



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

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida* D.)
NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

MOSSORÓ – RN

2020

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida* D.)
NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA) como exigência
final para obtenção do título de Doutora 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

2020

© 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.

PP142 Paiva, Kaliane Alessandra Rodrigues de .
p POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E
GENOPROTETOR DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHA
JANDAÍRA (Melipona subnitida D.) NO SEMIÁRIDO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL / Kaliane Alessandra
Rodrigues de Paiva. - 2020.
103 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, 2020.

1. Abelha sem ferrão. 2. Genoproteção. 3.
Geoprópolis. 4. Lesão hepática. 5. Quimioterápico.
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.

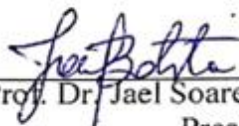
KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida* D.)
NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

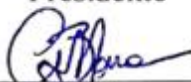
Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA) como exigência
final para obtenção do título de Doutora no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Defendida em: 14/02/2020

BANCA EXAMINADORA



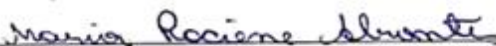
Prof. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)
Presidente



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



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



Profa. Dra. Maria Rociene Abrantes (CISNE)
Membro Examinador



Dr. Wesley Lyevertton Correia Ribeiro (UFC)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA, nasceu no dia 14 de janeiro de 1984, na cidade de Natal/RN. Coursou o ensino médio no Colégio Comercial Cenecista Augusto Severo (Parnamirim-RN), concluindo no ano de 2001. Iniciou o ensino superior em agosto de 2004, na Universidade Potiguar (UNP), onde graduou-se em Ciências Biológicas, concluindo em junho de 2008. Em adição estagiou no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/RN), durante todo o curso de graduação. Em junho de 2008, iniciou o curso de Especialização em Educação e Sustentabilidade Ambiental, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), concluindo em outubro de 2009. Ingressou em março de 2014 no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), na linha de pesquisa Sanidade Animal. No decorrer do curso de mestrado, foi bolsista CAPES, realizou estágio em docência na disciplina de Parasitologia Animal, turmas Medicina Veterinária e Zootecnia, obtendo o título de Mestre em 2016. No ano 2016, no mesmo programa de pós-graduação, iniciou o Doutorado na linha de pesquisa Sanidade Animal e Produção, sob orientação do Prof. Dr. Jael Soares Batista. Durante o curso foi bolsista CAPES até 2017. Iniciou a carreira profissional no ano de 2008, atuando como docente na disciplina de Biologia na Escola Municipal Joana de Souza Ribeiro e, em julho de 2010 na disciplina de Ciências da Natureza no Programa Nacional de Inclusão de Jovens Projovem Urbano da Fundação Guimarães Duque (Mossoró-RN). Em 2016 assinou Termo de Posse na Secretaria Estadual de Educação da Cultura e dos Desportos do Rio Grande do Norte (SEEC/RN), no cargo de Professora nível III.

Ao meu pai, Raimundo Bessa de Paiva, que por muitos anos, vencemos dificuldades e com seu exemplo de vida, me concedeu subsídios para a conclusão dessa etapa (*In Memoriam*).

A minha mãe, Lucia Maria Rodrigues de Paiva, que me forneceu amor, amizade e a esperança de ótima realização em toda pesquisa e apoiou-me em momentos difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fornecer saúde e proteção nos momentos difíceis e permitir a conclusão dessa etapa especial da minha vida;

Agradeço a minha família, com sua sabedoria e intelecções fez-me sentir capaz para alcançar e finalizar objetivos e metas, configurada nessa trajetória acadêmica;

Agradeço ao meu filho, Breno Gomes, em meu ventre, me deu forças para conclusão do doutorado;

Agradeço ao Orientador Prof. Dr. Jael Soares Batista, com sua sabedoria, paciência e dedicação, me concedeu a oportunidade de ingressar no curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, a nível de doutorado, e base teórica para o desenvolvimento da pesquisa e conclusão dos resultados;

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura pela coorientação;

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Salatino e Carmen Palacios, que disponibilizaram o laboratório de Fitoquímica da USP e auxiliaram na realização das análises da composição química do extrato hidroetanólico da geoprópolis;

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura, que ajudou na realização da estereologia das amostras de tecido hepático;

Agradeço ao Prof. Dr. Michael Hrnčíř, por realizar a taxonomia das abelhas jandaíra coletadas nos meliponários;

Agradeço a Banca Examinadora por contribuir nas discussões e melhoria do projeto;

Agradeço aos meus Amigos integrantes da pesquisa, Kizzy Millenn de Freitas e Rayr Cesar, por ajudarem em todas as etapas de desenvolvimento do projeto de pesquisa.

**POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA
GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida* D.)
NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

PAIVA, Kaliane Alessandra Rodrigues de. **Potencial hepatoprotetor, antineoplásico e genoprotetor da geoprópolis produzida por abelha jandaíra (*Melipona subnitida* D.) no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.** 2020. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil, 2020.

