo fenólico total foi expresso em mg de ácido gálico equivalentes (GAE)/100g de própolis.

Estimativa do teor de flavonoides totais. O teor de flavonoides totais foi determinado usando o Método Dowd adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994). Resumidamente, 5ml de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2% (Labosi, Paris, França) em metanol (Fluka Chemie, Switserland) foi misturado com o mesmo volume de uma solução de extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis (0,01mg/ml). Em seguida, preparou-se uma solução de branco constituída por uma solução de 5ml de extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis adicionado a 5ml de metanol sem AlCl_3 e após foi realizada as leituras das absorvâncias a 415nm em espectrofotômetro (Série 2000, CECIL CE 2041, Cambridge, Inglaterra). O teor de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão com quercetina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) (0-50 mg.L^{-1}) como padrão. A média de três leituras foram usadas e expressas como mg de quercetina equivalentes (QE)/100g da própolis.

Atividade antioxidante pelo método DPPH. Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Mensor et al. (2001). Para isso, os extratos foram diluídos em metanol em diferentes concentrações (100, 50, 40, 20, 5 e 2ppm). 1ml de cada concentração foi posta em tubos de ensaio juntamente com 1ml de uma solução metanólica de DPPH $60\mu\text{mol.L}^{-1}$. Após 30 minutos foi medida a absorvância das amostras em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 520nm, tendo como branco somente o metanol.

A porcentagem de inibição referente a cada concentração do extrato hidroetanólico da própolis vermelhafoi obtida a partir da relação da absorvância do mesmo com a absorvância de uma solução contendo 1ml de metanol e 1ml da solução de DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmos 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).

Avaliação do potencial genoprotetor. A análise do efeito genoprotetor da própolis vermelha foi realizado através do ensaio cometa em linhagem de células hepáticas (hepatócitos ZF-L) ($0,7 \times 10^5$ células.ml⁻¹), cultivadas em DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media; GIBCO®), suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células hepáticas foram expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 150µM por 2h de exposição) para indução da genotoxicidade (controle positivo) e a água destilada estéril (controle negativo). As culturas celulares também foram co-tratadas com concentrações crescentes de amostras de própolis (100, 250 e 500µg/ml) e H₂O₂ (150µM), durante 2h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (grupo teste).

As células foram homogeneizadas em agarose 0,8% e espalhadas em lâminas preparadas, as quais foram mergulhadas em solução de lise por 1h, seguida de neutralização. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em tampão de eletroforese a 4°C por 20 minutos, seguido de corrida por 20 minutos, 1,6Vcm⁻¹. As lâminas, foram coradas em uma solução de brometo de etídio (20µg/ml) e analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. O grau de lesão do DNA foi identificado visualmente através da análise da cauda formada pelos fragmentos de DNA, sendo que o tamanho da cauda foi proporcional à dimensão do dano causado (Mezzalira et al. 2014). Foram analisados 100 cometas por lâmina e classificados por análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula (Lovell et al. 1999).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4).

O efeito de proteção das amostras testes sobre a genotoxicidade induzida pelo H₂O₂ (50µM por 2h de exposição) foi calculado de acordo com Waters et al. (1990), segundo a fórmula: % Redução=(A-B/A-C)×100, onde A corresponde ao ID induzido pelo H₂O₂, B corresponde ao ID induzido pelo tratamento genoprotetor (H₂O₂ + amostra teste) e C corresponde ao ID atribuído ao controle negativo (água destilada).

Análise estatística. Para análise estatística dos efeitos genotóxico e genoprotetor foram utilizados os testes ANOVA e Newman-Keuls no software Prism®

versão 5.0 (*GraphPad Prism Software*), sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

EXPERIMENTO *IN VIVO*

Animais experimentais e bioética. Quarenta ratos machos, adultos da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem wistar, com 60 dias de idade, peso médio de 200g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN). Os animais foram acondicionados em gaiolas de propilpropileno, mantidos com temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controlada ($55\% \pm 10\%$) com fotoperíodo de 12h claro/escuro, alimentados com ração comercial (Purina®) e água oferecidas *ad libitum*, durante todo o procedimento experimental. A composição da ração, segundo as informações do fabricante (Purina®) é de aproximadamente 23% de proteína bruta, 4% de lipídios totais, 5% de fibra e 12% de minerais.

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (CEUA/UERN), com número de protocolo 002/2018.

Delineamento experimental da cirrose hepática. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais e avaliados os parâmetros bioquímicos séricos indicadores de lesão hepática, parâmetros anatomopatológicos macroscópicos e histopatológicos do fígado.

Grupo I (Controle): composto por 10 animais que receberam somente água potável por gavagem, diariamente durante 14 semanas;

Grupo II: composto por 10 animais que receberam 500mg/kg de extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha por gavagem, diariamente durante 14 semanas;

Grupo III: composto por 10 animais que receberam 500mg/kg de extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha por gavagem, diariamente durante 14 semanas e 0,2g/kg de tioacetamida (TAA) intraperitoneal três vezes por semana durante o mesmo período;

Grupo IV: composto por 10 animais que receberam 0,2g/kg de TAA intraperitoneal três vezes por semana, durante 14 semanas.

A via de administração e a dose de TAA que foi utilizada para indução da cirrose hepática, foram estabelecidas conforme descrito por Amin et al. (2012). A

escolha da via de administração e a dose do extrato hidroetanólico da própolis vermelhada própolis também foi baseada em estudos prévios da literatura, sendo assim estabelecido conforme descrito por Mahmoud et al. (2015).

Coleta e processamento de amostras sanguíneas. Os animais foram anestesiados utilizando solução de cetamina (100mg/kg) e xilazina (100mg/kg), via intraperitoneal. Em seguida foi realizada laparotomia através de incisão sobre a linha alba, de modo a permitir acesso a veia hepática. De cada animal, foi realizada coleta de 3ml de sangue, utilizando-se seringa e agulha 30x0,7 mm, acondicionado em tubos sem adição de anticoagulante e em seguida inclinados e mantidos em repouso para obtenção do soro sanguíneo. O soro obtido foi armazenado em freezer (-80°C) para posterior análise bioquímica.

Análise bioquímica da função hepática. As amostras de soro sanguíneo foram analisadas para determinações dos seguintes marcadores de lesão hepática: aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina (ALB), proteína total (TP), glicose (GLIC), triglicerídeos (TRIG) e bilirrubina total (BIL). Para isso, as amostras foram testadas por meio de reagentes comerciais (LABTEST, Belo Horizonte, MG) e em seguida submetidas a leitura em aparelho analisador bioquímico por meio de espectrofotometria (BIOPLUS 2000).

Exame anatomopatológico. Imediatamente após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sob anestesia dissociativa. Em seguida, os animais foram pesados individualmente com o auxílio de balança de precisão e submetidos a necropsia, utilizando-se a técnica proposta por Vasconcelos (1996), com exame externo do animal, seguido da abertura das cavidades torácica, abdominal e craniana, realizou-se a retirada dos órgãos presentes nas respectivas cavidades e o exame macroscópico dos órgãos. O fígado de cada animal foi pesado e examinado de modo a permitir a identificação de possíveis alterações em relação ao padrão normal, considerando especialmente alterações de peso, tamanho, coloração e consistência.

Análise dos resultados. Os dados obtidos dos parâmetros bioquímicos séricos e do peso dos fígados, foram expressos como média \pm desvio padrão. Para avaliar possíveis diferenças entre os tratamentos, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de comparação múltipla de Tukey, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do programa estatístico SAS (2002).

Exame histopatológico. Fragmentos dos órgãos foram fixados em solução tamponada de formol a 10% e processados de forma rotineira para histologia, incluídos em parafina, cortados a 5µm de espessura e corados pela hematoxilina-eosina (HE). Os espécimes de tecido hepático também foram submetidos a coloração de Tricrômico de Gomori para identificação das fibras colágenas, segundo estabelecido por Andrade et al. (1999).

