



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

KIZZY MILLENN DE FREITAS MENDONÇA COSTA

**EFEITO ANTIOXIDANTE, HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR
DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA *Partamona cupira* PRODUZIDA NO
SEMIÁRIDO NORDESTINO**

MOSSORÓ – RN

2018

KIZZY MILLENN DE FREITAS MENDONÇA COSTA

**EFEITO ANTIOXIDANTE, GENOPROTETOR E HEPATOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS DA ABELHA *Partamona cupira* PRODUZIDA NO SEMIÁRIDO
NORDESTINO**

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.

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista – UFERSA

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de
Moura – UFERSA

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 nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 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.

C837a Costa, Kizzy Millenn de Freitas Mendonça.

Avaliação do potencial hepatoprotetor da geo própolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semiárido nordestino / Kizzy Millenn de Freitas Mendonça Costa. - 2017.

93 f. : il.

Orientador: Jael Soares Batista.

Coorientador: Carlos Eduardo Bezerra de Moura.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2018.

1. *Partamona cupira*. 2. Geoprópolis.

3. Hepatoprotetor. 4. Cirrose. 5. Ratos Wistar. I. Batista, Jael Soares, orient. II. Moura, Carlos Eduardo Bezerra de, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

KIZZY MILLENN DE FREITAS MENDONÇA COSTA

**EFEITO ANTIOXIDANTE, HEPATOPROTETOR E GENOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS DA ABELHA *Partamona cupira* PRODUZIDA NO
SEMIÁRIDO NORDESTINO**

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: 13/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)
Presidente

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Wirton Peixoto Costa (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Wesley Adson Costa Coelho (FACENE)
Membro Examinador

Prof. Dr. Dejair Message (UFERSA)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KIZZY MILLENN DE FREITAS MENDONÇA COSTA – Filha de João Alves de Mendonça e Maria de Fatima Sousa de Freitas, nasceu em 16/10/1979, na cidade de Mossoró, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Coursou o ensino fundamental no Colégio Menino Deus e o ensino médio no Colégio Geo, ambas em Mossoró no Estado do Rio Grande Do Norte. Ingressou no ensino superior em 1998, na Escola Superior de Agricultura de Mossoró (ESAM), atual UFERSA, no curso de Medicina Veterinária, no qual exerceu atividades de monitoria durante toda a sua graduação, além de estágios extracurriculares na área de clínica de pequenos animais e ruminantes, bem como em laboratório clínico. Obteve o título de Médica Veterinária em 2003. Concluiu a especialização em Saúde Coletiva pela Universidade Integrada de Patos em 2009. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, na modalidade Mestrado, pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2009, sob a orientação da professora Doutora Silvia Maria Ahid. Desenvolveu pesquisa sobre efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau Famacha de ovinos infectados com nematódeos, concluiu Mestrado em 2011. É Medica Veterinária responsável do Bioterio Central da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), desde 2007. É Vice-coodernadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA/UERN. Tem experiência na Medicina Veterinária, com ênfase em Medicina Veterinária Preventiva, atuando principalmente nos seguintes temas: parasitologia, sanidade animal, cuidados com animais de laboratório, cirrose, hepatocarcinogênese, diabetes, ratos Wistar. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, na modalidade Doutorado, pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2015, sob a orientação do professor Doutor Jael Soares Batista. Desenvolveu pesquisas sobre avaliação hepatoprotetora da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semi-árido nordestino.

À minha família, em especial aos meus pais, João Mendonça e Maria de Fátima; ao meu amado esposo Emery Júnior, e aos meus filhos Fernando Augusto e Maria Fernanda, por todo amor, carinho, apoio, incentivo, paciência e dedicação. Vocês me fortalecem.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus princípio e fim de toda criatura e a Nossa Senhora Imaculada Conceição por mais essa graça alcançada.

A minha família, minha base e fortaleza. Aos meus pais João Alves de Mendonça e Maria de Fátima Sousa de Freitas pelo apoio constante, por todo amor, carinho e atenção. Aos meus irmãos Kelysson e Kirlyan, pela compreensão e incentivo;

Ao meu esposo Emery Júnior, por sua paciência e amor. Por caminhar ao meu lado sempre e me apoiar na realização dos meus sonhos e projetos. Aos meus filhos Fernando e Maria Fernanda, por todo o amor, doçura e compreensão.

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

A todos os professores do programa pelos ensinamentos transmitidos.

A Jarlene, secretária do programa, sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas, muito obrigada pela sua paciência e presteza.

Ao meu orientador Dr. Jael Soares Batista que aceitou esse desafio comigo e abraçou essa causa, MUITO OBRIGADA.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Eduardo (Cadu), pela dedicação e empenho na realização desse trabalho meu sincero agradecimento;

Ao amigo e membro da banca Dr. Wesley Adson, por toda a colaboração na melhoria deste trabalho.

Ao Dr Wirton Costa, pela disponibilidade em aceitar fazer parte deste momento tão importante para mim, através da participação como membro da banca examinadora;

Ao Dr. Dejair Message, muito obrigada pela presteza e contribuições ao trabalho;

A Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN, ao professor Lima pela compreensão nos momentos que precisei me ausentar da universidade, muito obrigada;

Aos queridos ratinhos, através de vocês pude obter resultados importantes para a ciência.

Aos amigos que muito me ajudaram nesse percurso, seja na realização desta pesquisa ou com palavras de apoio e encorajamento nos momentos que pensei em desistir, Kélia, Vitor, Rafael, Andrezza, Ana Lívia, Rayr, Jardel, Hélio, Luã, Jussier, André, Wesley;

A Kaliane, minha companheira de experimento, obrigada por todo o auxílio que me deste, sem você não sei se teria chegado até aqui. Sou grata a você de coração.

Enfim, obrigada a todos que passaram e aos que ficaram no meu caminho. Todos me ensinaram de alguma forma.

RESUMO

**EFEITO ANTIOXIDANTE, GENOPROTETOR E HEPATOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS DA ABELHA *Partamona cupira* PRODUZIDA NO SEMIÁRIDO
NORDESTINO**

COSTA, Kizzy Millenn de Freitas Mendonça. **Efeito antioxidante, genoprotetor e hepatoprotetor da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semi-árido nordestino.** 2018. 93 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2018.

Patologias hepáticas estão entre os maiores problemas de saúde de ordem mundial. Sendo assim, cresce o interesse por estudos relacionados ao efeito hepatoprotetor de produtos naturais, objetivando desenvolver novas drogas com propósito de ampliar as chances de uma maior eficiência e disponibilizar uma variedade de medicamentos. Com uma composição química complexa e rica em compostos fenólicos, a própolis produzida por *Partamona cupira* exibe um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais se destaca a alta atividade antioxidante, com notórios efeitos anti-inflamatório, antibacteriano e antineoplásico. Assim como a própolis produzida por abelhas do gênero *Apis*, a própolis produzida pelas abelhas indígenas sem ferrão possui alta atividade biológica. Dessa forma, a presente pesquisa teve por objetivos avaliar o efeito hepatoprotetor dos extratos hidroetanólico da geoprópolis produzida pela abelha cupira (*Partamona cupira*), obtido junto à meliponicultores do semiárido do Rio Grande do Norte. Para tanto, foram avaliados a composição química e atividade antioxidante da própolis da referida abelha; bem como 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 o potencial genoprotetor em linhagem de células normais de fibroblastos (L929), expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As amostras da geoprópolis apresentaram 20 compostos fenólicos, sendo fenóis e flavonoides. O extrato da geoprópolis da abelha cupira não apresentou citotoxicidade em células normais e apresentou efeito antígeno-tóxico ou genoprotetor, com percentuais de redução de genotoxicidade de 92,2%, 74,5% e 46,1%, respectivamente, para as concentrações de 500, 250 e 100µl/mL do extrato. Os resultados dos níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão hepática, indicaram que o extrato hidroalcoólico da geopropolis da abelha cupira não causou toxicidade hepática e exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela tioacetamida (TAA). Através da avaliação macroscópica e histológica dos fígados é 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 com extrato 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 geoprópolis da abelha cupira, 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 entres esses grupos. Assim, conclui-se que o extrato da geoprópolis da abelha cupira 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 tioacetamida.

Palavras-chave: Geoprópolis, *Partamona cupira*. Atividade biológica. Hepatoprotetora. Cirrose.

ANTIOXIDANT EFFECT, GENOPROTETOR AND HEPATOPROTECTIVE OF THE BEE *Partamona cupira* GEOPROPOLIS PRODUCED IN THE NORTHEAST SEMI-ARID

COSTA, Kizzy Millenn de Freitas Mendonça. **Efeito antioxidante, genoprotetor e hepatoprotetor da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semi-árido nordestino.** 2018. 93f. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Sanidade e Produção Animal) Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil, 2018.

ABSTRACT: Hepatic pathologies are among the world's greatest health problems. Thus, there is a growing interest in studies related to the hepatoprotective effect of natural products, objectifying develop new drugs in order to increase the chances of greater efficiency and to offer a variety of medicines. With a complex chemical composition and rich in phenolic compounds, the propolis produced by *Partamona cupira* exhibits a large spectrum of biological activities, among them the high antioxidant activity stands out, with notable anti-inflammatory, antibacterial and antineoplastic effects. Some studies show that just like propolis produced by bees of the *Apis* genus, the propolis produced by indigenous stingless bees also has high biological activity. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the hepatoprotective effect of the hydroethanolic extracts of the geopropolis produced by the cupira bee (*Partamona cupira*), obtained from the beekeepers of the semiarid region of Rio Grande do Norte. For that, the chemical composition and antioxidant activity of the propolis were evaluated; as well as the hepatoprotective potential, through the induction of experimental cirrhosis in rats; and also to the in vitro evaluation of the antineoplastic potential of propolis in a human hepatic carcinoma (HepG2) cell line, and as the potential genotype in normal fibroblasts cell line (L929) exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂). The samples from geopropolis presented 20 phenolic compounds, being phenols and flavonoids. The geopropolis extract of the cupira bee did not show cytotoxicity in normal cells and showed antigenotoxic or genoprotective effect, with percentages of genotoxicity reduction of 92.2%, 74.5% and 46.1%, respectively, for the concentrations of 500, 250 and 100µl / mL of the extract. The results of serum levels of hepatic injury indicative enzymes, indicated that the hydroalcoholic extract of the geopropolis of the cupira bee did not cause hepatic toxicity and had a hepatoprotective effect against the hepatic injury induced by thioacetamide (TAA). Through the macroscopic and histological evaluation of livers, it is 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 treated with extract it was possible to verify that the regenerative nodules characteristic of cirrhosis were smaller and more discrete, when compared to the animals of 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 the geopropolis of the honey bee, which was able to reduce the damage to the hepatocytes, although no statistical difference was observed in the weight of the livers in these groups, 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 the geopropolis of the cupira bee presents varied

chemical composition and promising pharmacological activities, highlighting the antioxidant, non-cytotoxic, genoprotective and hepatoprotective, since it exerted a hepatoprotective effect through the hepatic lesion induced by thioacetamide.

Key words: Partamona cupira. Geopropolis. Biological activity. Hepatoprotective. Cirrhosis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- Abelha <i>Partamona cupira</i>	22
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1- Perfil cromatográfico do extrato hidroalcolico da geoprópolis da abelha <i>Partamona cupira</i> das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte, analisadas por HPLC/DAD.....	52
---	----

CAPÍTULO III

Figura 1 - Aspecto macroscópico dos fígados de ratos wistar nos grupos experimentais G1-A (Controle), G2-B (Tratados com extratos de geoprópolis), G3-C (Tratados com extrato da geoprópolis e tioacetamida – TAA) e G4-D (Tratados com TAA).....	76
---	----

Figura 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos fígados de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina dos grupos experimentais G1-A (Controle), G2-B (Tratados com extratos de geoprópolis), G3-C (Tratados com extrato da geoprópolis e tioacetamida – TAA) e G4-D (Tratados com TAA).....	77
--	----

Figura 3 - – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar corados pelo método de picrossirius. Grupos experimentais G1- A (controle), G2 - B (tratados com extratos da própolis), G3 – C (tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 - D (tratados com TAA). Nota-se em vermelho o colágeno tipo I e verde o colágeno tipo III.....	81
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Distribuição de substâncias fenólicas da geoprópolis da abelha <i>Partamona cupira</i> das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte, analisados por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	50
Tabela 2 - Concentração (massa seca) mg/mL, teor de fenóis totais (%) (m/m), teor de flavonoides totais (mg/100g) e atividade antioxidante (%) e seus respectivos desvios padrão das quatro amostras de extratos hidroalcóolicos da geoprópolis de <i>Partamona cupira</i> das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte.....	53
Tabela 3 - Atividade antioxidante (EC ₅₀ , µg/mL), analisada através do método fotolorimétrico <i>in vitro</i> do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), das amostras do extrato hidroalcóolico da geoprópolis de <i>Partamona cupira</i> das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte e quercetina.....	54
Tabela 4 - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico da geoprópolis da abelha cupira (<i>Partamona cupira</i>) e quimioterápico doxorrubicina frente às linhagens de células L929 e HepG2 pelo ensaio MTT após 72 horas de exposição.....	56
Tabela 5 - Média ± desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato hidroalcoólico da abelha cupira (<i>Partamona cupira</i>), após exposição de células da linhagem L929, por 24 horas em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio e a água destilada.....	58
Tabela 6 - Média ± desvio padrão do percentual de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroalcóolico da abelha cupira (<i>P. cupira</i>), em células de linhagem L929 co-tratadas com três concentrações de amostras de geoprópolis e o peróxido de hidrogênio	58

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Valores de média ± desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos, marcadores de lesão hepática em ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da geoprópolis), G3 (tratados com extratos da geoprópolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).....	72
Tabela 2 - Valores de média ± desvio padrão dos parâmetros estereológicos dos fígados de	

ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da geoprópolis), G3 (tratados com extratos da geoprópolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).....79

Tabela 3 - Valores em percentual de média $\pm$ desvio padrão da quantificação de colágeno em ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da própolis), G3 (tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).....82

Tabela 4 - Valores de média $\pm$ desvio padrão do peso dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da própolis), G3 (tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).....83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 GERAL.....	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO I.....	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1 MELIPONÍDEOS	20
3.2 PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS	22
3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS	24
3.4 FÍGADO: FUNÇÕES, ESTRUTURA, INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA E NEOPLASIAS.....	25
3.5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA AGUDA E CRÔNICA.....	29
3.6 TESTES DE CITOTOXIDADE E GENOPROTEÇÃO.....	30
CAPÍTULO II	40
4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE GENOPROTETORA E ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO 1 HIDROALCOÓLICO DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA <i>Partamona cupira</i>.....	40
CAPÍTULO III.....	59
5 AVALIAÇÃO HEPATOPROTETORA DA GEOPRÓPLIS DA ABELHA <i>Partamona cupira</i> NA CIRROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TIOACETAMIDA EM RATOS WISTAR.....	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO 006/15 CEEA/UERN	91

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais exercem um importante papel para as pesquisas de novos compostos ativos farmacologicamente, mesmo com o crescimento constante da indústria de medicamentos sintéticos. Muitos fármacos clinicamente viáveis e comercialmente disponíveis com atividade antitumoral e anti-infecciosa, por exemplo, têm sua origem em produtos naturais (SHU, 1998). É crescente a preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem (PACKER, 2007).

A própolis pode ser definida como o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, em brotos, flores e exsudatos de plantas, os quais são alterados por secreções salivares destes insetos e acrescentados de cera e pólen para elaboração do produto final (FUNARI et al., 2007). A utilização da própolis na medicina popular é bastante ampla, assumindo atividade antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória, cicatrizante, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, hepatoprotetora, entre outras (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011; SFORCIN; BANKOVA, 2011; CARDINAULT, CAYEUX; SERT, 2012), e, mais recentemente, na comercialização de vários produtos contendo própolis (SALATINO et al., 2011), sendo amplamente utilizada em cosmetologia, indústria alimentícia, de bebidas e suplementos alimentares (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A composição química da própolis é mais variada naquela obtida de regiões tropicais, do que nas de climas temperados, o que reflete a variedade vegetal desses locais (FABRIS et al., 2013) e de acordo com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas, dando a este produto sua importância biológica (SAWAYA, CUNHA; MARCUCCI, 2011). Esta resina vem atraindo a atenção de cientistas pela sua composição química e seu potencial terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Destacando a caatinga, vegetação característica da região nordeste, em meio a grande biodiversidade brasileira, a busca por recursos bioativos com potencial atividade terapêutica é alvo de constantes estudos. O interesse, na biodiversidade é grande tanto em espécies vegetais como em outros produtos naturais, ressaltando-se o interesse pela própolis (BASTOS et al., 2011).

Muitas espécies de abelhas sem ferrão têm sido criadas com diversas finalidades, destacando-se a produção do mel e, ultimamente, vem aumentando a utilização da própolis para o tratamento de diversas doenças (SOUZA et al., 2009), onde, determinadas própolis já tem

atividades biológicas comprovadas (LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012; CUNHA et al., 2013).

A própolis da *Apis mellífera* é bastante estudada quanto ao seu efeito antioxidante, contra danos quimicamente induzidos no DNA e atividade hepatoprotetora, entre os pesquisadores das diversas regiões brasileiras, porém o semiárido da região nordeste tem sido pouco estudado (BANSKOTA et al., 2000; PARK et al., 2004; ALMEIDA, 2009). Os estudos relacionados ao efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com determinadas doenças incentivaram a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos celulares.

As doenças hepáticas resultantes da exposição do fígado a substâncias tóxicas são um exemplo da influência do estresse oxidativo nos mecanismos fisiopatológicos de uma patologia (VOICAN; PERLEMUTER; NAVEAU, 2011). O tratamento das hepatopatias é um dos principais desafios da medicina atualmente, e o desenvolvimento de terapias alternativas, com ênfase na investigação do potencial hepatoprotetor de produtos naturais é de suma importância (TUNON et al., 2009; WANG et al., 2011)

As doenças hepáticas são um dos maiores problemas de saúde mundialmente. Enquanto na Ásia e África as principais causas são virais e parasitárias, com destaque para a hepatite B (HVB), na Europa e na América são o consumo de álcool e a hepatite C (HVC), juntamente com a esteatohepatite não-alcóolica (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008; ZHANG et al., 2008).