RESUMO: Objetivou-se avaliar o potencial hepatoprotetor frente as injúrias induzidas por acetaminofen, a atividade antineoplásica e genoprotetora do extrato hidroetanólico da geoprópolis produzida por *Melipona subnitida* D., na região semiárida do Nordeste brasileiro. Foram avaliadas a composição química e atividade antioxidante das seis amostras (A1, A2, A3, A4, A5, A6) de extrato hidroetanólico da geoprópolis. Foram avaliados o potencial hepatoprotetor através das análises bioquímica da função hepática, avaliação macroscópica, histológica e estereológica dos fígados em 04 grupos experimentais (G1- controle negativo, G2- 50 mg/kg de extrato hidroetanólico da geoprópolis, G3- 50 mg/kg de extrato hidroetanólico da geoprópolis e 600 mg/kg de acetaminofen, G4- 600 mg/kg de acetaminofen) constituídos por 06 roedores da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, com lesão hepática aguda induzida por acetaminofen. O potencial antineoplásico foi determinado pela avaliação do efeito citotóxico do extrato hidroetanólico da geoprópolis em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e fibroblastos de camundongos L929. O efeito genoprotetor foi analisado em linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929. As amostras do extrato hidroetanólico da geoprópolis apresentaram 41 compostos fenólicos, distribuídos entre fenóis e flavonoides. Relata-se pela primeira vez, em geoprópolis de meliponídeos, a presença de lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside. As amostras A1, A2, A4, A5 e A6 apresentaram moderada atividade antioxidante expressas pelos valores de IC₅₀ igual a 82,50, 122,20, 98,80, 76,30 e 144,0, respectivamente, correlacionados com os elevados teores de fenóis e flavonoides totais que variaram entre 16,62 ± 3,91 a 28,46 ± 1,73 e 14,72 ± 3,75 a 32,22 ± 4,43, respectivamente. Os resultados dos níveis séricos das enzimas TGO e TGP dos ratos, indicaram que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. não causou hepatotoxicidade. Na avaliação macroscópica dos fígados, no grupo G3 foi possível constatar coloração marrom pálida e discreta hemorragia, no G4 presença de sufusões hemorrágicas na cápsula, contornos irregulares e acentuação do padrão lobular. Na histoarquitetura dos fígados verificou no G3 focos de hepatócitos tumefeitos, vacuolizados e necrosados, no G4 degeneração e necrose difusa de hepatócitos. Na estereologia, observou aumento no percentual de hepatócitos e sinusóides, bem como, redução de colágeno no grupo G3 em relação ao G4. O extrato hidroetanólico da geoprópolis apresentou efeito citotóxico contra linhagem celular HepG2 e fibroblastos-L929, após 72 h de exposição, com valores de IC₅₀ igual a 365,00 e 250,9 µg/mL, respectivamente. Também apresentou efeito genoprotetor, com percentuais de redução de genotoxicidade de 90,74%, 73,12% e 48,18%, nas concentrações de 500, 250 e 100 µl/mL do extrato, respectivamente. Conclui-se que o extrato hidroetanólico

da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresenta composição química variada, elevados teores de fenóis e flavonoides totais, potencial hepatoprotetor contra lesões hepáticas agudas, efeito citotóxico em células neoplásicas e atividade genoprotetora, podendo ser um produto natural promissor na quimioterapia.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão. Genoproteção. Geoprópolis. Lesão hepática. Quimioterápico.

**HEPATOPROTECTIVE, ANTINEOPLASTIC AND GENOPROTECTIVE
POTENTIAL OF THE GEOPROPOLIS PRODUCED BY JANDAÍRA BEE (*Melipona
subnitida* D.) IN THE SEMI-ARID REGION OF RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL**

PAIVA, Kaliane Alessandra Rodrigues de. **Hepatoprotective, antineoplastic and genoprotective potential of the geopropolis produced by jandaíra bee (*Melipona subnitida* D.) in the semi-arid region of Rio Grande do Norte, Brazil.** 2020. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil, 2020.

ABSTRACT: The objective was to evaluate the hepatoprotective potential against injuries induced by acetaminophen, the antineoplastic and genoprotective activity of the hydroethanolic extract of the geopropolis produced by *Melipona subnitida* D., in the semiarid region of Northeast Brazil. The chemical composition and antioxidant activity of the six samples (A1, A2, A3, A4, A5, A6) of geopropolis hydroethanolic extract were evaluated. The hepatoprotective potential was evaluated through biochemical analysis of liver function, macroscopic, histological and stereological evaluation of the livers in 04 experimental groups (G1- negative control, G2- 50 mg/kg of hydroethanolic extract from geopropolis, G3- 50 mg/kg of hydroethanolic extract of geopropolis and 600 mg/kg of acetaminophen, G4- 600 mg/kg of acetaminophen) consisting of 06 rodents of the species *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, Wistar strain, with acute liver damage induced by acetaminophen. The antineoplastic potential was determined by evaluating the cytotoxic effect of the hydroethanolic extract of geopropolis in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell lines and fibroblasts from L929 mice. The genoprotective effect was analyzed in the L929 mouse fibroblast cell line. Samples of the geopropolis hydroethanolic extract showed 41 phenolic compounds, distributed between phenols and flavonoids. The presence of 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside is reported for the first time in a meliponid geopropolis. Samples A1, A2, A4, A5 and A6 showed moderate antioxidant activity expressed by IC₅₀ values equal to 82.50, 122.20, 98.80, 76.30 and 144.0, respectively, correlated with high levels of total phenols and flavonoids ranging from 16.62 ± 3.91 to 28.46 ± 1.73 and 14.72 ± 3.75 to 32.22 ± 4.43, respectively. The results of the serum levels of the enzymes TGO and TGP of the rats, indicated that the hydroethanolic extract of the geopropolis of *M. subnitida* D. did not cause hepatotoxicity. In the macroscopic evaluation of the livers, in the G3 group it was possible to observe a pale brown color and slight hemorrhage, in the G4 the presence of hemorrhagic suffusions in the capsule, irregular contours and accentuation of the lobular pattern. In the histoarchitecture of the livers, in G3 it

was found foci of tumefied, vacuolized and necrotic hepatocytes, in G4 degeneration and diffuse necrosis of hepatocytes. In stereology, there was an increase in the percentage of hepatocytes and sinusoids, as well as a reduction in collagen in the G3 group compared to G4. The hydroethanolic extract of the geopropolis showed a cytotoxic effect against HepG2 cell line and L929 fibroblasts, after 72 h of exposure, with IC₅₀ values equal to 365.00 and 250.9 µg/mL, respectively. It also had a genoprotective effect, with percentages of genotoxicity reduction of 90.74%, 73.12% and 48.18%, at concentrations of 500, 250 and 100 µl/mL of the extract, respectively. It is concluded that the hydroethanolic extract of the *M. subnitida* D. geopropolis presents varied chemical composition, high levels of total phenols and flavonoids, hepatoprotective potential against acute liver lesions, cytotoxic effect on neoplastic cells and genoprotective activity, being a promising natural product in chemotherapy.