Avaliação estereológica. Os fígados foram seccionados seguindo um padrão de amostragem aleatória de modo uniforme e sistemático, conforme descrito por Marcos et al. (2012). Em dois fragmentos hepáticos corados pelo método de hematoxilina eosina e Tricrômico de Gomori, por animal foram avaliados aleatoriamente cinco campos microscópicos, os quais foram capturados na objetiva de 20x, utilizando um sistema de vídeo microscópio (Leica), sendo analisado cegamente um total de 20 campos microscópicos para cada animal. Sobre a imagem de cada campo, foi sobreposto um sistema de teste composto por 50 pontos de teste (PT) utilizando o software Imagem Pro-Plus (Versão 4.5.0.29.), capaz de avaliar hepatócitos, sinusóides e fibras de colágenos. A densidade volumétrica (Vv) dos referidos parâmetros foi avaliada pela seguinte fórmula: $Vv = PP/PT$ (%) (PP representa os pontos que atingem a estrutura).

Análise dos dados. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão, bem como valores mínimos e máximos através do programa estatístico SAS versão 8.0. Após análise dos pressupostos paramétricos, diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais foram obtidas por análise de variância (One –Way ANOVA), seguida por teste de Tukey. Dados percentuais sofreram transformação arco seno \sqrt{x} .

Efeito antineoplásico. A atividade antineoplásica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha e do extrato hidroetanólico da própolis vermelha foi realizada através do ensaio de citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Para a comparação e avaliação do efeito seletivo da citotoxicidade foi utilizado a linhagem de células saudáveis (fibroblastos-L929).

A avaliação da atividade citotóxica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha e do extrato hidroetanólico da própolis vermelha nas células neoplásicas (HepG2) e normais (fibroblastos-L929) foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) de acordo com a metodologia descrita por Mosman (1983). As células foram adicionadas em placa de 96 (1.5×10^5 células/poço), suplementada com 10% de soro fetal bovino e tratadas com extrato

hidroetanólico da própolis vermelhavermelho da própolis nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,81 3,90 1,95, e 0,97 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. Em seguida, foram incubadas, por 24h em estufa a 5% de CO_2 a 37°C e, posteriormente, foram adicionados 25 μL da solução de MTT, e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595nm.

Análise dos dados. Os dados médios das absorbâncias obtidos das amostras foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do pós-teste de Tukey utilizando o programa Prisma versão 5.0 (*GraphPad Software*), com nível de significância de $p < 0,05$. Também foi registrada a porcentagem de inibição xlog da concentração e determinadas suas IC_{50} e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (*GraphPad Software*).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Teores de fenois e flavonoides totais. Os teores de fenois e flavonoides totais variaram, respectivamente de 74,92 \pm 0,51 a 141,07 \pm 1,27mg GAE/100g e 2,42 \pm 0,17 a 8,35 \pm 0,28mg QE/100g (Tabela 1). Os extratos confeccionados com própolis vermelha oriundos de Parnamirim-RN apresentaram maiores teores de fenois e flavonoides totais, observando que os teores variam de acordo com o local o qual foi obtido a própolis. Dessa forma, esse fato está de acordo com aqueles publicados na literatura, no qual afirmam que os teores de fenois e flavonoides totais presentes em uma amostra de própolis estão intimamente relacionados com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (Cardinault et al. 2012, Nunes & Guerreiro 2012). Outros estudos também revelaram que a própolis vermelha coletada em Alagoas (Frezza et al. 2013), Cuba (Piccinelli et al. 2005) e China (Hatano et al. 2012) apresentaram composição química variada e continham quantidades significativas de fenois e flavonoides totais. Vários estudos destacam que muitas funções biológicas da própolis podem ser atribuídas aos seus componentes antioxidantes e anti-inflamatórios, os quais são promovidos pelos compostos fenólicos (Freitas et al. 2008, Lustosa et al. 2008, Araújo et al. 2016). Dessa forma, a constatação de elevados teores de fenois e flavonoides totais são indicadores de qualidade da própolis vermelha oriunda do Rio Grande do Norte.

Atividade antioxidante. O extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha foi submetido ao teste de atividade

antioxidante, utilizando a metodologia do sequestro do radical DPPH. 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). A capacidade sequestrante do radical DPPH é representada pelos valores de IC₅₀ (%) das amostras comparados a quercetina pura, usada como padrão de referência. Vale lembrar que quanto menor o valor da IC₅₀ (%), maior a capacidade sequestrante do radical e, portanto, maior a atividade antioxidante.

Foi observado que atividade antioxidante variou respectivamente de 141,07±0,21µg/ml a 54,14±1,50µg/ml, para as amostras de própolis coletadas de Mossoró-RN e Parnamirim-RN (Tabela 1). Melo et al. (2010) classificam a atividade antioxidante de um extrato hidroetanólico da própolis vermelha como boa quando apresenta (IC₅₀<65µg/ml), moderada (IC₅₀<152µg/ml) e baixa atividade (IC₅₀>152µg/ml). Usando essa classificação observou-se que, no geral, a própolis vermelha do presente estudo apresenta boa atividade antioxidante. Em um estudo realizado por (Frezza et al. 2013), a própolis vermelha coletada em Sergipe, apresentou um IC₅₀ de 270µg/ml. Resultados semelhantes foram obtidos por Pinheiro (2009) com própolis vermelha da mesma região geográfica, com IC₅₀ de 294µg/ml). Desta forma, as amostras de própolis vermelha do presente estudo apresentaram expressivos IC₅₀ (%), quando comparado com os referidos autores.

Após constatar alta atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas, Aguiar et al. (2018), sugerem que esta pode ser usada como auxiliar no tratamento de doenças degenerativas, dentre estas o Alzheimer. Sob o ponto de vista da composição química e atividade antioxidante, os resultados obtidos no presente estudo são bastante promissores podendo a própolis vermelha do Rio Grande do Norte constituir uma alternativa viável do ponto de vista econômico e com eficácia farmacológica.

(Tabela 1) - Média± desvio-padrão dos teores de fenóis, flavonoides totais e atividade antioxidante de quatro amostra de própolis vermelha obtidas no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

Amostra	Origem Geográfica	Fenóis totais (mg GAE/100g ± DP)	Flavonoides totais (mg QE/100g ±DP)	RSA IC ₅₀ (µg/ml±DP)
A	Parnamirim-RN	141,07±1,27	8,35±0,28	61,04±0,315
B	Parnamirim-RN	120,41±1,13	6,12±0,30	54,14±1,50
C	Mossoró-RN	74,92±0,51	2,42±0,17	141,07±0,21
D	Mossoró-RN	86,09±0,47	3,60±0,40	129,10±0,49

GAE, ácido gálico equivalente; IC₅₀, concentração inibitória de 50%; QEAC, quercetina teor antioxidante equivalente; RSA (IC₅₀), atividade sequestrante de radicais; DP, desvio padrão.

Efeito genoprotetor. Considerando que o dano ao DNA pode interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição, além de poder levar à morte celular e induzir mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento, torna-se importante avaliar possíveis eventos que levam à instabilidade genômica, bem como àqueles ligados à manutenção da estabilidade do genoma (Hoeijmakers 2009). Os estudos de genotoxicidade representam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos, devendo realiza-los nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, a fim de se identificar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas. Assim, os testes de genotoxicidade são utilizados como uma varredura do espectro toxicológico de substâncias naturais ou sintéticas capazes de produzir efeitos genotóxicos, bem como auxilia na descoberta de substâncias antígenotóxicas ou genoprotetoras para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA (Aquino 2010, Niwa et al. 2013).

O ensaio cometa é utilizado para detecção de danos ao DNA. Nesse ensaio, o material genético da célula é fragmentado com o uso de substâncias químicas ou radiação e a seguir é submetido a uma eletroforese, dessa forma, ocorre a migração do DNA fragmentado sobre o gel de agarose e as extremidades quebradas da molécula de DNA, de carga negativa, tornar-se livres para migrar no campo elétrico em sentido ao ânion, formando assim uma estrutura que se assemelha a um cometa. O comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa refletem o dano ao material genético (Fikrová et al. 2011).

Com esta finalidade, no presente estudo, foram realizados testes *in vitro* com objetivo de avaliar o efeito genotóxico e o possível efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha do Rio Grande do Norte contra os danos causados no DNA pelo H₂O₂. Os resultados demonstraram que não foram encontrados efeitos genotóxico do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha, uma vez que na comparação das médias dos índices de dano ao DNA da célula (hepatócitos ZF-L), em todas as concentrações testadas do extrato, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle negativo (água destilada estéril) (Tabela 2).