Em virtude do grave problema de saúde mundial que a cirrose representa, diante dos diversos agentes etiológicos e fatores de risco, muitos pesquisadores desenvolvem estudos relacionados a esta doença, buscando testar substâncias e desenvolver métodos de tratamento para a cura ou, pelo menos, melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Para tanto, são necessários modelos animais que reproduzam o quadro de cirrose (LALEMAN et al., 2006). Sendo assim, os modelos experimentais de cirrose e a sua eficiência, são indispensáveis para o conhecimento do desenvolvimento desta doença e dos tratamentos associados a mesma (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

O modelo experimental de cirrose utilizando a tioacetamida (TAA) é amplamente utilizado, tanto para o estudo do desenvolvimento patológico como para a pesquisa do tratamento. Neste modelo, a fibrose hepática e os nódulos regenerativos são mais proeminentes e o padrão histológico se assemelha ao da cirrose em humanos. Outro fator importante é o menor índice de mortalidade da cirrose induzida por TAA, quando comparada a outros modelos experimentais, como, por exemplo, o tetracloreto de carbono (CCL4) (JEONG et al., 2001; LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

No tocante à geoprópolis da abelha *Partamona cupira*, os estudos sobre suas atividades biológicas são bastante escassos, necessitando de pesquisas que comprovem seu potencial terapêutico em diversas patologias, considerando, sobretudo, que a composição da geoprópolis é dependente da vegetação, do clima da região e da espécie de abelha. Neste sentido o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição química, a atividade antioxidante e genoprotetora do extrato hidroalcolico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* bem como sua atividade hepatoprotetora na cirrose experimental induzida pela TAA.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D. C. **Efeito protetor da própolis contra danos quimicamente induzidos no DNA**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Patologia)-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2009.
- BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000.
- BASTOS, E. M. A. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.
- CARDINAULT, N.; CAYEUX, M. O.; SERT, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.
- CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 13, p. 23, 2013.
- FABRIS, S. et al. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and brazilians propolis. **Pharmacology and Pharmacy**, v. 4, p. 46-51, 2013.
- FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 eta and TNF-alpha. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 709-715, 2012.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 206-212, 2007.
- JEONG, D. et al. Expression patters of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCL₄ or thioacetamide. **Journal of Gastroenterology**, v. 36, n. 1, p. 24-32, 2001.
- LALEMAN, W. et al. A stable model of cirrhotic portal hypertension in rat: thioacetamide revisited. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 4, p. 242-249, 2006.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.

LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 11 p. 108, 2011.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARK, Y. K. et al. "Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern brazilian propolis." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 2004.

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

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

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

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.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of Natural Products**. v. 61, p. 1053 – 1071, 1998.

SHUPPAN,D.; AFDHAL,N.H. Liver cirrhosis. **Lancet**. v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

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

TUNON, M. J. et al. Na overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 15, n. 25, p. 3086-3098, 2009.

VOICAN, C. S.; PERLEMUTER, G.; NAVEAU, S. Mechanisms of the inflammatory reaction implicated in alcoholic hepatitis, update. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, Paris, v. 35, n. 6-7, p. 465-474 2011.

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.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial hepatoprotetor do extrato hidroalcólico da geoprópolis produzida pela abelha *Partamona cupira* no semiárido do Rio Grande do Norte, na cirrose experimental induzida por tioacetamida em Ratos Wistar bem como sua atividade antioxidante e genoprotetora

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a composição química do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira*;

Investigar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira*;

Averiguar potencial hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *cupira* em ratos com cirrose induzida;

Avaliar *in vitro* o potencial antineoplásico do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *cupira* em linhagem de células de carcinoma hepático humano (HepG2);

Avaliar *in vitro* o potencial genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *cupira* em linhagem de células L929, expostas ao peróxido de hidrogênio;

Quantificar a densidade do volume de hepatócitos, colágeno e sinusóides do fígados dos ratos cirróticos que receberam e os que não receberam extratos de geoprópolis;

Mensurar os tipos de fibras colágenas dos fígados de ratos cirróticos que receberam e os que não receberam extratos da geoprópolis.

CAPÍTULO I

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MELIPONÍDEOS

O Brasil é rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão”, ou ainda, “meliponíneos”. As abelhas da subfamília *Meliponinae* (*Hymenoptera*, *Apidae*), tribo Meliponini, são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, ou ainda meliponídeos, assim chamadas por possuírem o ferrão atrofiado. São abelhas sociais nativas de ampla distribuição geográfica no Brasil, com mais de 250 espécies, distribuídas em 27 gêneros. Na Caatinga, cerca de 18 espécies da tribo Meliponini já tiveram sua ocorrência registrada (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Os meliponídeos tem importância econômica e cultural nas regiões onde ocorrem, sendo polinizador de diversas plantas nativas (serviço ambiental), além de produzir mel, cera e própolis que são comercializados, tornando-se alternativa para aumentar a renda dos pequenos produtores rurais e aos agricultores familiares. A meliponicultura faz parte da tradição de criação de animais silvestres de comunidades indígenas, remanescentes de quilombos, além de outros povos tradicionais e de agricultores de economia familiar. O mel produzido pelos meliponídeos é apreciado pela população local pela ótima qualidade de sabor, cheiro, cor, valor nutricional e terapêutico (CÂMARA et al., 2004). Por isso, a demanda do mel das abelhas sem ferrão vem aumentando no mercado, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diversas regiões do Brasil (SOUZA et al., 2004).

Com a degradação dos ambientes naturais causada pelo homem, muitas populações de abelhas foram afetadas, sendo que das 250 espécies de abelhas sem ferrão descritas no Brasil, aproximadamente 100 estão em perigo de extinção (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1997). O desmatamento, as queimadas, o uso de insumos químicos, a introdução de espécies vegetais exóticas e as mudanças climáticas são os principais fatores responsabilizados pela redução de comunidades de polinizadores, principalmente de abelhas nativas (NOGUEIRA; COUTO, 2006). Atividades antrópicas e o corte de madeira que levam à destruição de árvores usadas na nidificação de abelhas nativas; associado à redução da oferta de alimentos são apontadas como importantes causas do declínio das

populações de abelhas sem ferrão em vários habitats perturbados, inclusive naqueles fragmentados. Em algumas regiões do Nordeste Brasileiro, principalmente na Caatinga, os meleiros têm destruído sistematicamente várias árvores no processo de coleta de mel para comer ou vender (CASTRO, 2005).

No Brasil, antes da introdução da *Apis mellifera* as abelhas criadas eram exclusivamente as abelhas nativas sem ferrão. A criação em cortiços (troncos de madeira), cabaças, potes de barro e caixas de madeira era uma atividade tradicional em muitas comunidades indígenas e não indígenas. No entanto, o interesse por essa prática foi diminuindo gradativamente, em muitas áreas, onde a destruição dos habitats é bastante intensa (CASTRO, 2005). Em alguns estados da região Nordeste do Brasil, atualmente, verifica-se o retorno à exploração de espécies de abelhas indígenas sem-ferrão. Os meliponicultores exploram em cortiços ou em caixas racionais espécies produtivas, adaptadas às condições de vegetação e clima locais, como: Tiúba (*Melipona compressipes*) no Maranhão e Piauí (MONTE et al., 2013), Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) no Ceará (CRUZ et al., 2004), Mosquito (*Plebeia* sp.) e Uruçu (*Melipona scutellaris*) em Pernambuco e Paraíba (GOIS et al., 2010) e Cupira (*Partamona* sp.) no Rio Grande do Norte (PEREIRA et al., 2011).

Atualmente, a meliponicultura é uma prática que alcança destaque no Estado do Rio Grande do Norte, sendo em algumas ocasiões atividade econômica complementar bem estabelecida, pois seus produtos (mel, pólen, própolis e geoprópolis) são bastante apreciados pela população local devido seus valores nutricionais e terapêuticos e, portanto, valorizados economicamente (SOUZA et al., 2004). Em trabalho de levantamento do tipo de espécies de abelhas indígenas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte, (PEREIRA et al. 2011) constataram que a espécie *Melipona. subnitida* (abelha jandaíra) foi a mais frequentemente criada, representando 86% das espécies exploradas, seguido das espécies *Plebeia aff. flavocincta* (abelha mosquito), que responderam pelas frequências de 4,9%, *Melipona. asilvae* (abelha manduri) com a frequência de 4,3%, *Frieseomelitta doederleini* (abelha amarela) com a frequência de 3,4%, e *Partamona cupira* (abelha cupira) com frequência de 1,4%.

A *Partamona* (SCHWARZ, 1939) é um gênero de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) exclusivamente neotropical e de ampla distribuição geográfica, que ocorre desde o sul do Brasil até o México Central. Estes insetos podem ser encontrados em ambientes de matas, cerrado, caatinga ou mesmo em regiões montanhosas (cordilheiras

andinas e centro-americanas), a mais de 2.000 m de altitude; algumas espécies toleram bem o ambiente antrópico (BARRETO; CASTRO, 2007). Segundo Camargo e Pedro (2003) o gênero *Partamona* tem 32 espécies descritas e nidifica em sua maioria em cupinzeiros, o que justifica o nome popular de “cupira”. A *Partamona cupira* é uma espécie que ocorre no Rio Grande do Norte e em áreas da caatinga por todo o Nordeste, sendo mais rara nas áreas de transição. São abelhas relativamente mansas e nidificam em cupinzeiros de barro normalmente aéreos. A entrada do ninho é pouco ornamentada e com bordo liso sem reentrâncias. São abelhas escuras com asas foscas e tegumento liso, polido e brilhante (HRNCIR; KOEDA; FONSECA, 2017).

Figura 1 – Abelha *Partamona cupira*



Fonte: <https://meliponariopordosol2017.blogspot.com>

3.2 PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

A própolis é utilizada por diferentes civilizações desde a antiguidade na medicina popular e mais recentemente, no comércio. Vários produtos contendo própolis são vendidos, incluindo sabonetes e cremes dentais (SALATINO et al., 2011). Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, em brotos, flores e exsudatos de plantas, os quais são alterados por secreções salivares destes insetos e acrescentados de cera e pólen para elaboração do produto final (BRASIL, 2001). Algumas espécies de meliponídeos, como a jandaira (*Melipona subnitida*) e abelha mosquito (*Plebeia* aff. *flavocinta*), adicionam à própolis terra e/ou barro, a qual é utilizada na construção da entrada e das divisórias do local de nidificação da

espécie, vedação de frestas e no reparo de danos e defesa da colmeia (CUNHA, 2013). A palavra própolis é derivada do grego e significa em defesa da comunidade (*pro*, em defesa, e *polis*, cidade ou comunidade). As abelhas têm a própolis como a sua "arma química" mais importante, utilizando-a contra micro-organismos patogênicos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colmeia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (MIGUEL; ANTUNES, 2011).

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

Durante as últimas décadas, muitas atividades biológicas foram atribuídas a própolis, sendo confirmadas cientificamente e reportadas em artigos científicos, tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetor, antitumoral, cicatrizante no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras, dentre outros (SFORCIN; BANKOVA, 2011; CARDINAULT et al., 2012; FABRIS, 2013; SALGUEIRO; CASTRO, 2016; KUNRATH et al., 2017; AFROUZAN; SEDIGHEH; HAGHI, 2018; PONTES et al., 2018). Embora observado crescente aumento de pesquisas com própolis, ainda são escassas revisões críticas sobre o uso de produtos à base de própolis no contexto clínico (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Visando compreender a bioatividade da própolis, se faz necessário caracterizar quimicamente os extratos a serem testados nos estudos de atividade biológica, pois as propriedades farmacológicas da própolis estão diretamente relacionadas à sua composição química, que por sua vez depende da flora local e sazonalidade (EDUARDO, 2014).

A própolis e geoprópolis, produzido pelas abelhas nativas sem ferrão tem suscitado crescente interesse dos pesquisadores, que vem desenvolvendo recentes estudos voltados para o conhecimento de sua composição química e atividades farmacológicas (FIANCO et al., 2013, SOUSA et al., 2015, SILVA et al., 2016, BATISTA et al., 2016, BONAMIGO et

al., 2017). Dentre esses estudos, convém destacar o realizado por SILVA et al., (2016), onde os autores detectaram em extratos hidroalcolico de geoprópolis da abelha *P. aff. flavocincta*, produzidas no semiárido do Rio Grande do Norte apresenta altos teores de fenóis e flavonoides totais e capacidade antioxidante, além de destacada atividade antibacteriana e influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais.

3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS

Própolis de diferentes localidades apresentam em sua composição química uma grande diversidade de substancias, com mais de 200 já identificadas, dentre estas se inclui os ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Essa complexidade permite alguns autores afirmarem que a composição química heterogênea da própolis explicaria sua eficácia, relacionando os flavonoides e os ácidos fenólicos, a uma grande contribuição para as atividades biológicas da própolis (WALKER; CRANE,1987; BANKOVA et al., 2002; KARTAL; KAYA; KURUCU, 2002; FUNARI; FERRO,2006).

É necessário aprofundar os conhecimentos no que diz respeito aos componentes de interesse presentes no extratos a serem testados em pesquisas de atividade biológica para que haja uma melhor compreensão da bioatividade que a própolis apresenta (SFORCIN; BANKOVA, 2011), visto que essas atividades estão diretamente relacionadas com os teores dos componentes químicos (SILVA et al., 2006). A diversidade da flora brasileira favorece a uma vasta variabilidade na composição química das própolis produzidas no Brasil, diferentemente do que acontece nas condições dos países europeus (NUNES; GUERREIRO, 2012).

Os compostos fenólicos encontrados na própolis estão entre os grupos mais relevantes que apresentam alta atividade biológica. Destes destacam-se os flavonoides, que são classificados quimicamente, de acordo com a presença ou ausência de um anel central, de uma dupla ligação e de um grupo de hidroxila ligada ao anel (MARUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Os flavonoides, conjuntamente com os ácidos carboxílicos modificados são intitulados de componentes estratégicos, pois atuam contra vários microrganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Park et al., (2004) avaliaram diferentes tipos de própolis de três regiões brasileiras e as classificaram de acordo com critérios de similaridade físico-química em doze grupos.

Evidenciaram seis tipos de amostras de própolis na região Nordeste, uma na região Sudeste e cinco na região Sul. Após avaliação da composição química qualitativa e quantitativa de flavonoides e compostos fenólicos das amostras, os referidos autores verificaram grande variação tanto qualitativa como quantitativa dos compostos fenólicos presentes nas amostras de própolis, na forma de extrato etanólico, oriundos de diversas regiões brasileiras.

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

3.4 FÍGADO: FUNÇÕES, ESTRUTURA, INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA E NEOPLASIAS

O fígado é o maior órgão glandular do corpo e o segundo órgão em tamanho, ficando atrás somente da pele, pesando ao redor de 5% do peso corporal nos animais jovens e 3% nos adultos. O fígado recebe aproximadamente 25% do débito cardíaco total (GIANNINI; TESTA; SAVARIN, 2005). Está localizado na parte mais alta da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma. Tem formato de prisma, com ângulos arredondados, dando-lhe aparência ovalizada. Sua coloração é vermelho-escuro, tendendo ao marrom arroxeado. É formado por três superfícies: superior ou diafragmática, inferior ou visceral e posterior (ALDABA-MURATO et al., 2012). Um tecido fibroso divide o órgão em unidades funcionais, chamadas lóbulos, os quais são compostos por hepatócitos (MAHER, 1997). Microscopicamente, cada lóbulo é nutrido pelo sangue que entra pelas veias periféricas. Essas veias incluem pequenas ramificações das artérias hepáticas e ramificações da veia portal, que trazem nutrientes e outras substâncias do intestino. O sangue entra em canais chamados sinusóides, onde se encontram todas as células do lóbulo. Cerca de 70% da área de superfície de cada hepatócito está voltada para os sinusóides, maximizando a troca entre o sangue e as células. Os capilares sinusóides desembocam em uma veia localizada no centro do lóbulo chamada veia centrolobular a qual é o ramo inicial da veia hepática. A veia centrolobular encontra-se no centro do lóbulo, sua parede é muito delgada, sendo constituída praticamente apenas por endotélio apoiado em fibras reticulares (ALDABA-MURATO et al., 2012).

Aproximadamente 15% da membrana do hepatócito está voltada para os canalículos biliares, pequenos canais dentro dos quais a bile é secretada. Os sinusóides estão protegidos por macrófagos, chamados células de Kupffer, que tem a função de realizar resposta inata (DIEHL, 1993). Em decorrência de sua localização anatômica estratégica, este órgão é o principal alvo para uma variedade de agentes nocivos que induzem inflamação, fibrose, necrose e finalmente, cirrose (ALDABA-MURUATO, 2012).

O fígado realiza numerosas funções vitais, essenciais à manutenção da homeostasia corporal. Calcula-se que este órgão efetua aproximadamente mais de 500 funções diferentes. O fígado apresenta funções de processamento e síntese de substâncias que aliam-se à capacidade de armazenamento, desintoxicação 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 (GIANNINI; TESTA; SAVARIN, 2005).

Dentre as diversas funções do órgão, destacam-se a síntese de proteínas plasmáticas como a albumina, aminoácidos não-essenciais, fibrinogênio e fatores da coagulação; é responsável pela lipogênese, sintetiza lipoproteínas, triglicérides, colesterol e fosfolípídios; sintetiza e armazena as vitaminas A (a partir do β -caroteno), D, E, K (lipossolúveis) e 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, 2010).

O fígado é vulnerável a uma grande variedade de lesões metabólicas, tóxicas, infecciosas, circulatórias e neoplásicas. A enorme reserva funcional e a capacidade de regeneração do fígado diminui muito o impacto das lesões. O fígado responde injúrias teciduais com a entrada de hepatócitos quiescentes no ciclo celular (JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000). Devido à sua capacidade de regeneração, a remoção de 70% a 80% pode não provocar prejuízos à função hepática e não resultar em nenhum efeito clínico notável, pois a massa hepática regenera em pouco tempo (CARLTON; 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 manifestação clínica. Desse modo, a maior parte das hepatopatias só são diagnosticadas quando apresentam lesões avançadas ou doença terminais, o que complica o tratamento e agrava o prognóstico, que poderá se tornar desfavorável (WEBSTER, 2004).