Keywords: Stingless Bee. Genoprotection. Geopropolis. Hepatic lesions. Chemotherapy

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Características taxonômicas da espécie *Melipona subnitida* D.: A- Presença de coloração ferrugínea da pilosidade do tórax, contrastando com a cor preta do tegumento do abdômen e cabeça, manchas subnitidas nos segundo e terceiro tergito metassomal; B- Mancha em formato de “W” invertido no clipeo de zangões 19

Figura 2 - Geoprópolis de *Melipona subnitida* D., apresentando coloração verde, com consistência macia e elástica 23

Figura 3 - Geoprópolis de *Melipona subnitida* D. na construção da entrada e divisórias do local de nidificação da espécie, vedação de frestas e reparo de danos à colmeia 23

Figura 4 - A- Reação do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. com solução de Folin-Ciocalteu e solução saturada de carbonato de sódio, mostrando elevadas concentrações de fenóis totais na amostra do extrato, verificado pela coloração azul intenso nos pocinhos; B- Reação do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. com solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, mostrando elevadas concentrações de flavonoides totais na amostra do extrato, verificada pela coloração amarelo intenso nos pocinhos 28

CAPÍTULO II

Figura 1 - Mapa do Rio Grande do Norte, demarcando os municípios de coleta das seis amostras de geoprópolis: Felipe Guerra- A1; São Francisco do Oeste- A2, A4 e A5; Serra do Mel- A3; Mossoró- A6 59

Figura 2 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. oriundos do semiárido do Rio Grande do Norte, analisados por HPLC-DAD 69

Figura 3 - Fígados de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar nos grupos experimentais: A- G1 (Controle Negativo); B- G2 (extrato da hidroetanólico da geoprópolis); C- G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen); D- G4 (acetaminofen). Notam-se nos G1 e G2 fígados com aspecto morfológico normal, no G3 fígado com coloração marrom pálida e discreta hemorragia, no G4 presença de sufusões hemorrágicas na cápsula, contornos irregulares e na superfície de corte presença de áreas multifocais de coloração branco amarelada 76

Figura 4 - Fígados de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, nos grupos experimentais, corados com hematoxilina e eosina: A- G1 (Controle Negativo); B- G2 (extrato hidroetanólico da geoprópolis); C- G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen); D- G4 (acetaminofen). Nota-se no G1 e G2 arquitetura tecidual normal, no G3 focos de hepatócitos tumefeitos, vacuolizados e necrosados, no G4 degeneração e necrose difusa de hepatócitos 77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Constituintes detectados nas seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. oriundos do semiárido do Rio Grande do Norte70

Tabela 2 - Média $\pm$ desvio-padrão dos teores de fenóis (%) (m/m) e flavonoides totais (mg/100g), atividade antioxidante (%) e concentrações de massa seca (mg/mL) de seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D., obtidas no semiárido do Rio Grande do Norte 74

Tabela 3 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar nos grupos experimentais G1 (Controle Negativo), G2 (extrato hidroetanólico da geoprópolis), G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen) e G4 (acetaminofen) 75

Tabela 4 - Valores de média $\pm$ desvio padrão da densidade de volume dos hepatócitos, sinusóides e colágeno nos fígados de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar nos grupos experimentais: G1 (Controle Negativo), G2 (extrato hidroetanólico da geoprópolis), G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen) e G4 (acetaminofen) 78

Tabela 5 - Valores da concentração inibitória (IC₅₀) promovidos pelo extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. e quimioterápico Doxorrubicina frente às linhagens celulares de fibroblastos-L929 e de hepatocarcinoma humano (HepG2) pelo ensaio MTT, após 72 h de exposição 78

Tabela 6 - Média $\pm$ desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D., após exposição de células da linhagem de fibroblastos de camundongo L929, por 24 h em três diferentes concentrações do extrato, ao peróxido de hidrogênio e a água destilada 79

Tabela 7 - Média $\pm$ desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa, para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D., em células da linhagem de fibroblastos de camundongo L929, co-tratadas com três concentrações de amostras do extrato hidroetanólico da geoprópolis e peróxido de hidrogênio 79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
CAPÍTULO I	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 MELIPONÍDEOS	18
3.1.1 Anatomia e comportamento	18
3.1.2 Meliponicultura	21
3.2 GEOPRÓPOLIS	22
3.2.1 Composição química da geoprópolis	25
3.3 FÍGADO	29
3.3.1 Anatomia	29
3.3.2 Histologia	30
3.3.3 Metabolização do acetaminofen no fígado	32
3.4 LESÕES E CICATRIZAÇÕES HEPÁTICAS	33
3.5 HEPATOPROTETORES	35
3.6 POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA GEOPRÓPOLIS	36
CAPÍTULO II.....	55
4 POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR <i>Melipona subnitida</i> D. (MELIPONINAE) NO SEMIÁRIDO DO NORDESTE BRASILEIRO	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO 006/15 CEEA/UERN	102