(Tabela 2) - Média \pm desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, após exposição das células hepáticas (hepatócitos ZF-L), por 2h em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a água destilada estéril

Parâmetro	Concentração do extrato hidroetanólico da própolis vermelha(μ l/ml)			Controle +	Controle -
	500	250	100		
IdDNA	8,15 \pm 2,05a	7,99 \pm 2,32 ^a	6,97 \pm 2,42a	158,38 \pm 13,25b	7,80 \pm 2,32a

IdDNA = índice de dano ao DNA, controle positivo (+) = peróxido de hidrogênio (H₂O₂), controle negativo (-) = água destilada estéril.

Também foi possível constatar que as médias dos danos promovidos ao DNA em todas as concentrações testadas do extrato hidroetanólico da própolis vermelha foi significativamente inferior à média do controle positivo (H₂O₂), o qual é frequentemente utilizado como substância genotóxica padrão em exposições *in vitro* capazes de promover fragmentação do DNA. Os percentuais de redução da genotoxicidade foram 90,17 \pm 3,01, 71,15 \pm 2,64 e 43,07 \pm 4,99, respectivamente, para as concentrações de 500, 250 e 100 μ l/ml do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (Tabela 3).

(Tabela 3). Média \pm desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em células da linhagem L929, co-tratadas com três concentrações de amostras de própolis e peróxido de hidrogênio.

Parâmetro analisado	Concentração do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (μ l/ml)		
	500	250	100
% de redução da genotoxicidade	90,17 \pm 3,01	71,15 \pm 2,64	43,07 \pm 4,99

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a própolis vermelha apresentou efeito antígenotóxico ou genoprotetor.

A literatura frequentemente ressalta que as propriedades biológicas da própolis estão relacionadas à presença de uma variedade de compostos biologicamente ativos, principalmente de compostos fenólicos, os quais englobam os flavonoides (Naggar et al. 2016). É justamente nessa constatação que a própolis vermelha analisada no presente estudo se enquadra, uma vez que na avaliação da composição química do extrato, constatamos altos teores de compostos fenólicos e flavonoides, além de alta atividade antioxidante. Os compostos fenólicos já foram descritos por apresentar atividade antígenotóxica por causa de sua atividade antioxidante (Gontijo et al. 2014). Dessa forma, a atividade antioxidante da própolis vermelha poderia ser a possível explicação

para efeito genoprotetor. As substâncias bioativas com capacidade antioxidante presentes no extrato hidroetanólico da própolis vermelh provavelmente interagiram com o H_2O_2 , bloqueando seu efeito genotóxico, protegendo assim o DNA. Não existe na literatura estudos de avaliação de efeito genotóxico ou genoprotetor da própolis vermelha utilizando ensaio cometa. Tal falta ressalta o ineditismo deste estudo. A constatação do efeito genoprotetor em linhagem de hepatócitos ZF-L, permite sugerir que a própolis vermelha obtida no Rio Grande do Norte pode ser capaz de auxiliar na prevenção de doenças desencadeadas por danos ao DNA.

Bioquímica sérica. A avaliação da função hepática dos *R. norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, nos diferentes grupos experimentais no presente estudo, consistiu na determinação dos parâmetros bioquímicos séricos, os quais demonstraram que os valores médios da enzima AST, estava dentro dos considerados normais para a espécie e não diferiram significativamente entre G1, G2 e G3, quando comparadas entre si, enquanto que no G4 houve aumento significativo dos níveis em relação aos demais grupos. Com relação aos níveis séricos da enzima ALT, observou-se que não houve diferença significativa entre G1 e G2 e aumento significativo dos valores médios G3 e G4 em relação aos demais grupos. (Tabela 4).

O fígado produz mais de 60 transaminases, sendo que duas são de maior importância clínica, a AST e ALT (Kwo et al. 2017). Suas elevações podem refletir dano ao fígado, pois quando ocorrem lesões ou destruição das células hepáticas, há liberação destas enzimas para a circulação sanguínea, sendo, portanto, indicadores sensíveis de dano hepático (Hasan et al. 2013). Dessa forma, a análise dos parâmetros bioquímicos séricos confirmou o efeito deletério da TAA, tendo em vista que os valores médios das referidas enzimas foram significativamente superiores aos valores observados nos demais grupos. Os resultados obtidos na avaliação da enzima AST demonstraram que seus níveis não sofreram alterações nos G1, G2 e G3, indicando que a administração do extrato da própolis vermelha não causou toxicidade hepática, bem como exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela TAA.

O efeito hepatoprotetor da própolis vermelha obtida em Cuba, foi avaliado por Ramirez et al. (1997) através da indução de toxicidade hepática pela administração de 64mg de álcool etílico em camundongos, os quais foram pré-tratados nas doses de 25, 50 e 100mg de extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico de própolis. No estudo, os autores verificaram que no grupo tratado com própolis, houve redução significativa dos níveis séricos da ALT e que os efeitos hepatoprotetores da própolis

foram dose-dependentes. Os autores sugerem que a própolis vermelha exerceu efeito hepatoprotetor, devido suas propriedades antioxidantes, que exerce efeito sequestrador dos radicais livres, que são capazes de promover efeitos deletérios no fígado. Harrizul et al. (2018) também observaram redução das enzimas séricas, esta redução representa menor lesão hepática, além da redução dos escores de degeneração das células do fígado e reação inflamatória em ratos pré-tratados com 280mg/kg de própolis obtidos na Indonésia, o quais foram submetidos experimentalmente a lesão hepática induzida pelo fármaco hepatotóxico ácido valpróico na dose de 350mg.

Com relação aos valores médios dos níveis séricos de albumina e proteínas totais, os valores também estavam dentro dos considerados de normalidade para a espécie e não foram observados diferença significativa entre os G1, G2 e G3. No G4 houve redução significativa dos valores (Quadro 4). Mensurações de albumina e proteínas totais, são também marcadores frequentemente utilizados como uma prova de função hepática, já que a maioria das proteínas plasmáticas são produzidas exclusivamente pelo fígado Schinoni (2006), assim, este resultado poderia indicar também ausência de hepatotoxicidade da própolis vermelha, bem como ressalta seu efeito hepatoprotetor.

Tabela 4. Valores de média \pm desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos, em ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA), G4 (tratados com TAA) e valores de referência

Parâmetros (Unid.)	GRUPOS EXPERIMENTAIS				Referencia
	G1	G2	G3	G4	
AST (U/L)	97,14 \pm 4,77a	108,33 \pm 8,38a	114,22 \pm 7,31a	184,7 \pm 19,87b	131,33 \pm 43,98
ALT (U/L)	62,16 \pm 20,21a	67,99 \pm 11,72a	114,7 \pm 15,35b	120,79 \pm 12,71b	57,55 \pm 11,95
ALB (g/dL)	2,41 \pm 0,3a	2,23 \pm 0,17a	2,1 \pm 0,49a	1,6 \pm 0,61b	2,65 \pm 0,30
PT (g/dL)	6,88 \pm 0,61a	6,80 \pm 0,30a	5,11 \pm 0,5a	3,71 \pm 0,46b	5,75 \pm 0,87
BILT (mg/dL)	0,09 \pm 0,01a	0,11 \pm 0,02a	0,10 \pm 0,01a	0,30 \pm 0,05b	0,02 – 0,18c
GLIC (mg/dL)	120,9 \pm 16,14a	114,14 \pm 17,03a	127,57 \pm 30,63a	117,80 \pm 3,0a	138,72 \pm 30,1b
TRIG (mg/dL)	47,4 \pm 10,93a	42,82 \pm 12,14a	41,2 \pm 10,36a	40,82 \pm 7,0a	46,87 \pm 18,73a

a,b,c médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$). AST: enzima aspartato aminotransferase; ALT: enzima alanina aminotransferase; ALB: albumina, PT: proteína total, GLIC: glicose, TRIG: triglicerídeos,; BILT: bilirrubina total

Referencia: C. M. Lima et al., Scientia Plena 10, 034601 (2014)