Embora o fígado seja um órgão que apresenta enorme reserva funcional e notável capacidade de regeneração, quando o agente lesivo age intensamente, e por um período prolongado, as células hepáticas perdem a capacidade de adaptação e com a propagação das lesões, ocorrem degeneração e morte celular que pode resultar em insuficiência hepática (JALAN et al., 2012). A insuficiência hepática é conceituada como sendo perda da função hepática normal como consequência de uma lesão hepática aguda ou crônica, sendo caracterizada por ampla variedade de apresentações clínicas patológicas, dentre as quais incluem: colestase, icterícia, encefalopatia, alterações da coagulação sanguínea, edema e fotossensibilização (CARLTON; MCGAVIN, 1998; PATIDAR; BAJAJ, 2015).

A insuficiência hepática aguda define-se como um rápido desenvolvimento de insuficiência hepática, em indivíduos sem doença hepática prévia ou com doença hepática compensada (SALIBA; SAMUEL, 2013). A lesão 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 vírica predomina nos países em vias de desenvolvimento (YOON, 2016).

Em casos de agressões contínuas e por longos períodos às células hepáticas, desenvolvem-se extensas lesões hepatocelulares e gradual aumento acentuado da quantidade de tecido conjuntivo fibroso que substituirá os hepatócitos danificados (CARLTON; MCGAVIN, 1998). Assim a fibrose é a resposta cicatricial do fígado na maioria das doenças hepáticas inflamatórias crônicas ou avançadas. O resultado final é o acúmulo de matriz extracelular e a substituição do colágeno tipo IV, pelo colágeno tipo I, dentro do espaço de Disse (BRANDÃO et al., 2006). A fibrose hepática é considerada um processo patológico progressivo, o qual envolve múltiplos eventos celulares e moleculares levando à deposição de matriz extracelular; quando esse processo é combinado com regeneração e reparo ineficaz, ocorre uma distorção do padrão anatômico normal, resultando no quadro anatomopatológico de cirrose (ZHENG et al., 2002).

No Brasil, dados da Pesquisa Nacional de Saúde (2015) mostraram que a prevalência do consumo abusivo de álcool foi 13,7% na população adulta – 3,3 vezes superior entre os homens (21,6%) em relação às mulheres (6,6%). 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 consumo abusivo do álcool ainda é considerado a principal causa de cirrose, mas nota-se um

aumento de incidência das hepatites de caráter crônico, contribuindo para os altos índices de mortalidade da cirrose (MELO et al., 2017).

Devido à grande quantidade de componentes celulares que compõe o fígado, o órgão apresenta amplo espectro de tumores epiteliais, mesenquimatosos e vasculares. Assim, os diferentes tipos de tumores hepáticos primários podem emergir de virtualmente todos os componentes celulares do fígado: hepatócitos (carcinoma hepatocelular), epitélio dos ductos biliares (colangiocarcinoma), células do estroma (sarcomas) e células neuroendócrinas (carcinoide) (HONGMING et al., 2015).

As neoplasias malignas do fígado e das vias biliares intra-hepáticas representam, em conjunto, a terceira causa de óbito por câncer no mundo. A maioria dos casos ocorre nos países em desenvolvimento, particularmente no sexo masculino e em determinadas regiões da África Subsaariana e do sudeste da Ásia (PAN, 2011). O carcinoma hepatocelular, é uma neoplasia epitelial derivada dos hepatócitos mais frequente do fígado, responsável por mais 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.). Nas populações com elevada ocorrência desse tipo de câncer, os principais fatores de risco são a infecção crônica pelo vírus da hepatite B e C, o consumo de álcool e a exposição à aflatoxina (TROJANA; ZANGOSB; SCHNITZBAUERB, 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). Esses efeitos se dão pela baixa seletividade dos fármacos às células tumorais, onde as células normais mais afetadas são as que proliferam rapidamente, como as da pele, do trato gastrointestinal e do sangue. Nesse contexto o principal objetivo dos estudos na quimioterapia é a busca por novos fármacos seletivos que sejam capazes de destruir apenas células tumorais, preservando 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 possibilitam descobertas de compostos bioativos com atividade antitumoral mais efetiva e menos tóxica (LOTUFO et al., 2010).

3.5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA AGUDA E CRÔNICA

Notáveis avanços em nossa compreensão dos mecanismos responsáveis pela lesão hepatotóxica surgiram a partir de estudos moleculares, celulares e funcionais em animais. 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; PERIYASAMYB; PERIYASAMYB, 2010). Existem vários modelos animais que reproduzem lesão hepática, tanto cirúrgica como química. Os procedimentos químicos são desenvolvidos por meio da administração de substâncias hepatotóxicas, sendo as mais frequentemente utilizadas o paracetamol (APAP), a tioacetamida (TAA) e o tetracloreto de carbono (CCl₄) (HUANG et al., 2011; PASSOS et al., 2010).

O Tetracloreto de Carbono (CCl₄) é reconhecido como hepatotoxina clássica, sendo considerada a melhor substância para induzir lesão hepática, comumente utilizado como modelo para testar o efeito hepatoprotetor de drogas e substâncias naturais e para investigação de hepatotoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo, tanto para estudos *in vivo* quanto *in vitro* (HUANG et al., 2011). O tratamento com o CCl₄ pode induzir à lesão hepática pela formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO), que ligam-se a moléculas celulares, resultando na inibição da síntese proteica e na peroxidação lipídica, além de afetar a homeostase do cálcio e causar danos em DNA.

O paracetamol (*N-Acetyl-p-aminofenol*), também conhecido por *acetaminofeno*, é um fármaco com propriedades analgésicas e antitérmico, cujo uso, principalmente na superdosagem, tem sido frequentemente reportado como fármaco associados à ocorrência de hepatotoxicidade e promover uma rápida deterioração da função hepática em indivíduos sem patologia hepática pré-existente (AL-HOURANI et al, 2013). O mecanismo explicativo e simplificado da lesão induzida pelo paracetamol sugere que na administração de doses tóxicas, as vias tradicionais de metabolização saturam e a via do Citocromo P-450 assume a biotransformação do paracetamol, ocasionando maior formação de metabólito tóxico e radicais livres, resultando no aumento da permeabilidade da mitocôndria 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 diversos modelos experimentais de indução cirrose, a tioacetamida (TAA) demonstrou ser o mais promissor por produzir padrão histológico mais próximo 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). A droga tioacetamida (TAA) foi originalmente usada como fungicida para proteger laranjas contra a deterioração. Em seguida foi reconhecida como uma potente hepatotoxina e agente carcinogênico em ratos. A partir de então, estudos revelaram que a exposição crônica a tioacetamida produziu cirrose em ratos (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). Os compostos derivados da TAA, formados durante sua metabolização, são responsáveis pela hepatotoxicidade dessa droga. Tais compostos induz 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).

3.6 TESTES DE CITOTOXIDADE E GENOPROTEÇÃO

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos e animais, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo (FROZZA, 2013).

A citotoxicidade é o potencial de determinada substância em promover alteração metabólica em morte celular em cultura de células (AWALE; TEZUKA; KADOTA, 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 mellífera* no Brasil, Cinegaglia, Bersano e Bufalo (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 pesquisaram as propriedades antineoplásica do extrato fenólico da própolis obtidas de diferentes origens em Portugal. O extrato 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 estudada apresentou alto potencial citotóxico para células tumorais testadas, principalmente para HCT15.

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 ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de se identificar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (NIWA; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2013).

A genotoxicidade ou toxicologia genética é uma especialidade que se ocupa da identificação e estudo da ação de qualquer agente que produz efeitos tóxicos e genotóxicos, sobre o material genético (AQUINO, 2010). Testes de mutagenotoxicidade mensuram

danos no DNA, 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; OLIVEIRA; MANTOVANI, 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 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 elétrico 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).

Roberto (2009) avaliou a atividade mutagênica de extratos etanólicos da própolis verde, coletadas na cidade de Carvalhópolis, sul do estado de Minas Gerais, Brasil. A atividade mutagênica foi realizada através do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese usando células de hepatoma de rato (HTC). A análise estatística dos resultados mostrou que os extratos etanólicos estudados não induziram a formação de micronúcleo, portanto não apresentaram atividades mutagênicas. O autor evidenciou ainda que a própolis verde testada apresenta uma atividade antimutagênica, possuindo uma capacidade protetora, uma vez que células de mamíferos quando submetidas um agente comprovadamente mutagênico (Metilmetano Sulfonato - MMS) e incubadas juntamente com o extrato de própolis apresentaram redução de micronúcleos em 86,67%.

Uma substância que consegue prevenir ou reduzir a mutagenicidade de um agente mutagênico poder ser chamado de agente antimutagênico. No entanto, o modo de ação preventivo desta substância pode ocorrer de duas maneiras: pela inativação do mutágeno, antes do seu ataque ao DNA, ou pela inibição da fixação de uma mutação no DNA de um organismo. Desta forma, estes autores sugerem as denominações agentes “desmutagênicos” (inativam a substância) e “bio-antimutagênicos” (inibem a fixação da mutação) (KADA; SHIMOI, 1987). De acordo com Horn e Vargas (2008), entre vários compostos fitoquímicos, os flavonóides e os taninos são compostos que apresentam atividades mutagênicas e antimutagênicas. Da mesma forma, Tavares, Barcelos e Silva (2006) sugerem que os flavonóides são os principais componentes responsáveis pelos

efeitos mutagênicos e antimutagênicos da própolis. Os autores atribuem ao extrato de própolis, a característica de atuar como um composto com “efeito Janus”, ou seja, pode se comportar como agente genotóxico ou antígeno tóxico, dependendo da condição experimental utilizada. Em seu trabalho, quando aplicado em altas concentrações (100 µg/mL), o extrato foi genotóxico, mas quando usado em baixas concentrações (12.5 µg/mL), exerceu atividades quimiopreventivas (antigenotóxica).

REFERÊNCIAS

AFROUZAN H.; SEDIGHEH, A. Z.; HAGHI, A. E. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. **Iran Biomed Journal**, v. 22, n. 1, p. 50-65, 2018.

ALDABA-MURUATO, L. R. et al. Protective effects of allupurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: modulation NF-KB, cytokine production and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1820, n. 2, p. 65-75, 2012.

AL-HOURANI, K. et al. The predictive value of hospital admission serum alanine transaminase activity in patients treated for paracetamol overdose. **Quarterly Journal of Medicine**. v. 106, p.541–546, 2013

ANAZETTI, M. C. et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.

AQUINO, I. **Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada)- Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho", Botucatu, 2010.

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

AWALE, S.; 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 and Medical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-9, 2008.

BANKOVA,V. et al. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, n. 6, p. 530-533, 2002.

BARRETO, L. S., CASTRO, M. S. Ecologia e nidificação de abelhas do gênero *Partamona* (Hymenoptera: Apidae) na caatinga, Milagres, Bahia. **Biota Neotropica**. v.7, n.1, p.87-92, 2007

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. **Toxicology**, v. 268, p. 204–212, 2010.

BATISTA, J. S. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividadesarmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-888, 2016.

BONAMIGO, T. et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxid Med Ccll Longev Journal**, v. 4, p 1-12, 2017.

BRANDÃO, D. F. et al. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, suplemento 1, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário oficial [da União] Brasília,DF, 23 jan 2001. Seção 1, p.18.

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.

CÂMARA, J. Q. et al. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, 20p, 2004.

CAMARGO, J .M. F., PEDRO, S. R. M. Meliponini hepeletier, 1836. In: MOURE, J.S., URBAN, D., MELO, G.A.R. (Org.). **Catalogue of Bees (HYMENOPTERA, Apoidea) in the Neotropica Region**. 2013. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 672 p.

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

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

CHEDID, M. F. et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and operative management. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 30, n. 4, p. 272-278, 2017.

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

CRUZ, D. O. et al. Adaptação e comportamento de pastejo da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em ambiente protegido. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 3, p. 293-298, 2004.

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

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.

DIEHL, A. M. Effects of alcohol on liver regeneration. **Alcohol Health & Research World**, Bethesda, v. 17, n. 4, p. 279-283, 1993.

EDUARDO L. F. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos da geoprópolis (*Melipona scutellaris*) bioguiado pelo efeito antimicrobiano**. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado em odontologia)- Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2014.

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

FIANCO A. L. B. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna). **Revista Liberato**, v. 14, n. 21, p. 111-112, 2013.

FIKROVÁ, P. Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 123, n. 23/24, p. 693-699, 2011.

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

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

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

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

GOIS, G. C. et al. Qualidade microbiológica do mel de abelhas *Melipona scutellaris*. **Pubvet**, v. 4, n. 9, p. 1-6, 2010.

HRNCIR, M.; KOEDA, D.; FONSECA, V. L. I. **A abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro**. Mossoró: EdUFERSA, 2017. 254p.

HONGMING, P. et al. Linifanib versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: Results of a Randomized phase III trial. v.33, n.2, p.172-178, 2015

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

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

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.

JAESCHKE, H.; BAJT, M. L. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. **Comprehensive Toxicology**, v.9, p.457-473, 2010.

JALAN, R. et al. Acute-on chronic liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 57, p. 1336–1348, 2012.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens - theirs modes of action. **Bioassays**, v. 7, n. 3, p. 113-6, 1987.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KARTAL, M.; KAYA, S.; KURUCU, S. GC – MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 57, n. 10, p. 905-909, 2002.

KERR, W. K.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu**: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1997. p. 1-157.

KUNRATH, C. A. et al. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 20, p. 1-10, 2017.

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.

LIBERIO, A. S. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-10, 2011.

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.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MAHER, J. J. Exploring alcohol's effects on liver function. **Alcohol Health & Research World**, Bethesda, v. 21, n. 1, p. 5-12, 1997

MELO, A. P. S. et al. 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.

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.

MONTE, A. M. et al. Qualidade de méis de abelhas nativas sem ferrão do estado do Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 35, n. 1, p. 48-54, 2013.

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.

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.

NOGUEIRA, C. R. H.; COUTO, L. A. Apicultura: manejo e produtos. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 193 p.

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.

OLIVEIRA, C. R. et al. 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 Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 41, n. 2, p. 133-142, 2012.

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.

PARK, Y. K. et al. "Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

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.

PEREIRA, D. S. et al. Abelhas indígenas criadas no Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria**, Brasília,DF, v. 5, n. 1, p. 81-91, 2011.

PONTES, M. L. C. et al. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 34-39, 2018.

PORTO, I. C. .C. M. et al. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. **Dental Materials**, v. 27, p. 221-228, 2011.

SALATINO, A. Propolis research and the chemistry of plant products. **Royal Society Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de propolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SALIBA, F., SAMUEL, D. Acute liver failure: Current trends. **Journal of hepatology**. v.59, p. 6-8, 2013

SCHWARZ, H.F. The indo-Malayan species of trigona. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.76, artigo 3, p.83-141, 1939.

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.

SILVA, R.A.D. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de propolis da paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.

SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-888, 2016.

SILVEIRA F. A.; MELO G. A. R.; ALMEIDA E. A. B. **Abelhas Brasileiras**: sistemática e identificação. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002.

SOUSA, D. M. N. et al. Prospecção fitoquímica, toxicidade in vitro e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 134-140, 2015.

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

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

ROBERTO, M. M. **Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato Etanólico de Própolis Verde e de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae), por Meio de Sistema-Teste de Allium cepa e Células de Mamíferos (HTC)**. 2009, 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2009.

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

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**. v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.

WEBSTER, C. R. Diagnóstico laboratorial de doenças hepatobiliares, In: **TRATADO de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2156p. p.1348-1364,

YOON, E. et al. Minophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**. v. 28, n. 2, p. 131-142, 2016.

ZHENG, M. et al. ROC curves in evaluation of serum fibrosis indices for hepatic fibrosis. **World Journal Gastroenterol**. v. 8, n. 6, p. 1073-1076, 2002.

CAPÍTULO II

4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE GENOPROTETORA E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA *Partamona cupira*

Chemical composition and genoprotective and antioxidant activities of the hydroethanolic extract of the bee *Partamona cupira* geoprópolis

Artigo submetido ao periódico

ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Composição química e atividade genoprotetora e antioxidante do extrato
hidroetanólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira***

RESUMO: Alguns estudos evidenciam que assim como a própolis produzida por abelhas do gênero *Apis*, a própolis produzida pelas abelhas indígenas sem ferrão também possui alta atividade biológica. Dessa forma, objetivou-se avaliar a composição química e atividade antioxidante, genoprotetora e antineoplásica do extrato hidroalcoólico da geoprópolis produzida pela abelha cupira (*Partamona cupira*), obtido junto à meliponicultores do semiárido do Rio Grande do Norte. Para tanto, foram avaliados a composição química e atividade antioxidante da própolis da referida abelha, bem como a avaliação *in vitro* do potencial antineoplásico da própolis em linhagem de células de carcinoma hepático humano, e também do potencial genoprotetor em linhagem de células de fibroblastos normais (L929), expostas ao peróxido de hidrogênio. As amostras apresentaram 20 compostos fenólicos, distribuídos entre fenóis e flavonoides, este último, sendo chalconas, flavonas e flavonóis, demonstrando uma excelente atividade antioxidante. O extrato da geoprópolis da abelha cupira não apresentou citotoxicidade em células normais e apresentou efeito antígeno-tóxico ou genoprotetor, com percentuais de redução de genotoxicidade de 92,2%, 74,5% e 46,1%, respectivamente, para as concentrações de 500, 250 e 100µl/mL do extrato. Assim conclui-se que o extrato da geoprópolis da abelha cupira apresenta composição química variada e promissoras atividades farmacológicas, destacando-se a antioxidante, não citotóxica e genoprotetora.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade biológica. Abelha sem ferrão. Abelha cupira. Semiárido. Meliponini.