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, *Melipona subnitida* D., conhecida como abelha jandaíra, é uma espécie nativa do Nordeste, pertencente ao bioma Caatinga, poliniza plantas silvestres e culturas cultivadas nas regiões semiáridas da Caatinga e úmida da floresta pré-amazônica, sendo um importante polinizador, estando associada à conservação ambiental e produção de frutos (SOUZA et al., 2013, 2018). Esta espécie adiciona solo ou argila em suas respectivas própolis, formando geoprópolis, que apresenta uma composição química variável, conforme a vegetação explorada, clima da área e espécie de abelha, com substâncias bioativas e propriedades medicinais atribuídas aos elevados teores de fenóis e flavonoides totais (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013; SILVA et al., 2013). Em uma triagem fitoquímica de um extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., revelou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóis, flavonas, xantonas e triterpenos pentacíclicos livres (SOUSA et al., 2015). Fenilpropanóides, hexosídeos de galoílo, ácido elágico, acil-(cinaminoil/coumaroil)-hexósidos, acil-(cinaminoil/coumaroil)-galoil-hexosídeos e flavonóides, 7-O-metil naringenina, 7-O-metil aromadendrina, 7,4'-di-O-metil aromadendrina, 4'-O-metil-kaempferol, 3-O-metil-quercetina, 5-O-metil-aromadendrina e 5-O-metil-kaempferol e flavonóides O-glicósidos acilados foram detectados em geoprópolis de *M. subnitida* D. coletados no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, e exibiu potencial atividades antioxidantes e antinociceptivas (SOUZA et al., 2013, 2018; SILVA et al., 2014).

Além dessas atividades biológicas, a geoprópolis, apresenta chalconas, um composto químico capaz de reduzir a viabilidade celular de hepatocarcinoma humano (HepG2), com alto potencial citotóxico (TAMIELLO, 2013). Costa (2018) demonstrou atividade genoprotetora e hepatoprotetora da geoprópolis de *Partamona cupira*, que apresentou em sua composição química 20 compostos fenólicos, distribuídos entre fenóis e flavonoides, dentre eles, as chalconas, flavonas e flavonóis. Com isso, cresce o interesse por pesquisas sobre atividades biológicas da geoprópolis (MIRANDA-VILELA et al., 2008; SANCHES et al., 2017; NUNES, 2018).

Nesse contexto, a indústria farmacêutica tem se preocupado em desenvolver novas drogas hepatoprotetoras, antineoplásicas e genoprotetoras com a finalidade de conseguir uma maior eficiência e disponibilizar ao consumidor uma variedade de medicamentos com baixo preço de mercado (SPIRA et al., 2002; ZHANG et al., 2008), pois as doenças hepáticas e neoplasias, como o hepatocarcinoma humano, constituem um dos maiores problemas de saúde de ordem mundial, contabilizando no Brasil, 30 mil mortes por

ano com doenças hepáticas e 16,4% por câncer (KAMB, 2005; CARVALHO et al., 2014; MELO et al., 2017; PANIS et al., 2018). Ademais, o fígado é um órgão vital que facilmente sofre lesões decorrentes de infecções virais, ingestão de álcool, ataques imunológicos, acúmulo hereditário de metal, parasitoses e uso excessivo de drogas para combater diversas doenças, especialmente pelo consumo de acetaminofen como antipirético (SPIRA et al., 2002; LOPES; MATHEUS, 2012; TONG et al., 2017). Além disso, sofre lesões devido a algumas atividades hepáticas, como a saturação das vias por detoxificação e a N-hidroxilação mediada pela via citocromo P450, que tornam as drogas mais tóxicas para o organismo e a exposição crônica a essas substâncias geralmente resulta na alteração da função orgânica, na diminuição do órgão e no aumento do tecido conjuntivo fibroso intra-hepático (MACÍAS et al., 2017).

Em pesquisas com finalidade de verificar o efeito hepatoprotetor de produtos naturais é utilizado substâncias hepatotóxicas, como a tioacetamida, tetracloreto de carbono e acetaminofen para indução de lesões hepáticas crônicas e agudas (BHADAURIA et al., 2007; AYDIN et al., 2010; AMARAL et al., 2013; PASQUALINI et al., 2016). Dentre diversos modelos experimentais de indução de lesões hepáticas aguda, o acetaminofen é o mais utilizado por produzir padrão morfológico macroscópico e histológico compatível com hepatite tóxica em humanos em um período experimental de no máximo 48 h, além de apresentar menor taxa de mortalidade entre os animais experimentais (SAID, 2001; SILVA et al., 2014).

No Brasil são realizadas várias pesquisas sobre o efeito protetor da própolis de *Apis mellífera* contra danos quimicamente induzidos no DNA e atividade hepatoprotetora (CAMPELLO et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; PARK et al., 2004; ALMEIDA, 2009). Todos os estudos demonstraram a própolis como um excelente potencial hepatoprotetor em injúrias hepáticas induzidas por qualquer agente tóxico, podendo ser um produto natural promissor contra hepatotoxinas (SAID, 2001; BHADAURIA et al., 2007; SILVA et al., 2019). Pesquisa realizada por Tamiello (2013) revelou as chalconas, presente na própolis, como compostos químicos com diversas atividades biológicas, dentre elas, a capacidade de reduzir a viabilidade celular de HepG2, com alto potencial citotóxico nesse tipo de células.

Igualmente, a geoprópolis de meliponídeos apresenta uma composição química variável com elevados teores de fenóis e flavonoides totais, que sugere uma boa atividade farmacológica, tais como, boa atividade antioxidante, genoprotetora e antimicrobiana (COSTA, 2018; NUNES, 2018).