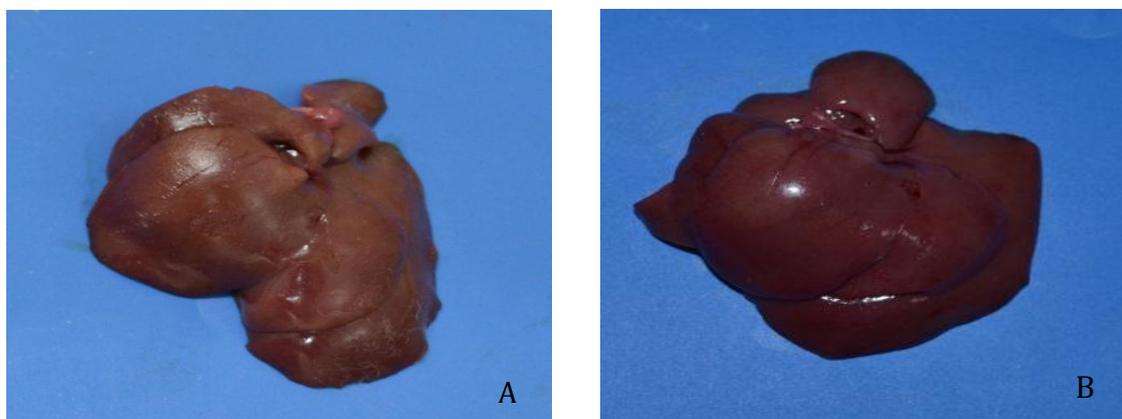
As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. Teste t de Student pareado; #teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

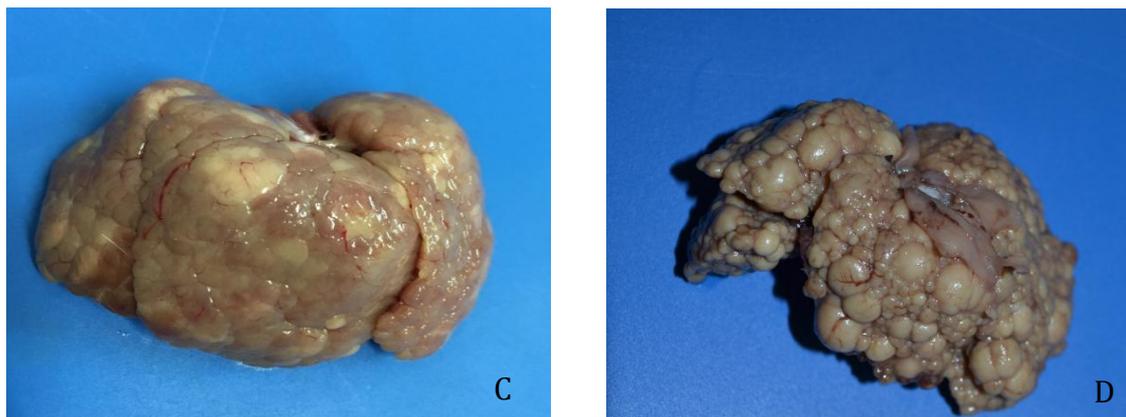
Outro ponto relevante constatado nesse trabalho foi a elevação significativa dos níveis séricos da bilirrubina no G4, enquanto que nos G1, G2 e G3 os valores mantiveram-se dentro dos considerados normais para a espécie e não diferiram entre si. Não foram observadas diferenças significativas nos valores médios de glicose e

triglicérido entre os grupos experimentais (Tabela 4). A avaliação dos níveis séricos de bilirrubina serve para diagnosticar e ou monitorar doenças do fígado como cirrose, hepatite ou obstrução biliar (Thapa & Walia 2007). A bilirrubina é um subproduto do metabolismo da hemoglobina no fígado e quando há o excesso dessa substância no sangue é sinal de que ela não está sendo corretamente metabolizada pelo fígado (Martelli 2012). Assim, a permanência dos valores séricos da bilirrubina nos G1, G2 e G3, poderia reforçar a ausência de hepatotoxicidade e efeito hepatoprotetor da própolis vermelha do Rio Grande do Norte.

Avaliação macroscópica e histológica. No exame macroscópico dos fígados coletados ao final do período experimental, foi possível constatar que os animais dos G1 e G2 apresentaram fígado com aspecto morfológico dentro da normalidade observada para a espécie, sem evidências de alterações da forma, coloração e consistência (Fig.1A, Fig.1B). Enquanto que os animais dos grupos G3 e G4 desenvolveram cirrose. Os fígados dos animais do G3 apresentaram superfície contendo pequenos nódulos nivelados com a superfície do órgão e cápsula pouco espessada, além de consistência relativamente macia e coloração amarelo esbranquiçada (Fig.1C). Os fígados dos animais do G4 apresentaram evidências de evolução de uma cirrose severa, o qual foi caracterizado pela presença de grandes nódulos regenerativos na superfície, cápsula espessada consistência endurecida e resistente ao corte, além de coloração amarronzada. (Fig.1D).

(Figura 1) - Aspecto macroscópico dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e G4 (tratados com TAA). Nota-se nos G1 e G2 fígados com aspecto morfológico normal, no G3 fígado cirrótico com pequenos nódulos regenerativos e nivelados com a superfície e no G4 fígado cirrótico com grandes nódulos regenerativos na superfície





Peso do fígado. O parâmetro relativo ao peso do fígado foi estatisticamente semelhante entre os G1 e G2. Houve aumento significativo do peso do fígado nos G3 e G4 em relação aos demais grupos. O aumento do peso dos fígados nos G3 e G4 em relação aos demais grupos provavelmente está relacionado com os aspectos patológicos característicos do tecido hepático com cirrose. Os principais processos patológicos que ocorrem na cirrose são fibrose, regeneração ou proliferação celular (Ivanova 2016), assim, frequentemente ocorre hipertrofia do fígado, tal como observado nos fígados dos animais dos G3 e G4 (Tabela 5).

(Tabela 5). Valores de média \pm desvio padrão do peso dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e G4 (tratados com TAA)

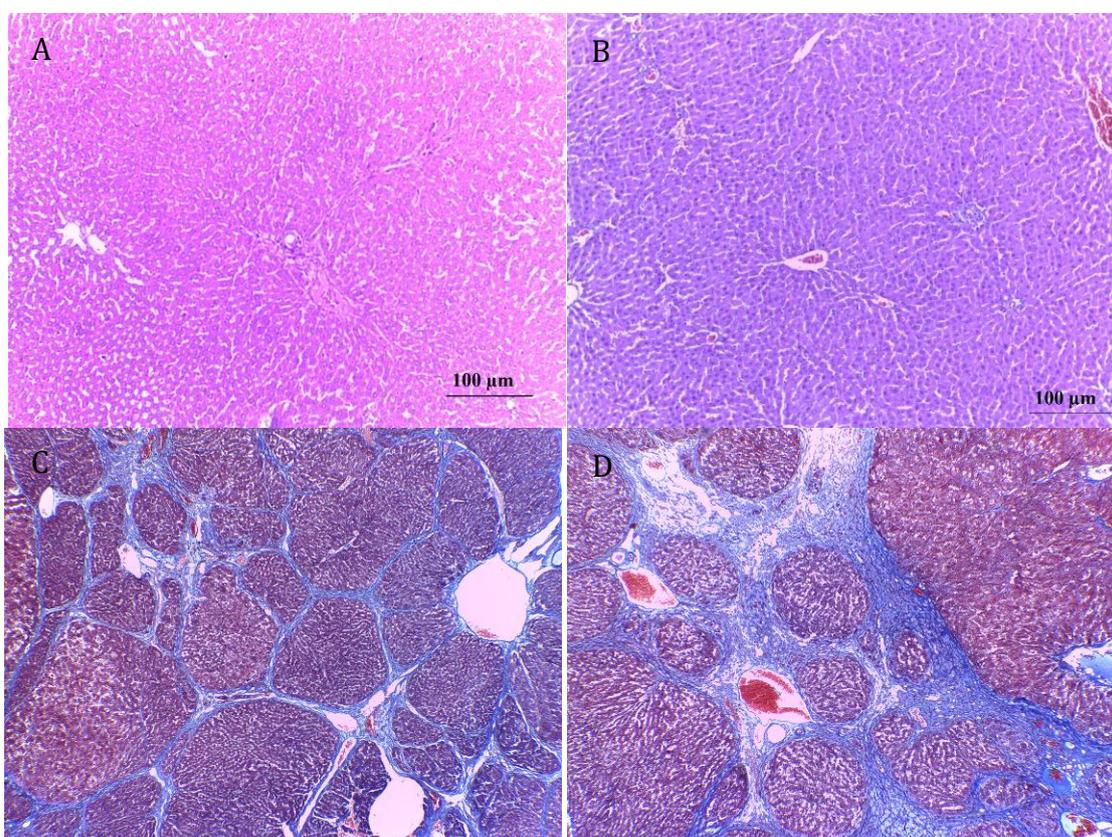
Variável (unidade)	Grupos experimentais			
	G1	G2	G3	G4
Peso (g)	10,05a \pm 2,4	8,73a \pm 0,64	15,98b \pm 1,9	17,01b \pm 0,89