ABSTRACT: Some studies show that just like propolis produced by bees of the *Apis* genus, the propolis produced by indigenous stingless bees also has high biological activity. The objective of this study was to evaluate the chemical composition and antioxidant, genoprotective and antineoplastic activity of the hydroalcoholic extract of the geopropolis produced by the cupira bee (*Partamona cupira*) obtained from the meliponicultores of the semi-arid region of Rio Grande do Norte. Then, the chemical composition and antioxidant activity of the propolis of *Partamona cupira* bee were evaluated; as well as the *in vitro* evaluation of the antineoplastic potential of propolis in human hepatic carcinoma cell line, as well as the potential genotype in normal cell from fibroblastic line (L929) exposed to

hydrogen peroxide. The samples presented 20 phenolic compounds, being phenols and flavonoids. The geopropolis extract of the honey bee did not show cytotoxicity in normal cells and showed antigenotoxic or genoprotective effect, with percentages of genotoxicity reduction of 92.2%, 74.5% and 46.1%, respectively, for the concentrations of 500, 250 and 100µl / mL of the extract. We concluded that the extract of the geopropolis of the cupira bee presents varied chemical composition and promising pharmacological activities, standing out the antioxidant, non-cytotoxic and genoprotective.

Keywords: Biological activity. Bee stingless. Bee cupira. Semi-arid. Meliponini.

INTRODUÇÃO

A *Partamona cupira* é uma espécie que ocorre em áreas da caatinga por todo o Nordeste. No Rio Grande do Norte, ocorre em toda a porção da caatinga. São abelhas relativamente mansas e nidificam em cupinzeiros de barro normalmente aéreos. A entrada do ninho é pouco ornamentada e com bordo liso sem reentrâncias. São abelhas escuras com asas foscas e tegumento liso, polido e brilhante (HRNCIR et al., 2017).

Dos produtos produzidos pela cupira, ressalta-se a própolis, esta é utilizada por diferentes civilizações desde a antiguidade na medicina popular e mais recentemente, no comércio de vários produtos (SALATINO et al., 2011). As abelhas têm a própolis como a sua "arma química" mais importante, utilizando-a contra microorganismos patogênicos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colmeia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (MIGUEL; ANTUNES, 2011).

A composição química da própolis está diretamente relacionada à sua origem botânica, mas fatores como sazonalidade, variabilidade genética da abelha que a produz e reações geradas, através das secreções hipofaringianas da abelha (hidrólise de glicosídeos flavonóides em agliconas), podem levar à transformações em sua composição (NUNES; GUERREIRO, 2012).

Durante as últimas décadas, muitas atividades biológicas foram atribuídas a própolis, sendo confirmadas cientificamente e reportadas em artigos científicos, tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, antitumoral, cicatrizante no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras, dentre outros (SFORCIN; BANKOVA, 2011; CARDINAULT; CAYEUX; SERT, 2012; FABRIS et al., 2013, SALGUEIRO; CASTRO, 2016; KUNRATH; SAVOLDI; MILESKI, 2017; AFROUZAN et al., 2018; PONTES et al., 2018).

Visando compreender a bioatividade da própolis, se faz necessário caracterizar quimicamente os extratos a serem testados nos estudos de atividade biológica, pois as propriedades farmacológicas da própolis estão diretamente relacionadas à sua composição química, que por sua vez depende da flora local e sazonalidade (EDUARDO, 2014).

A própolis e geoprópolis, produzido pelas abelhas nativas sem ferrão tem suscitado crescente interesse dos pesquisadores, que vem desenvolvendo recentes estudos voltados para o conhecimento de sua composição química e atividades farmacológicas (FIANCO et al., 2013; SOUSA et al. 2015; SILVA et al., 2016; BATISTA et al., 2016, BONAMIGO et al., 2017), visto que essas atividades estão diretamente relacionadas com os teores dos componentes químicos (SILVA et al., 2016). Porém, em relação à própolis das abelhas Meliponini, há escassez de estudos sistematizados e, destes poucos, alguns trabalhos já indicam bons resultados quanto às suas propriedades imunomoduladora e antimicrobiana (LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012; CUNHA et al., 2013).

Os testes de citotoxicidade realizados *in vitro*, são parte da triagem inicial para determinar o possível potencial antitumoral de um produto natural (OLIVEIRA et al., 2012). Os estudos de genotoxicidade representam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos, devendo ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de se identificar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (NIWA; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2013). Desta maneira, objetivou-se avaliar a composição química do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira*, sua atividade antioxidante, seu potencial antineoplásico e genoprotetor.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da composição química e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira*., Foram coletadas amostras de geoprópolis produzidas pelas referidas espécies de abelhas, em colmeias instaladas em meliponários no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A coleta das amostras de geoprópolis foi realizada no período de maio a junho de 2015. Seguindo as técnicas de coleta recomendada pela Instrução Normativa N° 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), foram obtidas assepticamente, pesadas em balança eletrônica, identificadas e armazenadas em frascos esterilizados, e mantidos a -20° C até a produção do extrato.

Para a confecção dos extratos hidroalcoólicos da abelha cupira, foram pesados 30g de de geoprópolis, que foram submetidas a secagem em estufa de circulação de ar a 40°C por 48h. Em seguida, a amostra foi triturada em liquidificador, transferida para vasilhames de vidro âmbar e adicionado álcool a 70° GL, na proporção de 1:5 (para cada 1g de geoprópolis triturada utilizou-se 5ml de álcool). Os vidros foram devidamente identificados e agitados manualmente por 1 minuto diariamente, durante 20 dias consecutivos de infusão conforme Garcia et al. (2004). A fim de promover melhor aproveitamento da geoprópolis, após a filtragem o material que ficou retido na peneira foi novamente colocado nos vidros âmbar na mesma proporção de geoprópolis e álcool para uma nova extração. Para remoção do solvente, o material foi concentrado por rotaevaporizador, em temperatura de 60°C e secagem em estufa a 37o C por 24 horas.

Os constituintes das amostras de própolis foram caracterizados através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS/MS, conforme metodologia descrita por Ferreira et al. (2017). Utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu DADSPD-M10AVP, equipado com desgaseificador, duas bombas LC-20AC, coluna de forno CTO-20A, auto-injetor SIL 20AC e detector de arranjo de diodos SPD-20A, ajustado para 210 e 400 nm. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massa da Esquire 3000 Plus Bruker Daltonics, equipado com um analisador de massas de captura de íon quadrupolo e os componentes de hardware foram controlados através do software CBM-20A. As análises foram realizadas com uma coluna de fase reversa Phenomenex Gemini C-18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm), protegida por uma coluna de guarda. Para tanto, aplicou-se o mesmo programa de gradiente, os solventes e a taxa de fluxo da HPLC/DAD.

A aquisição de massa por varredura completa foi realizada através electrospray para o processo de ionização, no modo ionização positiva na razão m/z em intervalos 100-1200. Na nebulização utilizou-se como gás nebulizador o nitrogênio, auxiliada com um gás de revestimento de azoto coaxial, a uma pressão de 27 psi e para a colisão, o hélio. A dessolvatação foi assistida utilizando um fluxo de azoto em contracorrente fixado a 7,0 L min⁻¹ de fluxo e temperatura capilar de 320°C. Os eventos MS/MS dependentes de dados foram realizados nos íons mais intensos detectados na varredura completa do MS. O tempo máximo de acumulação de capturas de íons e os números de MS para obter os espectros médios de MS foram estabelecidos em 30 e 3 MS, respectivamente.

A determinação da concentração de fenóis totais nas amostras, foi realizada com base em uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de ácido p-

cumárico 100 µg/mL. Cada volume da solução padrão (0, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 µL) foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1mL de água destilada, ao qual foram adicionados 160 µL do Folin-Ciocalteu e 240 µL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo o volume final completado com água destilada para 2 mL. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 760nm, sob temperatura de 24,6°C.

Os ensaios com as amostras foram feitos em triplicatas, foram adicionados 10 µL de cada extrato hidroetanólico de geoprópolis a 1mg/mL aos tubos de microcentrífuga, contendo 1mL de água destilada. Em seguida, foram realizados os mesmos passos para a construção da curva de calibração (MARCUCCHI; WOISKY; SALATINO, 1998).

A determinação da concentração de flavonoides totais nas amostras, foi realizada com base em uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de quercetina 20 µg/mL.

Alíquotas de solução padrão foram transferidas para tubos de microcentrífuga (0, 100, 300, 500, 700, 900, 1100 e 1300 µL), ao qual foram adicionados 400 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, e o volume completado com metanol para 2mL. Em seguida foi feito a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Versão 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 420nm, sob temperatura de 23,7°C.

Os ensaios com as amostras foram feitos em triplicatas, foram adicionados 50 µL de cada extrato hidroetanólico de geoprópolis a 1mg/mL aos tubos de microcentrífuga. Em seguida, foram realizados os mesmos passos para a construção da curva de calibração (Woisky e Salatino, 1998).

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). Para tanto, adicionou 400 µL dos extratos hidroetanólicos das amostras na concentração de 1mg/mL, em triplicatas. Em seguida, com dois minutos de intervalo entre cada amostra, foram adicionados 800 µL de uma solução metanólica do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrasila (DPPH, Sigma) em concentração aproximada de 20 µg/mL. Antes de utilizar a solução de DPPH, a absorbância foi ajustada para valor entre 0,7 a 0,8 a 517 nm, medida a partir do seu branco (800 µL da solução de DPPH + 400 µL de metanol). Como branco das amostras foram utilizados 400 µL da amostra de extrato, adicionados a 800 µL de

metanol. Como substância de referência foi utilizado quercetina, na concentração 20 µg/mL. Após a adição do DPPH, as amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 20 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Versão 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 517nm, sob temperatura de 33,2°C. A degradação do DPPH foi avaliada por comparação com o branco. A porcentagem de atividade antioxidante (%AAox) das amostras foi avaliada por meio da equação:

$$\% \text{ AAox} = \frac{\text{Abs controle} - (\text{Abs Am} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}}$$

(MORENO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2006).

Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmos foram analisados em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Versão 2.06.10) com a finalidade de se obter um gráfico que apresentasse valores pelos quais seria calculada a concentração inibitória de 50 % do radical DPPH (IC50).

Foi avaliada a atividade antineoplásica do extrato hidroalcoólicos da geoprópolis da abelha *Partamona cupira*, através do ensaio de citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), pelo teste MTT (brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), um ensaio quantitativo in vitro que foi desenvolvido por Mosman em 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 tetrazolium (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).

O extrato da referida geoprópolis da abelha *P. cupira* foi testado em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HEPG2) e em linhagem de fibroblastos (L929), células sadias que foram utilizadas como controle, comparação e avaliação do efeito seletivo da citotoxicidade entre as células tumorais e normais. As substâncias testes, foram ensaiadas em nove diferentes concentrações: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625, 1,953125 e 0,9765625 µg/mL.

As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $0,1 \times 10^5$ células/mL. As células foram cultivadas em meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução composta dos antibióticos penicilina (100U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL). As placas de 96 poços foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h a fim de permitir a sedimentação e adesão celular. Após esse período, a substância teste (PRÓPOLIS) e o controle negativo (DMSO) foram adicionadas as culturas celulares. Após o período de exposição, foi adicionado a cada poço 50 µL de solução de MTT (1 mg/mL). As placas foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 3 h e logo após a solução de MTT foi removida e o precipitado de formazan foi resuspendido em 100 µL de DMSO.

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

Para o teste ensaio cometa, foi avaliado o efeito genotóxico e genoprotetor do extrato hidroalcoólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* através da análise do ensaio cometa. Nesse ensaio, as células de fibroblastos (L929) são submetidas experimentalmente a um dano que pode ser produzido pela radiação ionizante ou por substâncias químicas capazes de promover fragmentação DNA. As células são então lisadas, misturadas com agarose e submetidas à eletroforese, que proporciona uma corrente elétrica que age como uma força que induz a migração dos segmentos de DNA livres. A lesão ao DNA pode ser identificada visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA, sendo que o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado (MEZZALIRA; FUNCHAI; DANI 2014).

O ensaio do Cometa Alcalino foi realizado com a linhagem de fibroblastos de camundongo L929 (fonte BCRJ). As células ($0,7 \times 10^5$ células/mL) foram cultivadas em DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media; GIBCO®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, na presença de concentrações crescentes das amostras testes (100, 250 e 500 µg/mL) durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ para análise de genotoxicidade. O peróxido de hidrogênio

(H₂O₂; 150 µM por 2 h de exposição) foi utilizado como controle positivo e água destilada estéril como controle negativo.

A análise dos efeitos anti-genotóxicos das amostras testes foi realizado com a linhagem de fibroblastos L929 (0,7 x 10⁵ células/mL) cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As culturas celulares foram co-tratadas com concentrações crescentes das amostras testes (100, 250 e 500 µg/mL) e H₂O₂ (150 µM) durante 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, mantidos a temperatura ambiente até a solidificação da agarose de baixo ponto de fusão. As células tratadas foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas as lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Após a solidificação da agarose, a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Laurilsarcosina, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), abrigada da luz a 4°C por no mínimo 1 hora.

Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Posterior a esta etapa, as lâminas foram disposta horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com uma solução alcalina a 4°C (1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13,0). As lâminas repousaram por 20 minutos para permitir o relaxamento do DNA e a conversão de sítios álcali-lábeis em quebra de fitas simples. A eletroforese (25 V; 300 mA) foi conduzida a baixa temperatura (4°C) durante 20 minutos. Todos esses passos foram realizados na ausência de luz. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%. Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20µg/mL). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. Foram analisados 100 cometas por lâmina (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999) 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.

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 2 h 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 anti-genotóxico (H₂O₂ + amostra teste) e C corresponde ao ID atribuído ao controle negativo (água destilada).

Os dados foram analisados a partir de regressão não-linear para avaliação da citotoxicidade. A partir dos dados obtidos determinou-se a CI50 que corresponde à concentração da amostra capaz de induzir 50% de citotoxicidade. As CI50 do extrato da própolis testado, obtido para as células HEPG2 e L929, foram determinadas e comparadas entre si, e também com a CI50 da doxorubicina para avaliação da atividade citotóxica *in vitro*. Para análise estatística dos experimentos, 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

As amostras de extrato hidroalcóolico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* pertencentes as comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte, apresentaram, basicamente, o mesmo perfil químico (Tabela 1), dos quais 20 (vinte) são compostos fenólicos, distribuídos entre fenóis e flavonoides, este último, sendo chalconas, flavonas e flavonóis. Dentre os flavonoides, as chalconas apresentam importantes características químicas, contendo sete diferentes substâncias dos constituintes químicos do extrato hidroetanólico da geoprópolis. Os fenóis constituem uma pequena parcela das substâncias fenólicas, com duas diferentes substâncias. As flavonas encontradas são di-O-glicosídeos e 7-O-glicosídeo. Todos os flavonóis encontrados são agliconas.

Por ser um estudo pioneiro, não há na literatura dados relativos à quantificação de fenóis e flavonoides totais da geoprópolis produzida pela abelha *Partamona cupira*.

No entanto, há dados relacionados a outros meliponídeos, que podem ser comparados aos resultados obtidos neste estudo. Como por exemplo, a pesquisa realizada por Franchin et al., (2012) ao estudar a geoprópolis produzida pela abelha *Melipona scutellaris* (uruçu) observou na sua composição química alto teor de fenóis totais.

Ferreira et al., (2017), ao avaliarem própolis verde de dois municípios do estado do Rio Grande do Norte, observaram que a maioria dos constituintes da própolis RN são flavonóides, principalmente flavonóis e chalconas.

Considerando que o consumo frequente de antioxidantes está associado à melhora do sistema imunológico, a diminuição da incidência de doenças degenerativas como o câncer, a diabetes, artrite, doenças cardiovasculares e até mesmo disfunções cerebrais (OLIVEIRA et al., 2011), o estudo da atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis favorecem a sua validação no uso medicinal e, conseqüentemente, o aumento do interesse pelo seu consumo, uma vez que os produtos oriundos dos meliponíneos (mel, pólen, própolis e geoprópolis) já são bastante utilizados na medicina popular (SOUZA et al., 2004).

Tabela 1 - Distribuição de substâncias fenólicas da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte, analisadas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Flavonoides							
Chalconas	TR (min.)	Flavonas	TR (min)	Flavonóis	TR (min.)	Fenóis	TR (min.)
2', 6'-tri-hydroxy-4-methoxy chalcone	31,441	Luteolin Methyl éter	21,9	Kaempferol	26,4	Sinapoyl phenyl ester	13,9
2',6',4-trihydroxy chalcone	31,441	Tricin – Trihydroxy dimethoxy flavone	41,3	Rhamnetin	26,9	5-Hexadecyl cardanol	15,430
2',6',4-trihydroxy-3,4'-dimethoxy chalcone	33,123	Trihydroxy trimethoxy flavone	23,9	Kaempferol dimethyl ether	26,4	—	—
4'-methoxy-2',6',4-trihydroxy chalcone	31,441	Tricin methyl ether	41,3	Isorhamnetin	27,244	—	—
6'-methoxy-2',4-dihydroxy chalcone	41,3	luteolin dimethyl ether	21,9	Quercetin	33,129	—	—
4'-methoxy-2',6',4-trihydroxy chalcone	33,123	4-Ethoxybenzyl alcohol acetyl glucoside	24,8	—	—	—	—
6'-methoxy-2',4-dihydroxy chalcone	41,3	—	—	—	—	—	—

TR: tempo de retenção

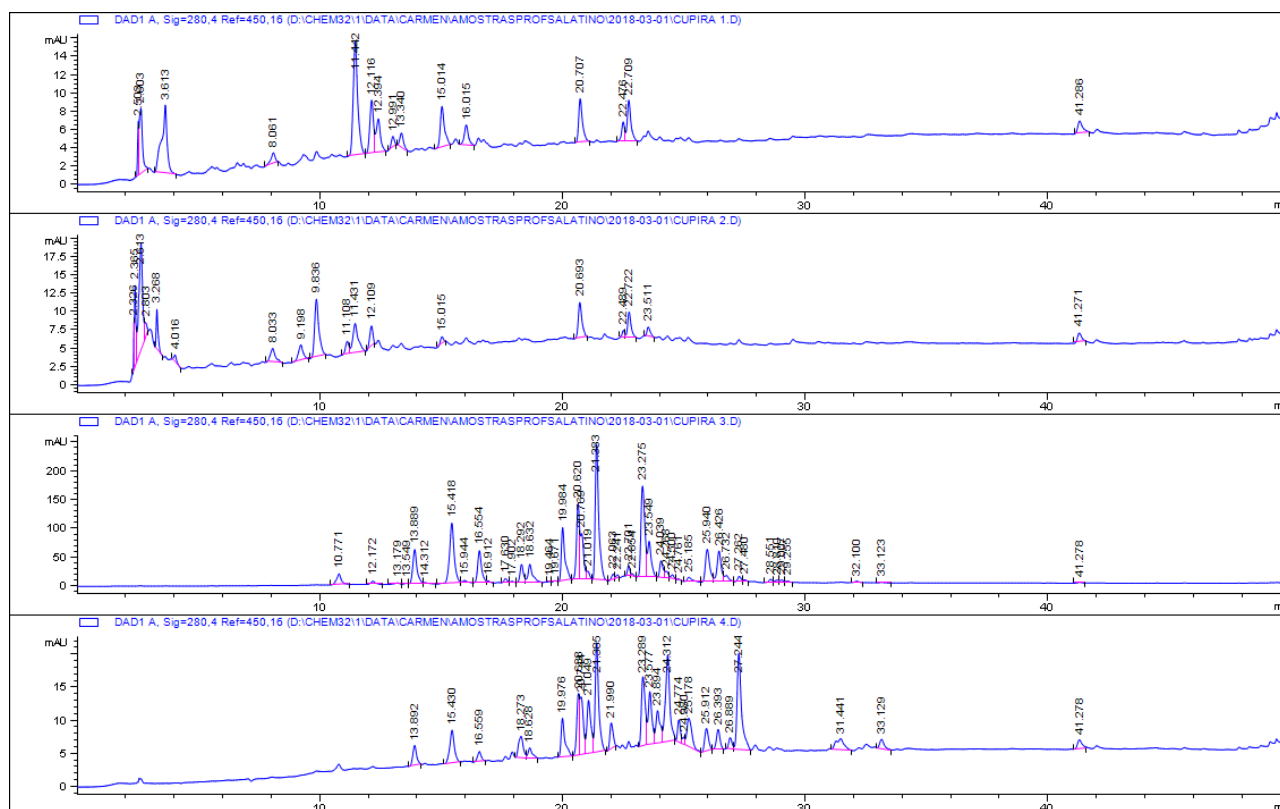
Fonte: Elaboração do autor (2018)

As análises em HPLC/DAD demonstraram diferenças em relação à abundância relativa dos constituintes dos extratos, sendo o Luteolin Methyl éter o constituinte que se caracterizou por expressar o maior pico no tempo de retenção (Figura 1).