Com isso, torna-se importante realizações de pesquisas sobre atividades biológicas da geoprópolis, uma vez que possui substâncias bioativas com grande potencial antioxidante, hepatoprotetora, genoprotetor e antineoplásico, podendo o extrato hidroetanólico da geoprópolis de abelhas sem ferrão prevenir danos ao DNA e combater células neoplásicas, quando submetidas a substâncias tóxicas. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivos, avaliar o potencial hepatoprotetor frente as injúrias induzidas por acetaminofen, bem como, avaliar o efeito citotóxico em células neoplásicas e atividade genoprotetora da geoprópolis da espécie *M. subnitida* D. oriunda da região semiárida do Rio Grande do Norte.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 1698-1706, 2013.

AMARAL, S. S. et al. Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 10, p. 1-14, 2013.

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 of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 2, p. 239-246, 2000.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S. K.; SHUKLA, S. Própolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 302, n. 2, p. 215-224, 2007.

CAMPELLO, F. B. et al. **Diagnóstico florestal da região nordeste**, Natal, n. 2, maio. 1999. Boletim técnico.

CARVALHO, M. D. et al. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599-608, 2014.

COSTA, K. M. F. M. **Efeito antioxidante, genoprotetor e hepatoprotetor da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semiárido nordestino**. 2018. 93f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

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

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol (Acetaminofem). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 411-414, 2012.

MACÍAS, J.; PINEDA, J. Á.; REAL, L. M. Non-alcoholic fatty liver disease in HIV infection. **AIDS Reviews**, v. 19, n. 1, p. 35-46, 2017.

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 de Epidemiologia**, v. 20, n. 1, p. 61-74, 2017.

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

NUNES, F. V. A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* produzida no semi-árido nordestino**. 2018. 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

PANIS, C. et al. Revisão crítica da mortalidade por câncer usando registros hospitalares e anos potenciais de vida perdidos. **Einstein**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2018.

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.

PASQUALINI, N. B. et al. Ação antioxidante da vitamina c sobre os marcadores de lesão hepática após a indução de cirrose por tioacetamina (TAA) – estudo experimental. In: JORNADA DE NUTRIÇÃO, 14. Bauru: USC. **Anais...** Bauru- SP, 2016.

SAID, R. A. **Atividade hepatoprotetora de diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico da própolis, nas intoxicações agudas por acetaminofen, em camundongos**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50-57, 2017.

SILVA, G. H. et al. Avaliação da atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo em modelo experimental de lesão hepática por paracetamol em ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 489-496, 2014.

SILVA, J. B. et al. Hepatoprotective and antineoplastic potencial of red propolis produced by the bees *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 744-756, 2019.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013.

SOUSA, D. M. N. et al. Phytochemical screening, *in vitro* toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bee's geopropolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, p. 134-140, 2015.

SOUZA, A. S. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

SOUZA, S. A. et al. Characterization of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 549-558, 2018.

SPIRA, G. et al. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

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

TONG, Y. et al. Effect of a hypoxic microenvironment after radiofrequency ablation on residual hepatocellular cell migration and invasion. **Cancer Science**, v. 108, n. 4, p. 753-762, 2017.

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, citotóxico e genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D.

2.2 ESPECÍFICOS

Identificar os compostos químicos do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D.;

Estimar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D.;

Analisar o potencial hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. em lesão hepática aguda induzida por acetaminofen em *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769;

Investigar a atividade citotóxica do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. em linhagens celulares de fibroblastos de camundongos L929 e carcinoma hepatocelular humano (HepG2);

Averiguar o potencial genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. em linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929.

CAPÍTULO 1

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MELIPONÍDEOS

3.1.1 Anatomia e comportamento

Os meliponídeos são abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), anatomicamente apresentam como principal característica o ferrão atrofiado (vestigial), que durante o processo evolutivo perdeu a função de defesa, ocasionando uma denominação de “sem ferrão” (BARRETO; TEIXEIRA, 2006). Além disso, essas abelhas são formadas por estruturas que auxiliam na fabricação de colmeias e coleta de substâncias, que irão formar mel, cera e geoprópolis. Essas espécies apresentam três pares de pernas, nas operárias, o terceiro par de pernas apresenta uma tíbia modificada em corbícula, estrutura importante no transporte de substâncias sólidas e pastosas, tais como, pólen, barro, resina, fibra e sementes. O tórax é constituído por músculos responsáveis pela movimentação das asas e pernas, como também, auxiliam na comunicação, promovendo vibrações para a indicação da distância da fonte de recursos e na coleta de pólen de flores. No abdome, estão alojados o intestino, as glândulas secretoras de cera, os órgãos reprodutores e o papo, este último responsável pelo transporte do néctar que a abelha coleta (VENTURIERI, 2008).

Essas estruturas anatômicas são muito bem empregadas na taxonomia de abelhas, pois cada espécie tem variações na sua estrutura e coloração (FRANCOY; FONSECA, 2010). A espécie *Melipona subnitida* D., conhecida popularmente por abelha jandaíra, apresenta como características anatômicas específicas da espécie, a presença de coloração ferrugínea da pilosidade do tórax, contrastando com a cor preta do tegumento do abdômen e cabeça, manchas subnitidas nos segundo e terceiro tergito metassomal, cabeça de operária completamente escura e uma mancha em formato de “W” invertido no clipeo de zangões (Fig. 1) (FONSECA et al., 2017).

Os meliponídeos mantem um comportamento social e formam grandes colônias. Pelo fato de apresentarem um ferrão sem função defensiva, essas abelhas protegem suas colmeias usando suas mandíbulas para morder, depositam geoprópolis no indivíduo que julga como predador e atacam cabelos, pelos e orifícios, como nariz, ouvido ou boca para afugentar o inimigo próximo da colmeia (MONTEIRO, 2000; CAMARA, 2004).