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais.
Teste t de Student pareado; #teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Na avaliação histopatológica, realizada nas laminais coradas pela hematoxilina eosina (HE), evidenciou-se que o tecido hepático dos animais dos G1 e G2, não apresentaram alterações, demonstrando aspecto histológico normal (Fig.2A, Fig.2B). No fígado dos animais do G3 foi possível constatar necrose de hepatócitos, caracterizada pela presença de células com núcleo picnótico, em cariorrexia e acidofilia citoplasmática. A necrose dos hepatócitos foi mais evidente na região centro-lobular e região periportal. Foi possível também constatar focos isolados de hiperplasia de hepatócitos, presença de discreta deposição de tecido conjuntivo em torno da veia centro-lobular, além de finos septos de tecido conjuntivo envolvendo nódulos de hepatócitos e moderada hiperplasia de ductos biliares (Fig.2C). As alterações

histológicas foram mais severas no fígado dos animais do G4, onde foi possível constatar a presença de grandes nódulos regenerativos de hepatócitos circundados por espessos septos de tecido conjuntivo em ponte, além de deposição de tecido conjuntivo na região periportal e ao redor da veia centro-lobular e moderada hiperplasia de ductos biliares (Fig.2D).

(Figura 2) – Fotomicrografias dos cortes histológico dos fígados de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina. (A) Grupos experimentais G1 (controle), (B) G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha) e corados pelo método de tricrômico de Gomori (C) G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e (D) G4 (tratados com TAA). Nota-se nos G1 e G2 fígados com aspecto histológico normal, no G3, nódulos regenerativos circundados por finos septos de tecido conjuntivo e no G4 nódulos regenerativos circundados por espessos septos de tecido conjuntivo fibroso



Notáveis avanços na compreensão dos mecanismos responsáveis pela lesão hepatotóxica surgiram a partir de estudos em modelos *in vitro* ou *in vivo*. Tais modelos também permitiram comprovar as potencialidades terapêuticas e tóxicas de fármacos ou produtos naturais. As lesões patológicas causadas por hepatotoxinas em modelos experimentais podem assemelhar-se às lesões que ocorrem em diversas doenças do fígado de animais e humanos (Yogalakshmi et al. 2010). Existem vários modelos animais que reproduzem lesões hepáticas, tanto cirúrgicos como químicos. Os

procedimentos químicos são desenvolvidos por meio da administração de substâncias hepatotóxicas. Dentre diversos modelos experimentais de indução da cirrose, a TAA, droga originalmente usada como fungicida para proteger laranjas contra a deterioração e reconhecida posteriormente como potente hepatotoxina, demonstrou ser o mais promissor, por produzir padrão morfológico macroscópico e histológico, que se assemelham a cirrose em humanos (Passos et al. 2010).

O estudo do potencial hepatotóxico e hepatoprotetor de um fármaco ou produtos naturais pode ser avaliado pelo diagnóstico de lesões hepáticas, através do estudo das alterações do perfil bioquímico sérico, podendo ser confirmado pelo exame anatomopatológico do fígado (Garcia et al. 2004b).

Dessa forma, níveis elevados de AST, ALT e bilirrubina no sangue acompanhada de alterações histológicas hepáticas como degeneração, necrose e hiperplasia de hepatócitos, além de fibrose são indicadores de lesão hepatocelular induzidas pela TAA. Nos fígados dos animais pertencentes ao grupo tratado com TAA (G4), foi observado perda do padrão arquitetônico do órgão, com presença de nódulos regenerativos característicos da cirrose. A cirrose é a resposta cicatricial do fígado na maioria das doenças hepáticas inflamatórias crônicas ou avançadas, que é definida anatomicamente como um processo difuso de fibrose e formação de nódulos, acompanhando-se frequentemente de necrose hepatocelular (Brandão et al. 2006).

Assim, os resultados obtidos na avaliação do efeito hepatoprotetor da própolis vermelha do Rio Grande do Norte são promissores, no sentido da redução dos danos hepáticos induzidos experimentalmente por substâncias hepatotóxicas. Na avaliação macroscópica e histológica dos fígados dos animais do G3 foi evidenciado que o extrato hidroetanólico da própolis vermelha exerceu efeito hepatoprotetor, reduzindo a gravidade da cirrose, pois, foi possível constatar que os nódulos regenerativos característicos da cirrose foram menores e mais discretos, quando comparados aos dos animais do G4. Também se verificou que nos animais do G3, a deposição de tecido conjuntivo foi menos intensa e os septos que envolviam os nódulos regenerativos apresentaram-se finos e pouco evidentes (Fig.2C).

Análise estereológica. A análise dos tecidos hepáticos nos diferentes grupos experimentais, por meio de estereologia, mostrou que não houve diferença estatística entre o percentual de hepatócitos nos G1 e G2. No entanto, no G4 o percentual de hepatócitos reduziu significativamente em relação aos demais grupos, enquanto que o percentual de hepatócitos do G3 não diferiu do G1, G2 e G4, demonstrando que o uso da

própolis apresenta ação profilática quando há ingestão de algumas drogas hepatotóxicas. Do mesmo modo, houve redução significativa do percentual de sinusóides no G4, já nos G1, G2 e G3 não diferiu significativamente. Quanto ao percentual de colágeno presente nas amostras de tecido hepático, foi observado que não houve diferença significativa nos G1 e G2. Nos G3 e G4 verificou-se aumento significativo do percentual de colágeno e diferença significativa em relação aos demais grupos (Tabela 6).

(Tabela 6). Valores de média \pm desvio padrão dos parâmetros estereológicos dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha), G3 (tratados com extrato hidroetanólico da própolis vermelha e TAA) e G4 (tratados com TAA)

Variáveis (%)	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	G1	G2	G3	G4
Hepatócitos	77,64a \pm 5,91	77,47a \pm 3,18	64,60 ab \pm 0,50	55,68b \pm 3,70
Sinusóides	19,01a \pm 5,01	18,02a \pm 5,31	17,29a \pm 8,48	9,78b \pm 4,78
Colágeno	3,35a \pm 1,49	4,45a \pm 4,78	18,11b \pm 7,98	34,54c \pm 5,22

As médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. Teste t de Student pareado; #teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

No presente estudo, buscou-se analisar as imagens histológicas do tecido hepático pelo método estereológico. Nesse método é possível determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos bidimensionais. A estereologia é uma ferramenta que proporciona excelentes resultados, uma vez que permite a obtenção de dados confiáveis quanto a análise quantitativa de material de origem histológica (Ochs 2006). Através do referido método foi possível constatar as mudanças histológicas que ocorreram nos fígados dos ratos nos diferentes grupos experimentais. Portanto, a redução do percentual de hepatócitos do G4 pode ser atribuída ao efeito lesivo da TAA sobre essas células, enquanto que o aumento do percentual de hepatócitos no G3 em relação ao G4 pode indicar que o extrato hidroetanólico da própolis vermelha protegeu os hepatócitos do efeito deletério da TAA, ou ainda que possivelmente o extrato hidroetanólico da própolis vermelha pode ter contribuído para a regeneração de hepatócitos lesionados.

Os hepatócitos são as principais células parenquimatosas do fígado, são capazes de realizar quase todas as funções atribuídas a esse órgão, sendo considerada a célula mais multifuncional do organismo (Harzer et al. 2015).

Assim a ausência de diferença estatística do percentual de hepatócitos no G3 em relação ao G1 e G2 e aumento significativo em relação ao G4 pode indicar uma melhora morfológica que, pode resultar em uma melhora funcional do fígado, confirmando mais uma vez o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha.