Compostos fenólicos com significativa quantidade de hidroxilas são capazes de interceptar a cadeia de oxidação de radicais livres através da doação de hidrogênio de suas hidroxilas, promovendo maior atividade antioxidante (RIGHI et al., 2011; KATAOKA; CARDOSO, 2013), as quais atuam diminuindo o estresse oxidativo e podem promover proteção contra danos no DNA e atividade hepatoprotetora (MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008; ALMEIDA, 2009). A exemplo, as chalconas apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas, reduzem a viabilidade celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) (TAMIELLO et al., 2013).

As amostras de extrato hidroalcoólico de geoprópolis da abelha *Partamona cupira*, pertencentes aos meliponários das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte, apresentaram boa atividade antioxidante, observada pelos compostos fenólicos demonstrados no perfil cromatográfico e concentrações de massa seca, teores de fenóis e flavonoides totais e IC50 (%), obtidos através do método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Tab. 2).

Figura 1 - Perfil cromatográfico do extrato hidroalcolólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte, analisadas por HPLC/DAD.



Fonte: Elaboração do autor (2018)

Os compostos fenólicos presentes na composição química da própolis têm sido estudados por apresentarem propriedades antioxidantes, principalmente, decorrente da sua ação sobre os radicais livres. Devido à ação antioxidante, os fenólicos cooperam com a redução dos danos oxidativos celulares originados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO, 2010).

Os conteúdos de compostos fenólicos têm sido sugeridos para desempenhar um papel preventivo no desenvolvimento de câncer e doenças cardíacas. Alguns autores afirmam que as atividades biológicas das própolis brasileiras são principalmente devidas aos altos níveis de ácidos fenólicos (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). Através do método de DPPH, foi avaliada a atividade antioxidante da geoprópolis da cupira, tal atividade foi medida a partir da sua capacidade de eliminar os radicais DPPH (IC₅₀), um radical livre, estável. Desta forma, quanto menor o valor da IC₅₀, maior é a potência antioxidante, visto que será necessária menor quantidade da substância para promover a

redução de 50% do reagente. Este método é amplamente utilizado devido à simplicidade, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade (SALGUEIRO; CASTRO; 2016).

Tabela 2 - Concentrações (matéria seca) mg/mL, teor de fenóis totais (%) (m/m), teor de flavonoides totais (mg/100g) e atividade antioxidante (%) e seus respectivos desvios padrão das quatro amostras de extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Partamona cupira* das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte.

Amostras	Concentração		Flavonoides totais
	de matéria seca	Fenóis totais	
C1	21,60	17,0 ± 0,74bc	1,40 ± 0,72c
C2	146,20	2,86 ± 0,25c	0,79 ± 0,09c
C3	46,0	58,86 ± 4,12a	25,37 ± 4,82a
C4	10,0	26,04 ± 1,78ab	7,46 ± 1,44b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor (2018)

Segundo Melo et al. (2010), classifica-se a atividade antioxidante dos extratos como boa ($IC_{50} < 65 \mu\text{g/ml}$), moderada ($65 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 152 \mu\text{g/ml}$) e baixa atividade ($IC_{50} > 152 \mu\text{g/ml}$). Usando essa classificação observou-se que, no geral, a geoprópolis estudada apresenta boa atividade antioxidante (Tabela 3), diferentemente de outros autores que ao avaliar a capacidade de eliminação do radical DPPH da própolis vermelha coletada em Sergipe, obtiveram um IC_{50} de $270 \mu\text{g/mL}$ (FROZZA et al. 2013). Resultados semelhantes foram obtidos por Pinheiro (2009) com própolis vermelho da mesma região geográfica, com IC_{50} de $294 \mu\text{g/mL}$.

Em contrapartida, Bonamigo et al. (2017) estudaram a atividade antioxidante da própolis de duas abelhas diferentes (*Scaptotrigona depilis* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*). No ensaio de DPPH, o extrato etanólico da própolis da *M. quadrifasciata anthidioides* mostrou inibição de 50% de radicais livres (IC_{50}) a uma concentração de $60,91 \mu\text{g/mL}$. O IC_{50} não foi calculado para o extrato etanólico da própolis da *S. depilis*. É possível observar que a amostra C1 da geoprópolis da abelha cupira apresentou uma capacidade de inibição do DPPH melhor do que a própolis em questão.

Tabela 3 - Atividade antioxidante (IC_{50} , $\mu g/mL$), avaliada através do método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), das amostras dos extratos hidroalcoólicos da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* das comunidades rurais da região semiárida do Rio Grande do Norte e quercetina.

Amostras	DPPH (%AaOx)
Cupira 1	55,7
Cupira 2	1277,8
Cupira 3	89,4
Cupira 4	109,7
Quercetina	12,3

Fonte: Elaboração do autor (2018)

Apesar dos estudos realizados e dos investimentos aplicados em pesquisas, a 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 (LOTUFO et al., 2010).

Os testes de citotoxicidade realizados *in vitro*, são parte da triagem 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 da abelha cupira através do ensaio de citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), pelo teste MTT, um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosman em 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).

Nos últimos anos, diversos estudos de avaliação do potencial antineoplásico da própolis tem sido realizado *in vitro* em várias linhagens de células neoplásicas, onde alguns resultados se mostram favoráveis ao seu uso (Awale et al., 2008). A propolis e geoprópolis, produzido pelas abelhas nativas sem ferrão tem suscitado crescente interesse dos pesquisadores e vem desenvolvendo recentes estudos voltados para o conhecimento de sua composição química e atividades farmacológicas (FIANCO et al., 2013; SOUSA et al., 2015; BATISTA et al., 2016; SILVA et al., 2016; BONAMIGO et al., 2017). No que diz respeito à atividade antineoplásica da própolis produzida pelos meliponídeos, convém mencionar o estudo realizado por Sanches, Pereira e Serrão (2017) no qual avaliou a ação do extrato etanólico de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* em linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF7), melanoma murino (B16-F10), astrocitoma (U343MG-a) e fibroblastos de camundongos (3T3). Neste estudo a própolis apresentou atividade citotóxica em todas as linhagens celulares nas concentrações utilizadas. A referida autora sugere o uso da própolis de *S. aff. postica* como fonte de substâncias antitumorais. O efeito inibitório contra o crescimento de células cancerígenas exibido por diferentes amostras de própolis pode estar relacionado ao efeito geral dos compostos fenólicos presentes em cada extrato, região e ano em que o material foi coletado (FROZZA et al., 2013). Há constatações de que essa atividade inibidora da própolis no crescimento de células tumorais, está intimamente associada com a indução de apoptose (CHEN, WU; LIN, 2007), demonstrada tanto pela análise de eletroforese de gel (AKAO et al., 2003) como pela citometria de fluxo (ISHIHARA et al., 2009).

Como parâmetro de atividade antitumoral, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer, considera como compostos ativos com atividade antineoplásica, os compostos que apresentarem $CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (ITHARAT et al., 2004). Dessa forma, o extrato hidroalcoólico da própolis da abelha cupira não apresentou atividade citotóxica para células tumorais de câncer de fígado humano (HEPG2) bem como para fibroblastos - L929, uma vez que após 72 horas de exposição, em todas as concentrações testadas apresentou os valores de $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (Tab. 4). A doxorrubicina, utilizada como droga de referência, apresentou citotoxicidade em todas as linhagens celular testadas, com valores de CI_{50} que variaram de 2,2645

$\mu\text{g/mL}$ a 0,5491 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens de HepG2 e L929, respectivamente. Campos et al. (2014) ao testarem a citotoxicidade do extrato etanólico da própolis da abelha *Melipona orbignyi* em células de eritroleucemia K562, demonstraram uma citotoxicidade apenas na concentração mais alta testada (500 $\mu\text{g/mL}$). Frozza et al. (2013), verificou que os efeitos inibitórios do extrato hidroalcoólico de própolis vermelho foram mais significativos sobre as linhas celulares tumorais quando comparados aos não tumorais em concentrações mais elevadas.

Tabela 4 - Atividade citotóxica *in vitro* do extrato hidroalcoólico da geoprópolis da abelha cupira (*Partamona cupira*) e quimioterápico doxorrubicina frente às linhagens de células L929 e HepG2 pelo ensaio MTT após 72 horas de exposição.

Linhagens celulares – CI_{50} $\mu\text{g/mL}$		
Compostos	L929	HepG2
Extrato Cupira	500 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Doxorrubicina	0,5491 $\mu\text{g/mL}$	2,2645 $\mu\text{g/mL}$

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

Fonte: Elaboração do autor (2018)

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 essas células culminar ou não em morte celular (AWALE et al., 2008). Assim, a ausência de citotoxicidade em células normais (fibroblastos L929) tal como constatado no presente estudo indica segurança no uso do extrato de própolis da abelha cupira.

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 ser realizados 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 tóxicos e genotóxicos, sobre o material genético, bem como auxilia na descoberta de substâncias antígenotóxicas ou genoprotetores para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA (NIWA; OLIVEIRA; MANTOVANI, 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, tornando-se livres para migrar no campo elétrico 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 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 hidroalcoólico da abelha cupira contra os danos causados no DNA pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Não foram encontrados efeitos genotóxicos do extrato da abelha cupira, uma vez que na comparação das médias dos índices de dano ao DNA da célula L929, em todas as concentrações testadas do extrato, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle negativo (água destilada) (Tab. 5). Também foi possível constatar em todas as concentrações testadas do extrato, que a média dos índices de dano diferiu significativamente do controle positivo (peróxido de hidrogênio) o qual é frequentemente utilizado como substância genotóxica padrão em exposições *in vitro* capazes de promover fragmentação DNA. Nossos dados também mostram que a geoprópolis da abelha cupira apresenta efeito antígenotóxico ou genoprotetor. Os percentuais de redução da genotoxicidade foram 92,2%, 74,5% e 46,1%, respectivamente, para as concentrações de 500, 250 e 100 μ l/mL do extrato (Tabela 6).

Tabela 5 - Média $\pm$ desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato hidroalcoólico da abelha cupira (*Partamona cupira*), após exposição de células da linhagem L929, por 24 horas em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio e a água destilada.

Parâmetro	Concentração do extrato ($\mu\text{L/mL}$)				
	500	250	100	Controle +	Controle -
idDNA	8,11a $\pm$ 2,80	8,00a $\pm$ 2,73	6,77a $\pm$ 2,58	179,22b $\pm$ 11,14	7,88a $\pm$ 2,26

Controle positivo (+): peróxido de hidrogênio (H_2O_2); Controle negativo (-): água destilada

Fonte: Elaboração do autor (2018)

Tabela 6 - Média $\pm$ desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa, para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroalcoólico da abelha cupira (*Partamona cupira*), em células da linhagem L929, co-tratadas com três concentrações de amostras de própolis e peróxido de hidrogênio.

Parâmetro analisado	Concentração do extrato ($\mu\text{L/mL}$)		
	500	250	100
% de redução da genotoxicidade	92,22 $\pm$ 3,38	74,57 $\pm$ 2,95	46,10 $\pm$ 5,36

Fonte: Elaboração do autor (2018)

A literatura sempre 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 (TAVARES et al., 2006). É justamente nessa constatação que a própolis da abelha cupira se enquadra, uma vez que na avaliação da composição química do extrato, constatamos altos teores de compostos fenólicos e flavanóides, além de alta atividade antioxidante. Os compostos fenólicos já foram descritos por apresentar atividade antigenotóxica por causa de sua atividade antioxidante (HOSHINA, 2012). Dessa forma, a atividade antioxidante da própolis da abelha cupira poderia ser a possível explicação para efeito genoprotetor. As substâncias bioativas com capacidade antioxidantes presentes no extrato provavelmente interagiram com o peróxido de hidrogênio, bloqueando seu efeito genotóxico, protegendo assim o DNA. Não existe na literatura estudos de avaliação de mutagenicidade ou de

antimutagenicidade com própolis de abelhas sem ferrão utilizando ensaio cometa. Tal falta ressalta a ineditismo deste estudo.

A constatação da ausência de efeitos genotóxicos e anti-genotóxicos em linhagem de fibroblastos L929, permite sugerir que a própolis pode ser capaz de auxiliar na prevenção de doenças desencadeadas por danos ao DNA.

CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* apresentou em sua composição compostos fenólicos, flavonoides (chalconas, flavonas e flavonóis) que podem ter contribuído para o seu elevado potencial antioxidante e, conseqüentemente atividade genoprotetora, constituindo assim um produto natural bastante promissor da medicina.

Não foi observado nenhum efeito citotóxico, bem como nenhum efeito genotóxico nas concentrações testadas.

REFERÊNCIAS

AFROUZAN, H. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of iranian propolis. **Iranian Biomedical Journal**, v. 22, p. 50-65, 2018.

AKAO, Y. et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1057-1059, 2003.

ALMEIDA, D. C. **Efeito protetor da própolis contra danos quimicamente induzidos no DNA**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Patologia)-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

ALMEIDA, J. M. D. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

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 & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 181-189, 2008.

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

BATISTA, J. S. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 874-888, 2016.

BONAMIGO, T. et al. Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 4, p. 1-12, 2017.

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

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

CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geoprópolis. *BMC Complement. BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, p. 1-9, 2013.

EDUARDO, L. F. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos da geoprópolis (*Melipona scutellaris*) bioguiado pelo efeito antimicrobiano**. 54f. 2014. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2014.

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

FERREIRA, C.F.R. Phenolic profile obtained by HPLC-DAD-ESI/MS and in vitro bioactivities of *Equisetum giganteum* L. and *Tilia platyphyllos* Scop. 10º Encontro Nacional de Cromatografia. Bragança, 2017.

FERREIRA, J.M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture** Ago. v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 2017.

FIANCO, A. L. B. et al. **Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna)**. Revista Liberato, v. 14, p. 111-112, 2013.

FIKROVÁ, P. et al. Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 123, p. 693-699, 2011.

FRANCHIN, M. et al. Geoprópolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 beta and TNF-alfa. **J. Ethnopharmacology**, v. 143, p. 709-715, 2012.

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

GARCIA, R. C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pausterella multocida* “*in vitro*”, **Acta Scientiarum, Animal Science**, v.26, n.1, p.66-77, 2004.

HRNCIR, M.; KOEDA, D.; FONSECA, V. L. I. **A abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro**. Mossoró: EdUFERSA, 2017. 254p.

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

HOSHINA, M. M. **Avaliação da atividade antimutagênica de alguns produtos naturais de origem animal por meio de ensaios com células HepG2**. 2012. 124f. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro.

ISHIHARA, M. et al. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of chinese and brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v. 22, p. 349-354, 2009.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal Ethnopharmacology**, v.90, p.33-39, 2004.

KAMB, A. **What’s wrong with our cancer models?** **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KATAOKA, V. M. F.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 121-129. 2013.

KUNRATH, C. A. et al. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.20, p.1-10, 2017.

LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complement. BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-10, 2011.

LOTUFO, L. V. C. 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 de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.

LOVELL, D. P; THOMAS, G; DUBOW, R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v.19, p.109-119, 1999.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research** v. 15, p. 127-130, 2001.

MEZZALIRA, B; FUNCHAI, C. S.; DANI, C. Ensaio cometa: avaliação da atividade dos calcogênio. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 16, p. 47-55, 2014.

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

MIRANDA-VILELA, A. L. M.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genet. Mol. Biol.**, v. 31, p. 956-963, 2008.

MORENO, M. I. N. et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolid from several regions of Argentina. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p. 109-114, 2000.

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.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

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, 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, p. 433-438, 2012.

OLIVEIRA, C. R. et al. 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 Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 41, p. 133-142, 2012.

OLIVEIRA, D. S. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 33, n. 1, p. 89 – 98, 2011.

PONTES, M. L. C. Chemical characterization and pharmacological action of brazilian red própolis. **Acta Brasiliensis**, v. 2, p. 34-39, 2018.

PORTO, I. C. C. M. et al. 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, p. 2363-2370, 2011.

SALATINO, A. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 925-936, 2011.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, p. 1192-1199, 2016.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of própolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v.56, p. 50-57, 2017.

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

SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 874-888, 2016.

SOUSA, D. M. N. et al. Prospeção fitoquímica, toxicidade in vitro e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinária Brasilica**, v.9, p.134-140, 2015.