Figura 1 - Características taxonômicas da espécie *Melipona subnitida* D.: A- Presença de coloração ferrugínea da pilosidade do tórax, contrastando com a cor preta do tegumento do abdômen e cabeça, manchas subnitidas nos segundo e terceiro tergito metassomal; B- Mancha em formato de “W” invertido no clipeo de zangões



Fonte: Fonseca et al. (2017)

Essas abelhas são facilmente adaptadas devido a sua grande capacidade de nidificação, dependendo da disponibilidade do local, pode albergar em troncos de árvores, em cavidades presente no solo, paredes de casas e em ninhos de formigas abandonados, como também, vivem em colmeias artificiais (CAMARGO; PEDRO, 2003). O ninho é construído por cerume (mistura de cera com resina vegetal), organizado em células de cria e potes de alimentos, os favos são construídos na posição vertical formando discos horizontais ou estruturas helicoidais (SILVA et al., 2014a). As novas colônias são formadas próxima da colônia mãe. O processo de dispersão natural dessas abelhas é lento, geralmente acontece no período de enxameação, as operárias, atraídas pelo ferormônio da rainha virgem voam em busca de um novo habitat, que é sabidamente selecionado por elas. A colmeia é firmada quando a princesa realiza o voo nupcial e é fecundada pelo zangão (BRUENING, 2006; SILVA et al., 2014a).

Os meliponídeos apresentam grande biodiversidade nas regiões neotropicais, com mais de 250 espécies, distribuídas em 27 gêneros e apresentam ampla distribuição geográfica em todo Brasil (SILVEIRA et al., 2002). A sua distribuição geográfica se deve a predileção aos gêneros de plantas, que são inúmeros, pois, de modo geral, os meliponídeos são importantes polinizadores de uma grande biodiversidade de plantas nativas e culturas agrícolas (SILVA et al., 2009). De acordo com Silva et. (2009), essas abelhas são encontradas nas plantas: abóbora (*Cucurbita* sp.), alface (*Lactuca sativa*), alfavaca (*Ocimum* sp.), amor crescido (*Portulaca pilosa*), braquiária (*Brachiaria* sp.), bucha (*Luffa cylindrica*),

caju (*Anacardium occidentale*), carambola (*Averrhoa carambola*), catinga de mulata branca (Asteraceae), coentro (*Coriandrum sativum*), cravinho (*Tagetes* sp1.), crista de galo (Amaranthaceae), malva (Malvaceae), manjerição (*Ocimum basilicum*), margarida (Asteraceae), maxixe (*Cucumis anguria*), pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), urucum (*Bixa orellana*) e vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*), sendo o caju e urucum plantas de maior predileção pelas abelhas.

Especificamente, cada espécie de abelha apresenta uma variação de predileção pela espécie vegetal em locais distintos dentro de cada região visitada, a exemplo, *M. subnitida* D. coleta a resina de espécies vegetais mais próximas da colmeia, mesmo em ambiente com rica diversidade de fontes vegetais, como o semiárido nordestino, assim exibem um perfil semelhante de compostos fenólicos, com variações nos valores de fenóis e flavonoides totais (SOUZA et al., 2013, 2018; SILVA et al., 2014b).

M. subnitida D. poliniza plantas silvestres e culturas agrícolas nas regiões semiáridas da Caatinga e úmida da floresta pré-amazônica, sendo um importante polinizador no bioma Caatinga, estando associado à conservação ambiental e produção de frutos (SOUZA et al., 2013, 2018; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Uma análise melissopalínológica do mel de *M. subnitida* D. coletado em duas regiões semiáridas do estado da Paraíba, Brasil, mostrou 19 tipos de pólen de 9 famílias de plantas (SILVA et al., 2013). No entanto, entre 9 amostras de mel, *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (sabiá) foi o tipo de pólen predominante em 8 amostras. As espécies de plantas da família Fabaceae/Mimosoideae são muito comuns na região da Caatinga e foram encontradas em mel de jandaíra em grandes quantidades. Uma quantidade significativa de *Mimosa tenuiflora* também foi observada em todas as amostras. Em um pequeno conjunto de amostras, observou-se que as abelhas *M. subnitida* D. no semiárido nordestino se alimentam principalmente de néctar de plantas da família Fabaceae, com predominância dos grãos de pólen de *Mimosa gemmulata* (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2013). A indução da floração de *M. tenuiflora* aumenta o suprimento e a coleta de pólen pelas abelhas no período de seca do ano, minimizando o efeito da escassez de alimentos nas colônias, indicando a importância das espécies de *Mimosa* como fonte de recursos utilizados por esta abelha (DOS SANTOS SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2018).

Estudos mostram que *M. subnitida* D. é uma espécie social e facilmente cultivada, nativa do Nordeste brasileiro, pertencente ao bioma Caatinga, podendo suportar períodos de seca prolongados. É uma espécie essencial para a economia local, possuindo alto potencial de produção de mel, cera e geoprópolis, devido às suas propriedades medicinais

atribuídas (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013; SILVA et al., 2013). Além disso, apresenta importância ambiental e social dentro de diversos nichos e regiões (SILVA; PAZ, 2012).

3.1.2 Meliponicultura

Iniciada pelos índios, a meliponicultura, ao longo do tempo foi praticada de forma tradicional por produtores de subsistência familiar em diversas regiões do Brasil (ALVES et al., 2007). Nas regiões Norte e Nordeste, constitui fonte adicional de renda, em algumas ocasiões é parte importante da agricultura familiar, pois seus produtos, especialmente, geoprópolis e mel são bastante apreciados pela população local, em detrimento de seus valores nutricionais e terapêuticos, sendo valorizados economicamente (SOUZA et al., 2004; LOBATO; VENTURIERI, 2010).