As alterações dos percentuais de sinusóides também refletem nas mudanças histológicas ocorridas no tecido hepático dos ratos submetidos a diferentes protocolos experimentais. Os sinusóides hepáticos são capilares ou canais localizados no espaço entre os cordões de hepatócitos, por onde o sangue passa até atingir a veia hepática terminal. Suas paredes são revestidas de células endoteliais fenestradas que expõe os hepatócitos diretamente a uma série de hormônios, fatores de crescimento e nutrientes, que possuem ação hepatotrófica (Jesus et al. 2000). A redução significativa do percentual de sinusóides no G4 pode ser explicado pelo estabelecimento da fibrose que ocorreu com maior intensidade no referido grupo. Segundo Bedossa et al. (2003), a morte dos hepatócitos leva ao reparo por fibrose, havendo deposição do tecido fibroso, que ocorrerá ao redor dos vasos sinusóides, causando fibrose obliterativa, que como consequência pode resultar no comprometimento do fluxo sanguíneo e biliar intra-hepático. Esse conjunto de características reduz o contato do sangue com os hepatócitos, que pode afetar a disponibilidade de nutrientes e fatores hepatotróficos para os hepatócitos e prejudicar suas funções.

As alterações verificadas nos percentuais de colágenos também podem ter relação com os aspectos patológicos característicos do tecido hepático com cirrose, tendo vista que a literatura conceitua a cirrose como sendo a fase final da lesão hepática crônica em resposta a uma agressão direta ou a uma inflamação, se forma uma grande quantidade de tecido fibroso, depositando-se especificamente fibras de colágeno, dessa forma, o aumento significativo de colágeno no G4 reflete claramente essa condição. A redução significativa do percentual de colágeno de G3 em relação ao G4 reflete também o efeito hepatoprotetor da própolis vermelha do Rio Grande do Norte, o qual foi capaz de reduzir o dano aos hepatócitos, a fibrose reparativa e manutenção do padrão histológico próximo ao observado no tecido hepático normal, como verificado nos grupos G1 e G2.

Avaliação da atividade citotóxica e antineoplásica. Apesar dos estudos realizados e dos investimentos aplicados em pesquisas, à quimioterapia do câncer ainda desestimula estudiosos, devido à múltipla resistência às drogas e aos sérios efeitos

colaterais resultantes das similaridades morfológicas e fisiológicas entre as células normais e transformadas (Kamb 2005). Por esses motivos, é de grande importância identificar moléculas naturais com potencial atividade terapêutica para realização de futuros estudos clínicos e que sirvam de fonte de conhecimento para síntese de novos compostos com atividade antitumoral mais efetiva e menos tóxica (Sawicka et al. 2012).

Os testes de citotoxicidade realizados *in vitro*, são parte do *screening* inicial para determinar o possível potencial antitumoral de um produto natural (Oliveira et al. 2012). Foi avaliada a atividade antineoplásica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha do Rio Grande do Norte através do ensaio de citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), pelo teste MTT, desenvolvido por Mosman (1983), para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. O ensaio é definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade com rapidez e precisão, sendo considerado um dos testes mais utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação da atividade antineoplásica na rotina de triagem de drogas anticâncer (Oliveira et al. 2012). O teste baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tretazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Dessa forma, a quantidade de formazan medida por espectrofotometria é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Porto et al. 2011).

Diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm sido realizados com o intuito de demonstrar o potencial antiproliferativo da própolis brasileira e de seus constituintes isolados, sendo que alguns resultados se mostram favoráveis ao seu uso (Miguel & Antunes 2011, Salatino et al. 2011, Sforcin & Bankova 2011, Cardinault et al. 2012). Dentre esses estudos, pode-se citar o de Li et al. (2008), no qual demonstra que a própolis vermelha oriunda do nordeste brasileiro exibiu potencial antitumoral, relacionado a presença de flavonoides e pterocarpanos. Dentre os compostos avaliados, a flavanona 7-hidroxi-6-metoxiflavanona e a isoflavona mucronulatol exibiram potente ação citotóxica contra as linhagens de melanoma (B16-BL6), carcinoma de pulmão de Lewis (LLC), adenocarcinoma pulmonar humano (A549), fibrocarcinoma metastático (HT-1080) e LLC, A549, respectivamente. Nas flavanonas, a ausência ou presença da hidroxila no carbono 3 (C-3) pode estar envolvida no potencial citotóxico desses

compostos. Em relação às isoflavonas, o aumento no número de grupos metoxila na estrutura base, necessariamente aumentou o potencial citotóxico.

Nesse mesmo viés, Awale et al. (2008) avaliaram a atividade citotóxica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, do extrato hidroetanólico da própolis vermelha e alguns de seus compostos isolados revelando que, tanto o extrato hidroetanólico da própolis vermelha 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 desoxirribonucleico (DNA), mas as alterações morfológicas do tipo necrótica. Vale mencionar também o trabalho realizado por Frozza (2016), que constataram efeito citotóxico do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, do extrato hidroetanólico da própolis vermelha oriunda dos estados de Sergipe e de Alagoas, contra células tumorais da linhagem Hep-2. Baseado nesse resultado os autores concluíram que a própolis vermelha passa a ser uma candidata promissora para inibir o crescimento celular e contribuir para os diferentes passos relacionados com o processo de carcinogênese.

A doxorrubicina, utilizada como droga de referência, apresentou citotoxicidade em todas as linhagens celular testadas, com valores de IC_{50} que variaram de 0,4818 μ g/ml a 2,343 μ g/ml para as linhagens de L929 e HepG2, respectivamente (Tabela 7).

(Tabela 7). Valores da concentração inibitória (IC_{50}) promovidos pelo extrato hidroetanólico da própolis vermelha produzida pela abelha (*Apis mellifera*) e quimioterápico doxorrubicina frente às linhagens de células L929 e HepG2 pelo ensaio MTT após 72 horas de exposição.

COMPOSTOS	LINHAGENS CELULARES- IC_{50} μ G/ML	
	L929	HepG2
Extrato hidroetanólico da própolis vermelha	>500 μ g/ML	358 μ g/ML
Doxorrubicina	0,4818 μ g/ML	2,343 μ g/ML

*Valores de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de IC_{50} obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%

Como parâmetro de atividade antitumoral, o NCI em seu programa de triagem de drogas anticâncer, considera como compostos que possui atividade antineoplásica, quando apresentarem IC_{50} < 30 μ g/ml (Itharat et al. 2004). O índice IC_{50} = Índice de citotoxicidade correspondente à concentração capaz de reduzir o número de células a 50 %, o extrato hidroetanólico da própolis vermelha, do extrato hidroetanólico da própolis vermelha do Rio Grande do Norte apresentou IC_{50} respectivamente de >500 μ g/ml para as linhagens de

células normais (L929) e de 358 μ g/ml para células tumorais de câncer de fígado humano (HEPG2).

CONCLUSÕES

A própolis vermelha obtida no Rio Grande do Norte exerceu efeito hepatoprotetor, uma vez que *in vitro* promoveu redução do dano ao DNA em células hepáticas lesionadas pelo H₂O₂. O efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelha etanólico da própolis vermelha foi constatado em *R. norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem wistar, tratados com 500mg/kg de extratos etanólico da própolis e submetido experimentalmente a indução de cirrose por TAA, os quais apresentaram redução dos níveis séricos de enzimas indicadoras de lesão hepáticas e da gravidade da cirrose.

Agradecimentos.- À Fundação de apoio à pesquisa do Rio Grande do Norte (FAPERN) pelo apoio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas.