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

TAMIELLO, C. **Efeitos da 3-nitrochalcona sobre células de hepatoma humano (HepG2)**. 2013. 82f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TAVARES, D. et al. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 1154-1158, 2006.

CAPÍTULO III

5 AVALIAÇÃO HEPATOPROTETORA DA GEOPRÓPLIS DA ABELHA PARTAMONA CUPIRA NA CIRROSE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TIOACETAMIDA EM RATOS WISTAR

Hepatoprotective evaluation of the bee geopropia *Partamona cupira* in experimental cirrhosis induced by thioacetamide in Wistar rats

Artigo submetido ao periódico
PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Avaliação hepatoprotetora da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* na cirrose experimental induzida por tioacetamida em ratos Wistar¹

RESUMO: Patologias hepáticas estão entre os maiores problemas de saúde de ordem mundial. Sendo assim, cresce o interesse por estudos relacionados ao efeito hepatoprotetor de produtos naturais, objetivando o desenvolvimento de novas drogas com propósito de ampliar as chances de uma maior eficiência e disponibilizar uma variedade de medicamentos com baixo preço de mercado. Com uma composição química complexa e rica em compostos fenólicos, a geoprópolis produzida por *Partamona cupira* exibe um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais se destaca a alta atividade antioxidante, hepatoprotetora e genoprotetor. Alguns estudos evidenciam que assim como a própolis produzida por abelhas do gênero *Apis*, a própolis produzida pelas abelhas indígenas sem ferrão também possui alta atividade biológica. Dessa forma, a presente pesquisa teve por objetivos avaliar o efeito hepatoprotetor dos extratos hidroalcoólicos da geoprópolis produzida pela abelha cupira (*P. cupira*), obtido junto à meliponicultores do semiárido do Rio Grande do Norte. Para tanto, foram avaliados o potencial hepatoprotetor, em ratos com cirrose induzida por TAA por meio da análise bioquímica da função hepática, bem como da avaliação histopatológica dos fígados e quantificação do colágeno. Os resultados dos níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão hepática (AST e ALT), indicaram que o extrato hidroalcoólico da geopropolis da abelha cupira não causou toxicidade hepática. 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 com extrato 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 geoprópolis da abelha cupira, 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 entres esses grupos. Conclui-se, portanto, que o extrato hidroetanólico da geopropolis da abelha cupira apresentou efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela tioacetamida (TAA).

PALAVRAS-CHAVE: Ação hepatoprotetora. Cirrose hepática. Própolis. Meliponídeos. Atividade biológica.

ABSTRACT: Hepatic pathologies are among the world's greatest health problems. Thus, the interest in studies related to the hepatoprotective effect of natural products increases, aiming at the development of new drugs in order to expand the chances of greater efficiency and make available a variety of medicines with low market prices. With a complex chemical composition and rich in phenolic compounds, the geopropolis produced by *Partamona cupira* exhibits a large spectrum of biological activities, among which the high antioxidant, hepatoprotective and genoprotective activity stands out. Some studies show that just like propolis produced by bees of the *Apis* genus, the propolis produced by indigenous stingless bees also has high biological activity. This way, the objective of this research was to evaluate the hepatoprotective effect of the hydroalcoholic extracts of the geopropolis produced by the cupira bee (*P. cupira*), obtained from the meliponicultores of the semiarid region of Rio Grande do Norte. For this, the potential hepatoprotector was evaluated through the induction of experimental cirrhosis in rats and biochemical analysis of liver function, as well as histopathological assessment of livers for quantification of collagen and stereology, and also the weight of cirrhotic and non-cirrhotic livers. The results of serum levels of hepatic injury indicating enzymes (AST and ALT), indicated that the hydroalcoholic extract of the geopropolis of the cupira bee did not cause hepatic toxicity. 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 treated with extract it was possible to verify that the regenerative nodules characteristic of cirrhosis were smaller and more discrete, when compared to the animals of 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 the geopropolis of the honey bee, which was able to reduce the damage to the hepatocytes, although no statistical difference was observed in the weight of the livers in these groups, stereological analysis showed that there was a significant difference in the percentage of hepatocytes and collagens among these groups. It was concluded, therefore, that the propolis hydroalcoholic extract of the cupira bee had a hepatoprotective effect against hepatic damage induced by thioacetamide (TAA).

KEY WORDS: Hepatoprotective action. Hepatical cirrhosis. Propolis. Meliponines. Biological activity.

INTRODUÇÃO

O Brasil é rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, ou ainda, meliponídeos. Os meliponídeos tem importância econômica e cultural nas regiões onde ocorrem, sendo polinizador de diversas plantas nativas, além de produzir mel, cera e própolis que são comercializados tornando-se alternativa para aumentar a renda dos pequenos produtores rurais e aos agricultores familiares (SOUZA et al., 2009).

Atualmente, a meliponicultura é uma prática que alcança destaque no Estado do Rio Grande do Norte, sendo em algumas ocasiões atividade econômica complementar bem estabelecida, pois seus produtos são bastante apreciados pela população local devido seus valores nutricionais e terapêuticos (SOUZA et al. 2004).

A *Partamona cupira* é uma espécie que ocorre em áreas da caatinga por todo o Nordeste. No Rio Grande do Norte, ocorre em toda a porção da caatinga, sendo mais rara nas áreas de transição. São abelhas escuras com asas foscas e tegumento liso, polido e brilhante (HRNCIR; KOEDA; FONSECA, 2017), relativamente mansas e nidificam em cupinzeiros de barro, normalmente aéreos. A entrada do ninho é pouco ornamentada e com bordo liso sem reentrâncias.

As abelhas têm a própolis como a sua "arma química" mais importante, utilizando-a contra micro-organismos patogênicos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colmeia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (MIGUEL; ANTUNES, 2011). De acordo com Cardinault, Cayeux e Sert. (2012), entre os compostos da própolis encontram-se, em sua maior parte, flavonoides, outros ésteres fenólicos e seus derivados, compostos aromáticos, minerais (ferro, cálcio, zinco, cobre, manganês) e vitaminas (B, C, E).

Durante as últimas décadas, muitas atividades biológicas foram atribuídas a própolis, sendo confirmadas cientificamente como: ação antimicrobiana (CARDINAULT, CAYEUX; SERT, 2012), anti-inflamatória (FABRIS 2013), antioxidante (SALGUEIRO; CASTRO 2016, KUNRATH, 2017), hepatoprotetor, antitumoral, cicatrizante no tratamento de queimaduras, feridas e úlceras, dentre outros (SFORCIN; BANKOVA 2011; AFROUZAN; SEDIGHEH; HAGHI, 2018, PONTES et al. 2018). Embora observado

crescente aumento de pesquisas com própolis, ainda são escassas informações sobre o uso de produtos à base de própolis no contexto pré e clínico (SFORCIN; BANKOVA 2011).

Neste contexto, objetivou-se avaliar o potencial hepatoprotetor do extrato hidroalcoólico da geoprópolis produzida pela abelha *P. cupira* no semiárido do Rio Grande do Norte, na cirrose experimental induzida por tioacetamida em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras de geoprópolis foi realizada de forma asséptica, seguindo as técnicas recomendadas pelos regulamentos técnicos (Brasil, 2001), no período de maio a junho de 2015. As amostras foram pesadas em balança eletrônica, identificadas, armazenadas em frascos esterilizados, e mantidos a -20°C até a produção do extrato. Para a confecção do extrato hidroalcoólico da geoprópolis foram pesados 30g de geoprópolis, submetidas a secagem em estufa de circulação de ar a 40°C por 48h. Em seguida, a amostra foi triturada em liquidificador, transferida para vasilhames de vidro âmbar e adicionado álcool a 70°GL, na proporção de 1:5 (para cada 1g de geoprópolis triturada utilizou-se 5mL de álcool).

Os vidros foram devidamente identificados e agitados manualmente por 1 minuto diariamente, durante 20 dias consecutivos de infusão conforme Garcia et al. (2004). Para remoção do solvente, o material foi concentrado por rotaevaporizador a 60°C, e secagem em estufa a 37°C por 24 horas.

Para a indução da cirrose experimental, foram utilizados 40 *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), linhagem Wistar, machos, com 60 dias de idade pesando aproximadamente 200g, provenientes do Biotério Central da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN). Durante o período experimental, todos os animais permaneceram no próprio Biotério, alojados em caixas de polipropileno (4 animais por caixa) forradas com maravalha, sob controle de temperatura (21 a 23°C), fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo ração comercial (Purina®) e água *ad libitum*. Segundo o fabricante, a ração apresenta 23% de proteína bruta, 4% de lipídios totais, 5% de fibra e 12% de minerais.

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), com número de protocolo 006/15 (Anexo).

Os ratos receberam injeções intraperitoneal de tioacetamida (TAA) (0,2g/Kg) três vezes por semana durante 14 semanas (FAN et al. 2007, ESMAT et al. 2013, AYDIN et al. 2010). Os animais receberam água ou extrato por via oral (gavagem) diariamente durante todo o procedimento experimental e foram distribuídos da seguinte forma: grupo G1 (5 animais), controle, não recebeu nenhum tratamento, sendo administrado diariamente 0,5mL de água potável por via oral, durante 14 semanas; grupo G2 (5 animais), receberam somente os extratos de própolis por gavagem durante 14 semanas (50mg/mL), o grupo G3 (15 animais), foi submetido ao modelo de cirrose hepática com injeções de TAA (0,2g/kg, i.p.) três vezes por semana durante 14 semanas. Quinze dias antes de iniciar a administração da TAA iniciou-se a administração diária do extrato da geoprópolis aos animais por meio de gavagem. Nos dias em que coincidia a administração do extrato com a aplicação da TAA, o extrato era administrado 1 hora antes da aplicação da mesma; enquanto o grupo G4 (15 animais), grupo cirrótico, recebeu 0,2g/kg de TAA, via intraperitoneal, três vezes por semana e 0,5mL de água potável por via oral todos os dias, durante 14 semanas.

No final do período experimental (décima quarta semana), os animais foram anestesiados utilizando solução de cetamina (100mg/kg, i.p.), e xilazina (100mg/kg, i.p.). Após anestesia, foi realizada a celiotomia através de incisão sobre a linha alba, de modo a permitir acesso à veia hepática. Realizou-se a coleta de 3ml de sangue de cada animal, utilizando-se seringa e agulha 0,30x0,70mm. O sangue foi acondicionado em tubos sem a adição de anticoagulante, em seguida inclinados e mantidos em repouso para obtenção do soro sanguíneo. O material foi acondicionado em caixas térmicas e enviado para realização das análises bioquímicas.

As amostras de soro sanguíneo foram analisadas para determinações dos seguintes marcadores sanguíneos de lesão hepática: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina (ALB), proteína total (TP), glicose (GLIC) e triglicerídeo total (TRIG). Para tanto, as amostras foram testadas por meio de reagentes comerciais (VIDA Bioteconologia®) e em seguida submetidas à leitura em aparelho analisador bioquímico por meio de espectrofotometria.

Após a eutanasia por exsanguinação sob anestesia profunda, os animais foram submetidos à necropsia utilizando-se a técnica proposta por Vasconcelos (1996), com exame externo do animal. O fígado de cada animal foi retirado e pesado, com o auxílio de balança de precisão e examinado de modo a permitir a identificação de possíveis

alterações, considerando especialmente alterações de peso, tamanho, coloração, consistência e a presença de nódulos, característicos de cirrose.

O fígado de todos os animais experimentais foi lavado com solução de NaCl a 0,9%, fixados em solução tamponada de formol a 10% e processados de forma rotineira para histologia, incluídos em parafina, cortados a 5µ de espessura, corados pela hematoxilina-eosina (HE), e picrossírius red para análise das fibras colágenas, segundo estabelecido por ANDRADE et al. (1999).

Estes cortes histológicos foram examinados quanto à presença de degeneração vacuolar das células que compõem o parênquima hepático, infiltração de células inflamatórias e necrose dos hepatócitos. A fibrose hepática foi avaliada pela quantificação e qualificação das fibras colágenas (colágeno tipo I e tipo III). Para isso, as imagens das lâminas histológicas foram digitalizadas utilizando-se microscópio de polarização (Nikon Eclipse MA 100) conjugado a câmera fotográfica digital e analisados por meio do software NIS – Elements D.

Para as análises estereológicas, os fígados foram fragmentados seguindo um padrão de amostragem aleatório, uniforme e sistemático (SUR) conforme descrito por Marcos, Monteiro e Rocha (2012).

Os fragmentos hepáticos (no mínimo dois fragmentos por animal) selecionados aleatoriamente foram submetidos a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e corados com picrossírius. De cada fragmento foram obtidas duas seções de 5µm e, posteriormente cinco campos microscópicos aleatórios capturados na objetiva de 20x utilizando um sistema videomicroscópico (Leica) para cada secção, no total de 20 campos analisados cegamente de cada animal. Sobre a imagem de cada campo foi sobreposto um sistema de teste composto por 50 pontos de teste (PT) utilizando o software Image Pro-Plus (Versão 4.5.0.29.), sendo considerando os hepatócitos, os sinusóides e a fibrose hepática para determinação da densidade volumétrica (Vv) por meio da seguinte fórmula: $Vv = PP/PT (\%)$ (PP representa os pontos que atingem a estrutura).

Para determinação da densidade de volume das fibras colágenas nos espaços perissinusoidais, as lâminas foram fotografadas por meio de câmera acoplada ao microscópio de luz polarizada (Nikon Eclipse MA 100). Os campos foram selecionados aleatoriamente, com ajuda do programa Image Pro-plus, obteve-se o percentual de colágeno por meio de análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Os valores para cada tipo de colágeno foram padronizados para

todas as imagens do seguinte modo: matriz 0-169 para o parêquima, 170-190 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 191-255 para a cor verde (colágeno tipo III).

Os valores foram expressos em valores de média±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 $\sqrt{x}$.

Quando rompido distribuição gaussiana os valores foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes bioquímicos fornecem informações sobre o estado do fígado, sendo um método muito útil para o reconhecimento das doenças que afetam a funcionalidade hepática (DEVERAJ et al. 2011). No presente estudo, a função hepática foi determinada através da análise da bioquímica sérica, o qual demonstrou que os valores médios dos níveis séricos das enzimas ALT e AST, proteínas totais, glicose e triglicerídeos não diferiram significativamente entre G1, G2 e G3, quando comparadas entre si. As médias dos níveis séricos das enzimas ALT e AST aumentaram significativamente no G4 em relação aos G1, G2 e G3. No G4 observou-se ainda redução dos valores médios dos níveis de albumina e proteína total e diferença significativa em relação aos demais grupos.

A análise dos parâmetros bioquímicos séricos (Tabela 1) confirmou o efeito deletério da TAA, uma vez que os valores médios das enzimas ALT e AST foram significativamente superiores aos valores observados nos demais grupos. As enzimas AST e a ALT, embora não sejam específicas do fígado, sendo também encontradas em outros locais como músculo e coração, suas elevações são mais frequentes em casos de doenças hepáticas, podendo refletir dano ao fígado, uma vez que quando ocorrem lesões ou destruição das células hepáticas, há liberação destas enzimas para a circulação sanguínea (DEVERAJ et al. 2011).

Tabela 1 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos, marcadores de lesão hepática em ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da geoprópolis), G3 (tratados com extratos da geoprópolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).

Variáveis	Grupos experimentais			
	G1	G2	G3	G4
AST (U/L)	67,67 $\pm$ 12,23b	85,67 $\pm$ 7,2b	94,8 $\pm$ 14,92c	159,58 $\pm$ 27,22a
ALT (U/L)	64,33 $\pm$ 8,64b	74,83 $\pm$ 9,66b	88,91 $\pm$ 16,11b	145,5 $\pm$ 46,68a
ALB (g/dL)	4,36 $\pm$ 0,32a	4,25 $\pm$ 0,22a	4,0 $\pm$ 0,0a	2,76 $\pm$ 0,42b
GLIC (mg/dL)	127,5 $\pm$ 4,59a	146,67 $\pm$ 31,42a	125,17 $\pm$ 34,98 ^a	256,83 $\pm$ 27,82b
TRIG (mg/dL)	41,67 $\pm$ 12,95a	49,5 $\pm$ 14,32a	41,2 $\pm$ 10,36a	75,58 $\pm$ 6,93b
PT (g/dL)	6,93 $\pm$ 0,65b	6,03 $\pm$ 0,41c	6,71 $\pm$ 0,4bc	4,85 $\pm$ 0,66a

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, GLIC: glicose, TRIG: triglicerídeos, PT: proteína total.

Fonte: Elaboração do autor (2018)

Os resultados obtidos para as enzimas ALT e AST demonstraram que seus níveis não sofreram alterações quando comparadas os G1 e G2, indicando que a administração do extrato da própolis da abelha cupira, na dose testada, não causou toxicidade hepática. Esse fato corrobora com os dados obtidos com o estudo histopatológico do fígado, o qual não apresentou nenhuma alteração macroscópica ou histológica. É importante ressaltar que não houve diferença estatística significativa entre o G3 e os G1 e G2, indicando que a própolis da abelha cupira exerceu efeito hepatoprotetor contra a agressão induzido pela TAA. Esses dados corroboram com os obtidos por Paulino et al. (2014), quando observou o efeito hepatoprotetor da própolis verde através da função bioquímica em ratos induzidos a hepatotoxicidade utilizando tetracloreto de carbono (CCL₄). Resultados semelhantes a estes também foram encontrados por Jesus, Waitzberg e Campos (2012), quando observou que animais ao receberem pré-tratamento com asiaticosídeo mostraram expressiva diminuição dos valores de AST e ALT, em relação ao grupo controle positivo. Da mesma forma Antony et al. (2006) em modelo experimental de injúria hepática causada por tetracloreto de carbono em ratos, e por Zhang et al. (2010) em modelo experimental de lesão hepática induzida com lipopolisacarídeo/D-galactosamina em camundongos,

obtiveram redução dos níveis de AST e ALT. De acordo com Herrera et al. (2010) e Ramírez Dideliz et al. (1994), a característica hepatoprotetora da própolis é comprovada pela redução da AST e aumento da glutatona no fígado.