Por serem sem ferrão e, de modo geral, não agressivos, os meliponídeos são bastante aceitos nas propriedades rurais do Brasil (SILVA; PAZ, 2012), no âmbito da conservação ambiental, no entretenimento e como fonte de renda para os produtores rurais, o que torna a meliponicultura uma atividade crescente no país (VENTURIERI et al., 2012).

Referindo-se ao Nordeste, há meliponiculturas bem sucedidas, situadas no Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco e Bahia. As atividades da meliponicultura são bastantes intensas, sendo excelente fonte econômica entre as populações rurais, se estendendo para zona urbana. É uma atividade bastante antiga, na maioria dos casos, os filhos herdam dos pais, utilizando como fonte de subsistência associada as atividades agrícolas (NETO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; LIMA-VERDE et al., 2019).

Os meliponicultores produzem e comercializam de maneira significativa o mel e extrato de geoprópolis. Por serem bastante apreciados, e dependendo da época de colheita, são comercializados com alto valor de mercado, preço estimado do mel entre, R\$ 30,00 a R\$ 100,00 por litro e extrato de geoprópolis R\$ 20,00 a R\$ 45,00 por litro, sendo o extrato da geoprópolis vendido para uso tópico (LIMA, 2015; LIMA-VERDE et al., 2019). São produtos que exibem algumas características físico-químicas e palinológicas notáveis (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013; DA ESCÓSSIA PINHEIRO et al., 2018), indicando que na região semiárida, existe muitas espécies endêmicas de plantas com potencial melipônico, que são bons marcadores geográficos (SILVA et al., 2013; BRASIL, 2014).

De modo geral, os meliponicultores com o intuito de aumentar a produtividade e qualidade dos produtos (JAFFE et al., 2013), exploram em troncos de árvores, cortiços ou em caixas racionais aliadas aos métodos eficientes de multiplicação de ninhos de espécies

produtivas, adaptadas às condições de vegetação e clima locais, como: Tiúba (*Melipona compressipes* (Fabricius, 1804)) no Maranhão e Piauí (CARVALHO-ZILSE; KERR, 2004; MONTE et al., 2013), Jandaíra (*M. subnitida* D.) no Ceará (CRUZ et al., 2004), Jandaíra e Mosquito (*Plebeia* sp.), Uruçu (*Melipona scutellaris*) em Pernambuco e Paraíba (CARVALHO-ZILSE et al., 2009; GOIS et al., 2010) e Cupira (*Partamona* sp.) no Rio Grande do Norte (PEREIRA et al., 2011).

Quando o manejo é realizado de maneira correta essas espécies de abelhas podem produzir por ano, em média, de oito novas famílias em uma caixa de criação, constituindo uma boa fonte de renda para o produtor (VILLAS-BÔAS, 2012). Entretanto, a região semiárida do Nordeste brasileiro enfrenta dificuldades em manter as abelhas em suas colmeias, em detrimento da intensa destruição da Caatinga, exploração irracional de colmeias e a expansão de abelhas africanizadas, que contribuem com a migração dessas abelhas para outros ambientes favoráveis à sua permanência (FREITAS et al., 2005).

Dentre os produtos produzidos pelos meliponídeos, a geoprópolis 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; LIMA, 2015; SOUSA et al., 2015). A realização de pesquisa a respeito da constituição química da geoprópolis se torna indispensável para relacionar os compostos bioativos presentes em sua formulação, com suas atividades farmacológicas testadas, ampliando o respaldo da qualidade desses produtos e oferecendo garantia aos consumidores que fazem uso em sua rotina (EDUARDO, 2014).

3.2 GEOPRÓPOLIS

A geoprópolis é uma mistura complexa formada por resinas, obtidas pelas abelhas sem ferrão da flora da região (pasto apícola), misturada a cera, secreções salivares das abelhas e barro, com coloração variando do verde ao marrom, consistência macia e elástica (Fig. 2). É utilizada na construção da entrada e das divisórias do local de nidificação da espécie, vedação de frestas e no reparo de danos à colmeia (Fig. 3), como também é utilizada para afastar predadores próximos da colmeia (MONTEIRO, 2000; CAMARA, 2004; FUNARI; FERRO, 2006; CARVALHO-ZILSE; NUNES-SILVA, 2012).

A geoprópolis começou a ser apreciada desde 1800 a.C., pelas sociedades pré-colombianas, que já especulavam sobre suas propriedades medicinais, a qual foi amplamente usada pela população como agente anti-séptico, no tratamento de doenças respiratórias e

dermatose. A partir de seus conhecimentos tradicionais, despertou o interesse da comunidade científica pela descoberta de compostos biologicamente ativos e nos últimos 25 anos surgiu o interesse internacional de pesquisadores.

Figura 2 - Geoprópolis de *Melipona subnitida* D., apresentando coloração verde, com consistência macia e elástica



Fonte: Elaboração do autor (2020)

Figura 3 - Geoprópolis de *Melipona subnitida* D. na construção da entrada e divisórias do local de nidificação da espécie, vedação de frestas e reparo de danos à colmeia



Fonte: Elaboração do autor (2020)

No período de 1981 a 2002, dos 877 compostos orgânicos introduzidos mundialmente como fármacos, 61% eram produtos naturais derivados de meliponídeos (BIESMEIJER et al., 2006; CARTAXO, 2012; BARTOLOMEU et al., 2016).