Declaração de conflito de interesse.- Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Aguiar G.R., Lemos T.L.G., Dornelas C.A., Silva A.M., Almeida M.C.S., Ferreira D.A., Monte F.J.Q., Braz-Filho R., Oliveira I.R. & Nascimento P.G.G. 2018. Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas. *Revta. Virtual Quim.* 10(1), no prelo.
- Ahn M., Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F. & Nakayama T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101(4):1383-1392.
- Amin Z.A., Bilgen M., Alshawsh M.A., Ali H.M., Hadi A.H.A. & Abdulla M.A. 2012. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract against thioacetamide induced liver cirrhosis in rat model. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* Article ID 241583:1-9.
- Andrade G.B., Montes G.S., Conceição G.M. & Saldiva P.H. 1999. Use of the Picosirius-polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93(3):265-272.
- Aquino I. 2010. Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 81p.
- Araújo K.S.S., Santos Júnior J.F., Sato M.O., Finco F.D.B.A., Soares I.M., Barbosa R.S., Alvim T.C., Ascêncio S.D. & Mariano S.M.B. 2016. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amaz.* 46(1):61-68.
- Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A. & Legret P. 1994. [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *J Pharm. Belg.* 49(6):462-468.
- Awale S., Li F., Onozuka H., Esumi H., Tezuka Y. & Kadota S. 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg. Med. Chem.* 16(1):181-189.
- Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2(1):29-32.
- Bedossa P., Dargère D. & Paradis V. 2003. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 38(6):1449-1457.
- Brandão D.F., Ramalho L.N., Ramalho F.S., Zucoloto S., Martinelli A.L. & Silva O.C. 2006. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. *Acta Cir. Bras.* 21(1):54-57.
- Bueno-Silva B., Alencar S.M., Koo H., Ikegaki M., Silva G.V., Napimoga M.H. & Rosalen P.L. 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 61(19):4546-4550.
- Cardinault N., Cayeux M.O. & Du Sert P.P. 2012. La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytother.* 10(5):298-304.
- Carratú E. & Sanzini, E. 2005. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 41(1):7-16.
- Carvalho-Zilse G.A. & Nunes-Silva C.G. 2012. Threats to the stingless bees in the Brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction, p.147-168. In: Florio R.M. (Eds), *Bees: Biology, Threats and Colonies*. Nova Science Publishers, New York.
- Daleprane J.B. & Abdalla D.S. 2013. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013(1):1-8.
- Fikrová P., Stětina R., Hronek M., Hyšpler R., Tichá A. & Zadák Z. 2011. Application of the comet assay method in clinical studies. *Wien. Klin. Wochenschr.* 123(23-24):693-699.
- Freitas M.O., Ponte F.A.F., Lima M.A.S. & Silveira E.R. 2008. Flavonoids and Triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. *J. Braz. Chem. Soc.* 19(3):532-535.
- Frozza C.O., Garcia C.S., Gambato G., Souza M.D., Salvador M., Moura S., Padilha F.F., Seixas F.K., Collares T., Borsuk S., Dellagostin O.A., Henriques J.A. & Roesch-Ely M. 2013. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food. Chem. Toxicol.* 52:137-142.
- Frozza C.O.S. 2016. Avaliação dos efeitos antitumorais da própolis vermelha em células humanas *in vitro*. Tese de Doutorado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. 125p.
- Garcia R.C., Sá M.E.P., Langoni H. & Funari S.R.C. 2004a. Efeito do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaalcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* "in vitro". *Acta Sci. Anim. Sci.* 26(1):69-77.
- Garcia R.C., Sá M.E.P., Langoni H. & Funari S.R.C. 2004b. Efeito do extrato hidroetanólico da própolis vermelhaalcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. *Acta Sci. Anim. Sci.* 26(1):57-67.

- Gontijo D.C., Fietto L.C. & Leite J.P.V. 2014. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato hidroetanólico da própolis vermelha aquosa das folhas de *Ocimum gratissimum* L.. Revta. Bras. Pl. Med. 16(4):874-880.
- Harrizul R., Almahdy, Nur A. & Helmi A. 2018. Propolis hepatoprotector effect on liver damage of white mice induced by valproic acid. Int. J. of Pharm. Sci. Med. 3(8):1-12.
- Harzer B., Stipp M.C. & Herrerias T. 2015. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. Revinter. 8(1):82-99.
- Hasan M., Hyder M.A. & Mohieldein A.H. 2013. Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in liver associated diseases. Euro. J. Exp. Bio. 3(2):280-284.
- Hatano A., Nonaka T., Yoshino M., Ahn M.R., Tazawa S., Araki Y. & Kumazawa S. 2012. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. Food Sci. Technol. Res. 18(4):577-584.
- Hoeijmakers J.H. 2009. DNA damage, aging, and cancer. N. Engl. J. Med. 361(15):1475-1485.
- Horst M.A. & Lajolo F.M. 2012. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos, p.879-914. In: Cozzolino S.M.F. (Eds), Biodisponibilidade de Nutrientes. Vol.1. 4ª ed. Manole, Barueri.
- Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquaye E., Burke P.J., Sampson J.H. & Raman A. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. J. Ethnopharmacol. 90(1):33-38.
- Ivanova I. 2016. Liver cirrhosis: new concepts. Scr. Sci. Med. 48(2):9-16.
- Jesus R.P., Waitzberg D.L. & Campos F.G. 2000. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. Revta. Assoc. Med. Bras. 46(3): 242-254.
- Kamb A. What's wrong with our cancer models?. Nat. Ver. Drug. Discov. 4(2):161-165.
- Kwo P.Y., Cohen S.M. & Lim J.K. 2017. ACG clinical guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. Am. J. Gastroenterol. 112(1):18-35.
- Li F., Awale S., Tezuka Y. & Kadota S. 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. Bioorg. Med. Chem. 16(10):5434-5440.
- Lima M.G. 2006. A Produção de Própolis no Brasil. São Sebastião Editora e Gráfica, São João da Boa Vista, p.120.
- Lopes M.A. 2014. Qualidade dos produtos apícolas da Guiné Bissau: mel e própolis. Dissertação de Mestrado, Universidade de Salamanca, Bragança. 91p.
- Lovell M.A., Gabbita S.P. & Markesbery W.R. 1999. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. J. Neurochem. 72(2):771-776.
- Lustosa S.R., Galindo A.B., Nunes L.C.C., Randau K.P. & Rolim Neto P.J. 2008. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Revta. Bras. Farmacogn. 18(3):447-454.
- Marcos R., Monteiro R.A. & Rocha E. 2012. The use of design-based stereology to evaluate volumes and number in the liver: a review with practical guidelines. J. Anat. 220(4):303-317.
- Martelli A. 2012. Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert: revisão de literatura. Revta. Med. Minas Gerais. 22(2):216-220.
- Melo J.G., Araújo T.A.S., Castro V.T.N.A., Cabral D.L.V., Rodrigues M.D., Nascimento S.C., Amorim E.L.C., Albuquerque U.P. 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules. 15(12):8534-8542.
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S. & Leitão S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother. Res. 15(2):127-130.
- Mezzalana B., Funchal C. & Dani C. 2014. Ensaio cometa: avaliação da atividade dos calcogênio. Ciênc. Mov. 2(33):47-55.
- Miguel M.G. & Antunes M.D. 2011. "Is propolis safe as an alternative medicine?". J. Pharm. Bioallied. Sci. 3(4):479-495.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65(1-2):55-63.
- Naggar Y.A., Sun J., Robertson A., Giesy J.P. & Wiseman S. 2016. Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian própolis. J. Apic. Res. 55(4):305-314.
- Niwa A.M., Oliveira R.J. & Mantovani M.S. 2013. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of soy phytoestrogens using micronucleus and comet assays of the peripheral blood of mice. Genet. Mol. Res. 12(1):519-527.
- Nunes C.A. & Guerreiro M.C. 2012. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. J. Sci. Food Agric. 92(2):433-438.
- Ochs M. 2006. A brief update on lung stereology. J. Microsc. 222(3):188-200.
- Oldoni T.L.C., Oliveira S.C., Andolfatto S., Karling M., Calegari M.A., Sado R.Y., Maia F.M.C., Alencar S.M. & Lima V.A. 2015. Chemical characterization and optimization of the extraction process of

- bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. J. Braz. Chem. Soc. 26(10):2054-2062.
- Oliveira C.R., Menezes A.C.S., Moraes M.O., Vieira L.M., Pereira A.G., Lima R.S. & Santos M.L. 2012. Avaliação citotóxica em três linhagens de células tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART. ex. Schult.) G. Dom. (Celastraceae). Revta. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 41(2):133-142.
- Passos C.C., Ferreira A.O., Blazquez F.J.H. & Guerra R.R. 2010. Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: revisão de literatura. Biotemas, 23(2):183-190.
- Piccinelli A.L., Campo F.M., Cuesta-Rubio O., Márquez H.I., De Simone F. & Rastrelli L. 2005. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. J. Agric. Food Chem. 53(23):9010-9016.
- Pinheiro M.S. 2009. Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju. 70p.
- Porto I.C., Oliveira D.C., Raelle R.A., Ribas K.H., Montes M.A. & De Castro C.M. 2011. Cytotoxicity of current adhesive systems: *in vitro* testing on cell cultures of primary murine macrophages. Dent. Mater. 27(3):221-228.
- Remirez D., González R., Rodriguez S., Ancheta O., Bracho J.C., Rosado A., Rojas E. & Ramos M.E. 1997. Protective effects of Propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice. Phytomedicine. 4(4):309-314.
- Salatino A., Fernandes-Silva C.C., Righi A.A. & Salatino M.L. 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. Nat. Prod. Rep. 28(5):925-936.
- Sawicka D., Car H., Borawska M.H. & Nikliński J. 2012. The anticancer activity of própolis. Folia Histochem. Cytobiol. 50(1):25-37.
- Schinoni M.I. 2006. Fisiologia Hepática. Gaz. méd. Bahia. 76(1):5-9.
- Sforcin J.M. & Bankova V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. J. Ethnopharmacol. 133(2):253-260.
- Silva R.A., Rodrigues A.E., Ribeiro M.C.M., Custódio Â.R., Andrade N.E.D. & Pereira W.E. 2006. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. Cienc. Rural. 36(6):1842-1848.
- Singleton V.L., Orthofer R. & Lamuela-Raventós R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299:152-178.
- Teerasripreecha D., Phuwapraisirisan P., Puthong S., Kimura K., Okuyama M., Mori H., Kimura A., Chanchao C. 2012. *In vitro* antiproliferative/ cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. BMC Complement. Altern. Med. 30(1):12:27.
- Thapa B.R. & Walia A. 2007. Liver function tests and their interpretation. Indian. J. Pediatr. 74(7):663-671.
- Mahmoud U.T., Abdel-Rahman M.A., Darwish M.H.A., Applegate T.J. & Cheng H. 2015. Behavioral changes and feathering score in heat stressed broiler chickens fed diets containing different levels of própolis. Appl. Anim. Behav. Sci. 166:98-105.
- Vasconcelos A.C. 1996. Necropsia e conservação de espécimes para laboratório. Cad. Téc. Esc. Vet. Zootec. UFMG. 16:5-30.
- Voican C.S., Perlemuter G. & Naveau S. 2011. Mechanisms of the inflammatory reaction implicated in alcoholic hepatitis: 2011 update. Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 35(6-7):465-474.
- Waters M.D., Brady A.L., Stack H.F. & Brockman H.E. 1990. Antimutagenicity profiles for some model compounds. Mutat. Res. 238(1):57-85.
- Yogalakshmi B, Viswanathan P. & Anuradha C.V. 2010. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. Toxicol. 268(3):204-212.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, sob as condições experimentais empregadas no presente estudo, podemos concluir:

O extrato hidroetanólico da própolis vermelhahidroetanólico da própolis vermelha não apresentou efeito genotóxico, em todas as concentrações testadas;

O extrato hidroetanólico da própolis vermelhahidroetanólico da própolis vermelha apresentou atividade genoprotetora sobre os danos ao DNA induzido através do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Os resultados dos níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão hepática (AST e ALT) indicaram que o extrato hidroetanólico da própolis vermelhahidroetanólico da própolis vermelha produzida por abelha *Apis mellifera* não causou toxicidade hepática e exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela tioacetamida (TAA);

Através da avaliação anatomopatológica dos fígados foi possível constatar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelhahidroetanólico da própolis vermelha, uma vez que as alterações macroscópicas e histológicas indicativas de cirrose foram menos expressivas nos G3 (500mg/kg de extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha por gavagem, diariamente durante 14 semanas e 0,2g/kg de (TAA) intraperitoneais três vezes por semana durante o mesmo período).

A cirrose induzida pela TAA promoveu aumento significativo do peso dos fígados nos G3 (500mg/kg de extrato hidroetanólico da própolis vermelhaetanólico da própolis vermelha por gavagem, diariamente durante 14 semanas e 0,2g/kg de (TAA) intraperitoneal três vezes por semana durante o mesmo período) e G4 (0,2g/kg de (TAA) intraperitoneal três vezes por semana, durante 14 semanas);

A análise estereológica demonstrou aumento do percentual de hepatócitos e sinusóides hepáticos, além da redução do colágeno no G3, significando uma melhor integridade morfológica do fígado e efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da própolis vermelhahidroetanólico da própolis vermelha, frente a lesão hepática induzida pela TAA;

O extrato hidroetanólico da própolis vermelhahidroetanólico da própolis vermelha não apresentou efeito citotóxico nas linhagens celulares L929 e HepG2.

AXEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO 002/18 CEEA/UERN

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
 Rua Miguel Antônio da Silva Neto, s/n - Aeroporto – Fone: (84)3318-2596
 Home page: <http://www.uern.br> - e-mail: ceua@uern.br – CEP: 59.607-360 - Mossoró –RN

PARECER CONSUBSTANCIADO CEEA/UERN

Nº PROTOCOLO (CEP)	002/18
Título do Projeto	Potencial hepatoprotetor e genoprotetor da própolis vermelha produzida por abelha (<i>Apis mellifera</i>) no Semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

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

A pesquisa é um projeto de doutorado e será desenvolvida no Biotério da UERN. O objetivo será avaliar a atividade biológica *in vivo* e *in vitro* da própolis vermelha produzida pelas abelhas *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Especificamente objetiva-se quantificar o teor de fenóis totais e flavonoides totais da própolis vermelha da abelha *Apis mellifera*; Quantificar atividade antioxidante da própolis vermelha; Avaliar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha através de marcadores bioquímicos séricos de função hepática e através de alterações anatomopatológicas do fígado de ratos Wistar na Cirrose Experimental crônica e na lesão aguda induzida por tioacetamida e paracetamol, respectivamente; Analisar as alterações histopatológicas do fígado de ratos Wistar cirróticos tratados ou não com o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha; Avaliar a atividade citotóxica da própolis vermelha em células tumorais e a capacidade genoprotetora dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha. Serão utilizados 43 Ratos Wistar machos com 60 dias de idade pesando aproximadamente 200g, provenientes do Biotério da UERN. Durante o período experimental, todos os animais permanecerão alojados em caixas de polipropileno (4 animais por caixa), sob condições ambientais controladas de temperatura (22 – 24°C) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro); recebendo ração comercial (Purina) e água *ad libitum*. Para indução de cirrose hepática crônica, ratos Wistar, receberão injeções de Tioacetamida (TAA) (0,2g/Kg, i.p.) três vezes por semana durante 14 semanas. **Grupo GC (10 animais)** – Grupo Controle receberá 0,2g / kg de tioacetamida i.p três vezes por semana, mais água potável por gavagem todos os dias durante 14 semanas; **Grupo GS (5 animais)** – Grupo Sadio que não receberá nenhum tratamento, somente submetido ao estresse da gavagem com água potável diariamente durante 8 semanas; **Grupos G1 (10 animais)** - serão submetidos ao modelo de cirrose hepática com injeções de TAA (0,2g/Kg, i.p.) três vezes por semana durante 14 semanas. Os animais começarão a receber a gavagem diariamente, dos extratos de própolis (50mg/ml/ kg), quinze dias antes do início da administração da TAA continuando durante todo o procedimento experimental. **G2 (6 animais)** - serão submetidos ao modelo de lesão hepática aguda com administração de Paracetamol (3g/kg) por gavagem. **G3 (6 animais)** – receberão somente os extratos de própolis por gavagem durante 15 dias. **G4 (6 animais)** – receberão durante 15 dias extrato de própolis por gavagem, e após esse período receberão, também por gavagem, a dose do paracetamol (3g/kg). Serão determinadas as concentrações de compostos fenólicos, de flavonoides por meio de métodos espectrofotométricos e a atividade antioxidante por DPPH. A avaliação do efeito hepatoprotetor na fase aguda e crônica será (induzidas por paracetamol e tioacetamida respectivamente), sendo aplicado teste MTT para avaliar atividade de citotoxicidade e ensaio cometa na ação de genoproteção. O cronograma encontra-se adequado.

2 – ENTEDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O protocolo 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

O Protocolo de Pesquisa encontra-se APROVADO.

Mossoró, 23 de Agosto de 2018

Paula Vsa Moreira

Paula Vivianne Souza de Queiroz Moreira
 Coordenadora CEEA/UERN