A redução significativa dos valores médios dos níveis séricos de albumina e proteína total no G4 reflete claramente as alterações morfológicas e funcionais do fígado dos animais tratados com a TAA. A albumina é sintetizada exclusivamente no fígado, da mesma forma que a maioria das proteínas plasmáticas. Assim, nas doenças hepatocelulares podem ocorrer alterações da síntese proteica, desde que se excluam deficiência proteica dietética, falhas na absorção intestinal de proteínas, ou ainda perda protéica por proteinúria. Os baixos níveis séricos de albumina e proteínas totais reflete, segundo Shupband e Afdhal (2008), um dano hepatocelular grave, o qual foi coincidente com o quadro de cirrose hepática verificada nos exames macroscópicos e histológicos nos animais pertencentes ao referido grupo. El - Ashmawy et al. (2005), obtiveram resultados semelhantes a estes quando observaram diminuição dos níveis séricos de albumina em ratos que receberam CCl₄ comparados aos ratos que receberam própolis. Da mesma forma Ramadan et al. (2015), observou alteração nos níveis séricos de albumina e proteína, em ratos intoxicados com dgalactosamine/lipopolysaccharide, estando de acordo com os dados obtidos nesta pesquisa.

No presente estudo, as provas de função hepática determinada através da análise da bioquímica sérica, também evidenciaram o efeito hepatoprotetor do extrato hidroalcolico da própolis da abelha cupira, frente ao dano hepático induzido pela TAA. Os compostos derivados da TAA, formados durante sua metabolização, são responsáveis pela hepatotoxicidade dessa droga (CHILAKAPATI et al. 2005). Tais compostos induzem a produção de radicais livres, que reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica no fígado, provocam aumentos no cálcio citosólico, promovendo lesão e ruptura da membrana plasmática 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 graxo, além de inibir o transporte de RNA do núcleo para o citoplasma (DAVID et al. 2002).

Uma vez que a própolis pode funcionar como uma fonte importante de antioxidantes naturais, que tem a capacidade de bloquear os efeitos deletérios dos radicais livres, o efeito de proteção hepática constatado na presente pesquisa pode estar associada com a propriedade antioxidante da geoprópolis. Corroborando com Paulino et al. (2014), que

demonstraram em seus resultados que a própolis verde pode ser um potente captador de radicais livre de lipoperóxidos e este efeito pode estar relacionado com a ação hepatoprotetora sobre o dano hepático induzido por CCl₄. Segundo Garcia et al. (2004) e Oliveira e Bastos (2011) a presença de ácidos fenólicos faz com que a própolis apresente os benefícios de ser antioxidante.

Como o fígado é o principal órgão para a metabolização de compostos, muitas doenças hepáticas são decorrentes da exposição do fígado a substâncias tóxicas, sendo que o estresse oxidativo promovido por essas substâncias tem grande importância nos mecanismos fisiopatológicos das doenças hepáticas (VOICAN; PERLEMUTER; PERLEMUTER, 2011). Os antioxidantes impedem a peroxidação dos lipídeos da membrana celular e das organelas dos hepatócitos, protegendo, desta forma, a integridade e a função hepática de eventuais substâncias tóxicas (NASCIMENTO; ARAÚJO; MELO 2010). Dessa forma, a presença do estresse oxidativo na doença hepática crônica e os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio nos hepatócitos, têm justificado o uso de antioxidantes como terapia protetora complementar, e estudos em modelos animais, linhas de células e em seres humanos com diversas doenças hepáticas têm esclarecido essa função (CZAJA, 2014).

No exame macroscópico dos fígados coletados dos animais ao final do período experimental, foi possível constatar que os animais dos G1 e G2 apresentaram fígados com aspecto morfológico dentro da normalidade observada para a espécie, sem alterações anatômicas. Todos os animais do G4 desenvolveram cirrose, perceptível no exame macroscópico. Os fígados dos referidos animais apresentaram coloração opaca, com presença de múltiplos nódulos regenerativos de tamanho variáveis na superfície, cápsula espessada, além de consistência endurecida, resistente ao corte. Nos fígados dos animais do G3 também foi possível constatar quadro característico de cirrose, no entanto, as alterações macroscópicas foram menos expressivas quando comparados os fígado do G4. Os animais do G3 apresentam fígados com nodulação menos evidente, cápsula menos espessada, além de consistência relativamente macia e coloração mais próxima do padrão (Figura 1), semelhante macroscopia obteve Guerra et al. (2009) após administração intraperitoneal de TAA por 14 semanas, onde induziram uma cirrose macronodular crônica em ratos Wistar. Laleman et al. (2006), corrobora também com os dados obtidos ao afirmar que a fibrose hepática e os nódulos regenerativos pela cirrose induzida por TAA são mais proeminentes macroscopicamente.

Na avaliação histopatológica, realizada nas lamínas histológicas coradas pela hematoxilina eosina, evidenciou-se que o tecido hepático dos animais dos G1 e G2, não apresentou alterações, demonstrando aspecto histopatológico normal. Nos animais do grupo G3 e G4 as lesões foram principalmente de natureza degenerativa, regenerativa e fibrótica, confirmando o quadro de cirrose observado no exame macroscópico. No entanto, as alterações histológicas foram mais intensas no fígado dos animais do G4. Nestes animais foi possível constatar deposição de tecido conjuntivo fibroso ao redor dos ductos e espaços-portais, além da presença de grandes nódulos regenerativos de hepatócitos circundados por espessos septos fibrosos em ponte, hiperplasia de ductos biliares e degeneração vacuolar dos hepatócitos. No fígado dos animais do G3 foi possível constatar presença de discreta fibrose redor dos ductos e nos espaços-porta, os septos de tecido conjuntivos em ponte apresentaram-se finos, nódulos regenerativos menores e pouco evidentes, além de discreta hiperplasia de ductos biliares e degeneração vacuolar dos hepatócitos (Fig.2). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com outros estudos realizados por diferentes autores (PAWA et al. 2008, BASKARANA; PERIYASAMYB; VENKATRAMANA, 2010). Dados semelhantes observaram David et al. (2011), ao avaliar o efeito hepatoprotetor da quercetina na cirrose induzida por TAA.

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 (RAMADAM et al. 2015, BASNET et al. 1996). 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 (BASKARANA; PERIYASAMYB; VENKATRAMANA, 2010).

Figura 1 - Aspecto macroscópico dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1- A (controle), G2 - B (tratados com extratos da geoprópolis), G3 - C (tratados com extratos da geoprópolis e TAA) e G4 - D (tratados com TAA). Notam-se nos G1 e G2 fígados com aspecto morfológico normal, no G4 fígado cirrótico com presença de grandes nódulos regenerativos na superfície, no G3 fígado cirrótico com pequenos nódulos regenerativos.

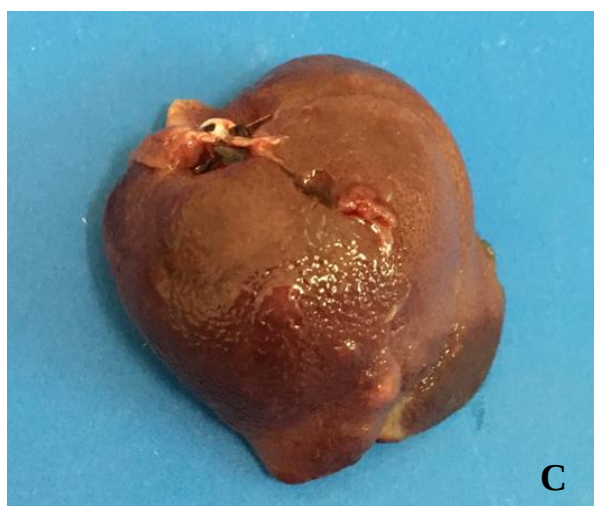
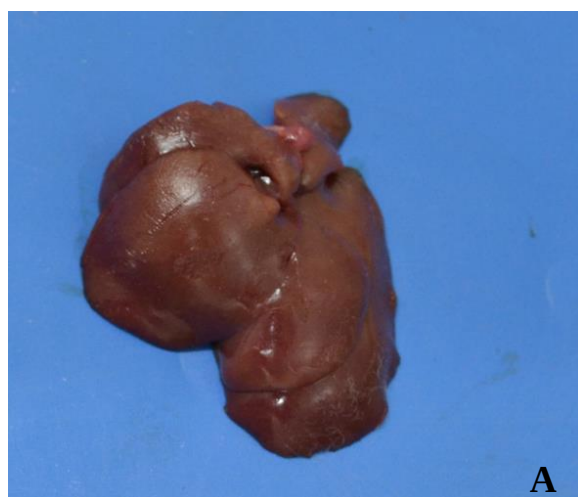
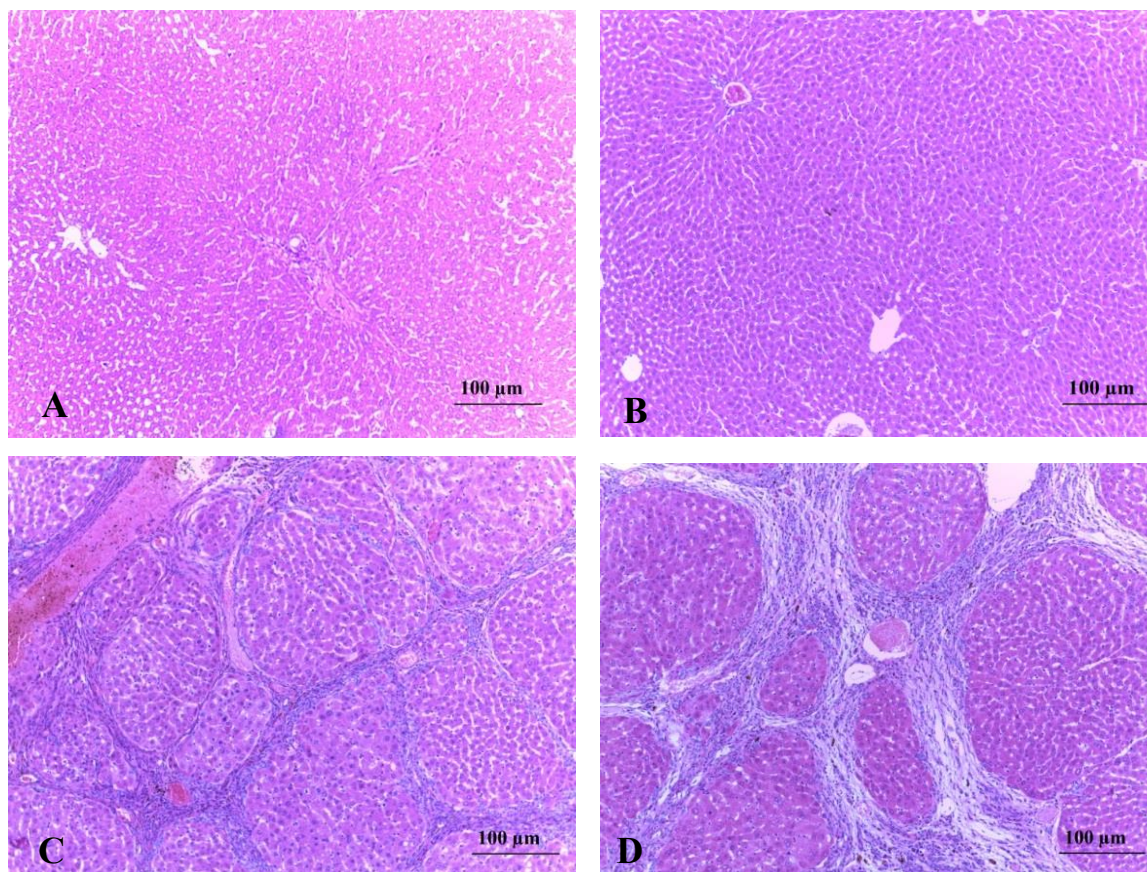


Figura 2 – Fotomicrografias dos fígados de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina. Grupos experimentais G1 - A (controle), G2 - B(tratados com extratos da própolis), G3 - C(tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 - D(tratados com TAA). Nota-se nos G1 e G2 fígados com aspecto histológico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



Fonte: Elaboração do autor (2018)

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 cirrose, a tioacetamida (TAA), droga originalmente usada como fungicida para proteger laranjas contra a deterioração foi reconhecida posteriormente como potente hepatotoxina, demonstrou ser o mais promissor, por produzir padrão morfológico macroscópico e histológico que se assemelham a cirrose em humanos e apresentar a menor taxa de mortalidade (LALEMAN et al. 2006).

Dessa forma, nos fígados dos animais pertencentes ao grupo tratados com TAA foi observado perda do padrão arquitetônico do órgão, com presença de nódulos característicos da cirrose no exame macroscópico e espessos septos fibrosos ao redor dos nódulos regenerativos, ductos e espaços-portais no exame histológico. A avaliação macroscópica e histológica dos fígados dos animais do G2 evidencia que a administração oral do extrato hidroalcoólico da própolis da abelha cupira não produziu efeito hepatotóxico uma vez que os fígados dos animais do referido grupo não apresentaram alterações, demonstrando aspecto histopatológico normal.

Através da avaliação macroscópica e histológica dos fígados é possível também sugerir que o extrato da própolis analisado exerceu efeito hepatoprotetor na gravidade da cirrose, uma vez que nos fígados dos animais do G3 foi possível constatar que os nódulos regenerativos característicos da cirrose foram menores e mais discretos, quando comparados aos dos animais do G4. A cápsula do órgão apresentou-se menos espessada, além de consistência relativamente macia e coloração mais próxima do padrão normal, também no exame histológico foi possível constatar nos animais do referido grupo que a deposição de tecido conjuntivo foi menos intensa, os septos que envolviam os nódulos regenerativos apresentaram-se finos e também os nódulos regenerativos pouco evidentes. Segundo Ramadam et al. (2015), ao avaliar o efeito hepatoprotetor de própolis, não verificou lesões histológicas significativas nos fígados dos ratos que receberam a própolis. Da mesma forma, Paulino et al. (2014), observou que a própolis verde demonstrou a capacidade de preservar a integridade estrutural da membrana hepatocelular exibindo atividade hepatoprotetora.

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. O percentual de hepatócitos do G3 não diferiu significativamente do G2. No entanto, no G4 o percentual de hepatócitos reduziu significativamente em relação aos demais grupos. O percentual de sinusóides não diferiu significativamente nos G1, G2 e G3. Porém, da mesma forma que os hepatócitos, houve redução significativa do percentual de sinusóides no G4. Quanto ao percentual de colágeno presente no tecido hepático, a análise estereológica também demonstrou que não houve diferença significativa do percentual de colágeno nos G1 e G2. No entanto, observou-se aumento significativo do percentual de colágeno nos G3 e G4, mas, quando realizado a comparação entre esses grupos, o percentual de colágeno presente no G3 foi menor em relação ao G4 (Tabela 2). Esse

aumento das fibras colágenas é estimulado pelo microambiente de células apoptóticas e fatores pró-fibróticos secretados pelos macrófagos (LENCH; ANDRES 2013).

Tabela 2 - Valores de média $\pm$ desvio padrão da densidade de volume de hepatócitos, sinusóides e colágeno dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da geoprópolis), G3 (tratados com extratos da geoprópolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).

Grupos experimentais				
Variáveis	G1	G2	G3	G4
Hepatócitos	74,56 + 6,12a	71,44 + 1,33ab	62,64 + 7,49b	48,56 + 3,76c
Sinusoides	20,08 + 5,19a	23,0 + 1,83a	18,8 + 3,09ab	15,76 + 4,11b
Colágeno	6,04 + 1,54c	5,56 + 2,34c	19,56 + 6,45b	37,68 + 6,7a

a,b,c Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor (2018)

No presente estudo, buscou-se analisar as imagens histológicas do tecido hepático pelo método estereológico. Neste, é possível determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos bidimensionais (MOUTON, 2002; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; OCHS, 2006). A estereologia é uma ferramenta que proporciona excelentes resultados uma vez que permite a obtenção de dados confiáveis no tocante à análise quantitativa de material de origem histológica (Mandarim-de-Lacerda, 2003). 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 atribuído ao efeito lesivo da TAA sobre essas células, enquanto que o maior valor do percentual de hepatócitos no G3 em relação ao G4 pode indicar que a própolis protegeu os hepatócitos do efeito deletério da TAA, ou ainda que possivelmente a própolis pode ter contribuído para a regeneração de hepatócitos lesionados.

As alterações dos percentuais de sinusóides também refletem as 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.

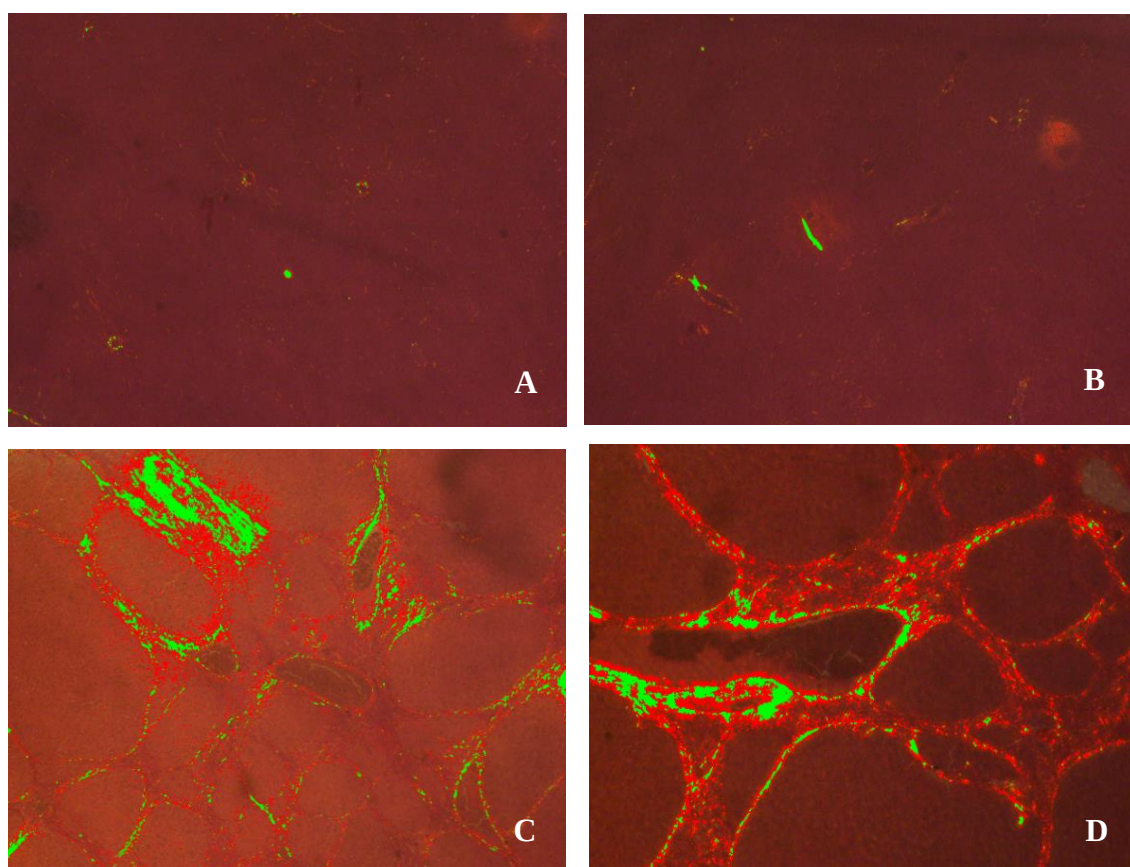
Suas paredes são revestidas de células endoteliais fenestradas que expõe os hepatócitos diretamente a uma série de hormônios, fatores de crescimento e nutrientes, que possuem ação hepatotrófica (Jesus et al. 2012). A redução significativa do percentual de sinusóides no G4 pode ser explicada pelo estabelecimento da fibrose que ocorreu com maior intensidade no referido grupo. Segundo Bedossa e Paradis (2003), a morte dos hepatócitos leva ao reparo por fibrose, na qual há deposição do tecido fibroso, que vai ocorrer ao redor dos vasos sinusóides, causando fibrose obliterativa, que como consequência pode resultar no comprometimento do fluxo sanguíneo intra-hepático e do fluxo 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 deteriorar suas funções.

As alterações verificadas nos percentuais de colágenos também pode 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 que, em resposta a uma agressão direta ou a uma inflamação, se forma uma grande quantidade de tecido fibroso (BRANDÃO et al., 2006) 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 da abelha cupira, o qual foi capaz de reduzir o dano aos hepatócitos, a fibrose reparativa e manutenção do padrão histológico próximo ao observado tecido hepático normal, como verificado nos grupos G1 e G2.

Nas lâminas coradas em picrossírius, realizou-se a quantificação do colágeno presente no tecido hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais. Através desse método de coloração foi possível quantificar o percentual ocupado pelo colágeno tipo I (coloração vermelha), tipo III (coloração verde) e o parênquima hepático em relação à área total da imagem, que é equivalente à proporção volumétrica dos referidos parâmetros quantificado no fígado. O parênquima hepático foi o componente principal da área total das imagens em todos os grupos experimentais. A análise dos dados evidenciou que não houve diferença significativa para o colágeno tipo I, tipo III e parênquima hepático nos G1 e G2 (Fig.3). Observou-se aumento significativo do colágeno tipo I nos G3 e G4 em relação aos demais grupos, sendo que o percentual desse tipo de colágeno foi maior no G4. O percentual colágeno tipo III também aumentou significativamente nos grupos G3 e G4

em relação aos demais grupos. Também foi possível constatar redução significativa do parênquima nos G3 e G4 em relação aos demais grupos (Tabela 3).

Figura 3 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de ratos Wistar corados pelo método de picrossirius. Grupos experimentais G1- A (controle), G2 - B (tratados com extratos da própolis), G3 – C (tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 - D (tratados com TAA). Nota-se em vermelho o colágeno tipo I e verde o colágeno tipo III.



Fonte: Elaboração do autor (2018)

Tabela 3 - Valores em percentual de média $\pm$ desvio padrão da quantificação de colágeno em ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da própolis), G3 (tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).

Variáveis	G1	G2	G3	G4
Tipo I	1,83 $\pm$ 0,00a	1,86 $\pm$ 0,00a	6,04 $\pm$ 4,36b	16,14 $\pm$ 2,26c
Tipo III	2,90 $\pm$ 0,03 ^a	2,27 $\pm$ 0,04 ^a	6,05 $\pm$ 1,96b	5,20 $\pm$ 2,02b
Parênquima	95,27 $\pm$ 0,03 ^a	95,88 $\pm$ 0,04 ^a	80,75 $\pm$ 2,36b	80,78 $\pm$ 3,94b

a,b,c Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor (2018)

As alterações observadas nos percentuais de colágeno tipo I e III confirmam o estado dinâmico e de remodelagem que ocorre no colágeno durante o processo reparativo (JIANG et al. 2016). Considerando que a fibrose é uma resposta comum a lesões crônicas no fígado, caracterizada pelo acúmulo de células na matriz, um processo de cicatrização combatendo uma injúria tecidual, levando a uma cirrose onde o indivíduo tem sérias complicações (JIANG et al. 2016). O colágeno do tipo I é o mais encontrado nos tecidos conjuntivos em geral e forma fibrilas mais longas e espessas (AGUIAR et al. 2009), sendo considerado o principal tipo de colágeno presente no fígado em cirrose avançada.

Enquanto o colágeno do tipo III forma fibrilas mais delgadas, também chamadas de fibras reticulares. Quanto ao resultado obtido neste trabalho é necessário ressaltar que a redução significativa do colágeno tipo I no G3 significando uma melhora morfológica e consequentemente funcional do fígado, confirma mais uma vez o efeito hepatoprotetor da própolis, e de acordo com Kawada (2011), a cirrose pode regredir dependendo do sucesso do tratamento e da etiologia. Nosso resultado corrobora com Paulino et al. (2014), que observou efeito hepatoprotetor da própolis em dano hepático induzido por CCl₄. Semelhantes resultados obteve Banskota et al. (2000), ao avaliar o efeito hepatoprotetor de diversas própolis.

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 e diferença significativa em relação aos demais grupos (Tabela 4). O aumento do peso dos fígados nos G3 e G4 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 (RAMADORI; SAILE 2004), assim,

frequentemente ocorre hipertrofia do fígado, tal como observado nos fígados dos animais dos G3 e G4, estando esses resultados de acordo com a literatura, em que a maior proporção do fígado nos animais com cirrose está relacionada ao desenvolvimento de processos inflamatórios (RAMADORE; SAILE 2004). Cabe salientar que embora não tenha sido verificada diferença estatística do peso dos fígados nos G3 e G4, a análise estereológica demonstrou que houve diferença significativa no percentual de hepatócitos e de colágenos entre esses grupos. O percentual de hepatócitos foi de 62,6% e 48,5%, respectivamente para os G3 e G4, enquanto que o percentual de colágeno foi de 19,5% e 37,6%, respectivamente para os G3 e G4, significando uma melhora sob o aspecto morfológico do tecido hepático, o qual provavelmente contribui para a melhora funcional do órgão, tal qual como pode ser constatado na análise da bioquímica sérica.

Tabela 4 - Valores de média $\pm$ desvio padrão do peso dos fígados de ratos Wistar nos grupos experimentais G1 (controle), G2 (tratados com extratos da própolis), G3 (tratados com extratos da própolis e TAA) e G4 (tratados com TAA).

Variável	Grupos experimentais			
	G1	G2	G3	G4
Peso	10,05 $\pm$ 2,74 a	9,35 $\pm$ 0,89 ^a	17,01 $\pm$ 0,89b	20,17 $\pm$ 7,35b

a,b,c Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor (2018)

CONCLUSÕES

Os resultados dos níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão hepática (AST e ALT), indicaram que o extrato hidroalcoólico da geoprópolis da abelha cupira (*Partamona cupira*) não causou toxicidade hepática e exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela TAA.

Através da avaliação histopatológica dos fígados foi possível constatar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroalcoólico da geoprópolis da abelha cupira, uma vez que as alterações macroscópicas e histológicas indicativas de cirrose foram menos expressivas nos G3, como o aumento do percentual de hepatócitos e sinusóides hepáticos, além da redução do colágeno tipo I.

REFERÊNCIAS

- AFROUZAN, H.; SEDIGHEH, A. Z.; HAGHI, A. E. Chemical composition and antimicrobial activities of iranian propolis. **Biomedical Journal**, Iran, v. 22, n. 1, p. 50-65. 2018
- AGUIAR, L. R. F. et al. Regeneração do fígado de ratos após oclusão parcial da drenagem venosa hepática. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 22, n. 2, p. 89-95, 2009.
- ANAZETTI, M. C. et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, n. 2/3, p. 261-274, 2003
- ANDRADE, G. B. et al. Use of the Picrosirius polarization method to age fibrotic lesions in the hepatic granulomas produced in experimental murine schistosomiasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 265-272. 1999.
- ANTONY, B. et al. Hepatoprotective effect of Centella asiatica (L) in carbon tetrachlorideinduced ,liver injury in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 6, p. 772-776, 2006.
- AYDIN, A. F. et al. Effect of carnosine against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rat. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 67-71, 2010.
- BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal Ethnopharmacology**, v. 72, n. 2, p. 239-246. 2000.
- 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. **Toxicology**, v. 268, n. 3, p. 204-212, 2010.
- BASNET, P. et al. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 11, p. 1479-1484, 1996.
- BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 504-515, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2001.
- CARDINAULT, N.; CAYEUX M. O.; SERT P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.
- CHILAKAPATI, J. et al. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 33, n. 12, p. 1877-1885, 2005.

CZAJA, A. J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. **World Journal Gastroenterology**, v.20, n. 10, p. 2515-2532, 2014.

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.

DEVARAJ, V. C. et al. Hepatoprotective activity of Hepase-a polyherbol formulation. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p.142-146, 2011.

EL-ASHMAWY N. E. et al. **Comparative study of the hepatoprotective effect of propolis versus colchicine in chemically-induced liver cirrhosis**. 2005. 17p. Disponível em: <www.researchgate.net/280841602>. Acesso em: 5 maio 2017.

ESMAT, A. Y. et al. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 258-267, 2013.

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

FAN, J. et al. Saikosaponin-d attenuates the development of liver fibrosis by preventing hepatocyte injury. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 189-195, 2007.

GARCIA R. C. et al. Efeito do extrato alcóolico do própolis sobre a *Pasteurella mutocida* “in vitro”. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 69-77, 2004.

GUERRA, R. R. et al. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034. 2009.

HERRERA, C. L. et al. El propoleos reduce la esteatosis hepatica inducida por dieta em ratones. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 1, p. 75-84, 2010.

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

HRNCIR, M.; KOEDA D.; FONSECA, V. L. I. A abelha jandaíra: no passado, presente e no futuro. Mossoró: EdUFERSA, 2017. 254p.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 242-54, 2012.

JIANG, Z .G. et al. Aspirin use is associated with lower indices of liver fibrosis among adults in the United States. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 6, p. 734-743., 2016.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005.

KAWADA, N. Evolution of hepatic fibrosis research. **Hepatology Research**, v. 41, n.3, p. 199-208, 2011

KUNRATH, C. A. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 1-10, 2017.

LALEMAN, W. et al. A stable model of cirrhotic portal hypertension in rat: thioacetamide revisited. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 4, p. 242-249, 2006.

LENCH, M.; ANDERS H. J. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, n. 7, p. 989-997, 2013.

LACERDA, C. A. M. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MARCOS, R.; MONTEIRO R. A.; ROCHA E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. **Journal of Anatomy**, v. 220, n. 4, p. 303-317, 2012.

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.

MOUTON, P. R. **Principles and practices of unbiased stereology**: an introduction for bioscientists. Baltimore, MD: John Hopkins University Press, 2002. 232p.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 2, p. 209-216, 2010.

OCHS, M. A brief update on lung stereology. **Journal of Microscopy**, v. 222, n. 3, p. 188-200, 2006.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

PAULINO, N. et al. Antiinflammatory effects of a bioavailable compound, artemisin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, n. 587, p. 296-301, 2008.

PAWA, S. et al. Role of mammalian cytosolic molybdenum Fe-S flavin hydroxylases in hepatic injury. **Life Science**, v. 82, n. 13/14, p. 780-788, 2008.

PONTES, M. L. C. et al. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 34-39, 2018.

RAMADAN, A. et al. Hepatoprotective and hepatotherapeutic effects of propolis against D- Galactosamine/lipopolysaccharide – induced liver damage in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 372-278, 2015.

RAMADORE, G.; SAILE, B. Inflammation damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. **Gastroenterology**, v. 127, n. 3, p. 997-999. 2004.

RAMÍREZ DIDELIZ et al. Efecto hepatoprotector del propoleo rojo cubano en la toxicidade inducida por paracetamol em ratones. **Ver Cubana Farm.**, v. 28, n. 1, p. 45-54, 1994.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de propolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

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

SHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

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

VASCONCELOS, A. C. Necropsia e conservação de espécimes para laboratório. **Cadernos Técnicos - Escola de Veterinária**, Belo Horizonte, n. 16, p. 5-30, 1996.

VOICAN, C. S.; PERLEMUTER, G.; NAVEAU, S. Mechanisms of the inflammatory reaction implicated in alcoholic hepatitis, update. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 35, n. 6/7, p. 465-474, 2011.

ZHANG, L. et al. Protective effects of asiaticoside on acute liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. **Phytomed**, v. 17, n. 10, p. 811-819, 2010.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* apresentou eficácia na atividade antioxidante e genoprotetora e não apresentou potencial citotóxico nem genotóxico nas concentrações testadas.

Os resultados dos níveis séricos das enzimas indicadoras de lesão hepática (AST e ALT), indicaram que o extrato hidroalcoólico da geopropolis da abelha cupira (*Partamona cupira*) não causou toxicidade hepática e exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela TAA;

Através da avaliação anatomopatológica dos fígados foi possível constatar o efeito hepatoprotetor do extrato hidroalcoólico da geopropolis da abelha cupira, uma vez que as alterações macroscópicas e histológicas indicativas de cirrose foram menos expressivas nos G3;

A análise estereológica demonstrou aumento do percentual de hepatócitos e sinusóides hepáticos, além da redução do colágeno no G3, significando uma melhora morfológica do fígado e efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha cupira, frente a lesão hepática induzida pela TAA;

O efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha cupira, foi constatado através da redução significativa do colágeno tipo I no G3.

A cirrose induzida pela TAA promoveu aumento significativo do peso dos fígados nos G3 e G4;

O extrato hidroetanólico da geopropolis da abelha cupira não apresentou efeito citotóxico nas linhagens celulares L929 e HepG2;

O extrato hidroetanólico da geopropolis da abelha cupira não apresentou efeito genotóxico, em todas as concentrações testadas;

O extrato hidroetanólico da geopropolis da abelha cupira apresentou atividade genoprotetor sobre os danos ao DNA induzido pela H2O2.

Portanto, o extrato hidroetanólico da geoprópolis da abelha cupira apresentou efeito hepatoprotetor, antioxidante e genoprotetor nos modelos analisados, no entanto, não houve atividade antineoplásica significativa nas concentrações testadas, apesar de não ter sido observado efeito citotóxico em células normais, dessa forma, pode ser realizado experimentos futuros avaliando concentrações maiores.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO 006/15 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
BR 110, KM 48 - Rua Prof. Antonio Campos, s/n - Costa e Silva - Fone: (84)3318 - 2596
Home Page: <http://www.uern.br> - e-mail: ceua@uern.br - CEP: 59610-090- Mossoró - RN

PARECER CONSUBSTANCIADO 006/15 CEEA/UERN

Nº PROTOCOLO (CEP)	006/15
Título do Projeto	AVALIAÇÃO DO EFEITO HEPATOPROTETOR DA PRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO PRODUZIDOS NO SEMIÁRIDO.

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

A pesquisa é uma tese de doutorado e objetiva verificar o efeito antioxidante e hepatoprotetor dos extratos de própolis de abelhas sem ferrão na Cirrose Experimental crônica e na lesão aguda induzida por tioacetamida e paracetamol, respectivamente, em Ratos Wistar. O objetivo do trabalho é avaliar o potencial hepatoprotetor do extrato hidroalcolico da geoprópolis produzida pela abelha *P. cupira* no semiárido do Rio Grande do Norte, na cirrose experimental induzida por tioacetamida em ratos Wistar, através de marcadores bioquímicos séricos da função hepática, análise histopatológica e morfometria. Para tanto serão usados 50 ratos wistar machos com 60 dias de idade pesando aproximadamente 200g, provenientes do Biotério Central da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN). Durante o período experimental, todos os animais permanecerão no próprio Biotério. Os animais receberão água ou extrato por gavagem diariamente durante todo o procedimento experimental e serão distribuídos da seguinte forma: grupo G1 (5 animais), controle, não receberá nenhum tratamento, sendo administrado diariamente 1,5mL de água potável por gavagem, durante 14 semanas; grupo G2 (5 animais), receberá somente os extratos de própolis por gavagem durante 14 semanas (50mg/mL). O grupo G3 (15 animais), será submetido ao modelo de cirrose hepática com injeções de TAA (0,2g/kg, i.p.) três vezes por semana durante 14 semanas. Quinze dias antes de iniciar a administração da TAA será administrado diariamente o extrato da geoprópolis aos animais por meio de gavagem. Nos dias em que coincidir a administração do extrato com a aplicação da TAA, o extrato será administrado 1 hora antes da aplicação da mesma; enquanto o grupo G4 (15 animais), grupo cirrótico, receberá 0,2g/kg de TAA, via intraperitoneal, três vezes por semana e 1,5mL de água potável por gavagem todos os dias, durante 14 semanas. No último dia os animais serão anestesiados com cetamina (100mg/kg, i.p.), e xilazina (100mg/kg, i.p.), para coleta de sangue e retirada do fígado, para análises histopatológicas. A eutanásia será por exsanguinação sob anestesia profunda. Após a realização do protocolo experimental os animais serão descartados em fossa séptica localizada na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN, própria para este fim. O cronograma de execução das atividades encontra-se adequado.

2 – ENTEDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES



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

PARECER CONSUBSTANCIADO 006/15 CEEA/UERN

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 CEUA.

3- PARECER

O Protocolo de Pesquisa encontra-se APROVADO.

Mossoró, 29 de dezembro de 2015.

Paula V. S. Moreira

Paula Vivianne Souza de Queiroz Moreira
Coordenadora do CEEA/UERN