No Brasil, o interesse por estudos científicos das propriedades terapêuticas da geoprópolis é recente e tem demonstrado o efeito antineoplásico contra carcinoma epidermóide laríngeo humano (HEp-2) (BARTOLOMEU et al., 2016), ação imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica (ARAÚJO et al., 2015a; MACIEL et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2019). As atividades biológicas da geoprópolis são atribuídas a atividade antioxidante dos extratos. Muitos são os estudos sobre a atividade antioxidante desses extratos em diversas regiões do Brasil (KUMAZAWA et al., 2004). Vários autores relatam que algumas propriedades biológicas, particularmente a atividade antioxidante, em extratos etanólicos da geoprópolis, se deve em parte ao seu alto conteúdo de fenóis e flavonoides totais (MORENO et al., 2000; DA SILVA et al., 2013; SANCHES et al., 2017; FERREIRA et al., 2019). Lavinhas et al. (2019), em uma revisão de literatura, demonstraram em vários estudos com extrato etanólico de geoprópolis das abelhas sem ferrão uma atividade antioxidante alta, maior do que a do ácido ascórbico, com capacidade de eliminação de radicais livres e inibição completa da produção dos íons superóxidos e dos radicais hidroxila, semelhante aos resultados observados para a própolis da espécie *Apis mellifera*.

A atividade antioxidante é importante na prevenção de diversas enfermidades, como o câncer, doenças cardíacas e degenerativas, porque tem como principal ação controlar a produção de radicais livres (CANNIATTI-BRAZACA, 2007). Essa atividade pode ser realizada por compostos antioxidantes endógenos ou exógenos. Os exógenos são provenientes de produtos naturais, tais como, extratos de plantas, própolis ou geoprópolis. A produção de radicais livres é controlada por vários mecanismos de ação, de modo geral, os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis (SOUSA et al., 2007).

Os compostos fenólicos presentes na geoprópolis agem como antioxidantes, devido a sua estrutura química, que desempenham ação de neutralização de radicais livres e quelatação de metais de transição, atuando na etapa de iniciação e propagação do processo oxidativo (SOETHE et al., 2016). Segundo Machado et al. (2016), esses compostos, protegem as células hepáticas pela via de sinalização antioxidante fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)/elemento de resposta antioxidante (ARE), que induz a expressão de enzimas antioxidantes como a gamaglutamilcisteína sintase (gama-GCS), NQO-1 e SOD. Além disso, o Nrf2 se liga ao heme oxigenase 1 (HO-1), ARE promovendo a indução do RNAm das enzimas antioxidantes, que agem inibindo o estresse oxidativo e a morte celular.

3.2.1 Composição química da geoprópolis

A composição química da geoprópolis é rica de uma grande variedade de classes químicas, com mais de 300 componentes envolvidos, pois advém da vegetação visitada, solo e minerais capturados pela abelha, juntamente com os fatores como sazonalidade, genética e reações geradas através das secreções hipofaringianas da abelha (hidrólise de glicosídeos flavonoides em agliconas) (NUNES; GUERREIRO, 2012; SOUZA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016; PEREIRA et al., 2017). Dentre esses componentes, os compostos fenólicos constituem importante categoria de metabólitos secundários, devido sua ubiquidade entre os vegetais e apresentar estrutura química que exerce significativo efeito preventivo e curativo contra diversas doenças, em especial aquelas provocadas por toxinas (ARNOSO et al., 2019). Esses compostos se enquadram em diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre esses, se destacam os fenóis e flavonoides por exercerem atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Os fenóis são compostos orgânicos oxigenados que apresentam o grupo hidroxila (OH) ligado a um composto aromático, sendo o grupo funcional dessa estrutura (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). O hidroxibenzeno é a fórmula estrutural do fenol simples, tem como característica principal ser um ácido fraco, ioniza-se em meio aquoso formando o íon hidrônio, além de ser capaz de reagir com bases, formando sal e água (VOLKART et al., 2017). Os fenóis são importantes por apresentar excelente atividade antioxidante que, de acordo com Miranda et al. (2014) e Vieira et al. (2015), os extratos com maiores concentrações de fenóis totais obtiveram maior atividade antioxidante e foram capazes de influenciar na atividade enzimática da tirosinase, enzima responsável por defeitos da pigmentação da pele.

Os flavonoides se apresentam em várias formas estruturais, sendo conhecida mais de 4.200 estruturas. Os representantes da classe possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de 3 átomos de carbono. As classes de flavonoides podem ser diferenciadas com base na oxidação do anel pirano central (SIMÕES et al., 2007; SANTOS; RODRIGUES, 2017). Entre essas classes estão as flavonas, flavonóis, chalconas, flavanonas, flavanas e isoflavonoides. Os flavonoides são derivados de aminoácidos aromáticos e seus subgrupos variam de acordo com o padrão de hidroxilação, glicosilação e demais reações que possam alterar a molécula básica. Esses compostos são amplamente estudados por apresentar diversas propriedades

farmacológicas, dentre elas, a atividade antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e hepatoprotetora (LORENZONI et al., 2014; ARNOSO et al., 2019).

Diante da imensa variedade estrutural dos compostos fenólicos, triagens fitoquímicas são requeridas nos estudos com própolis e geoprópolis (SOARES et al., 2016; SILVA et al., 2019a). Nesse sentido, uma triagem fitoquímica do extrato hidroenatólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. revelou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóis, flavonas, xantonas e triterpenos pentacíclicos livres (SOUSA et al., 2015). Fenilpropanóides, hexosídeos de galoílo, ácido elágico, acil-(cinaminoil/coumaroil)-hexósidos, acil-(cinaminoil/coumaroil)-galoil-hexosídeos e flavonóides, 7-O-metil naringenina, 7-O-metil aromadendrina, 7,4'-di-O-metil aromadendrina, 4'-O-metil-kaempferol, 3-O-metil-quercetina, 5-O-metil-aromadendrina e 5-O-metil-kaempferol e flavonóides O-glicósidos acilados foram detectados em geoprópolis de *M. subnitida* D. coletadas no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, que exibia potencial atividades antioxidantes e antinociceptivas (SOUZA et al., 2013, 2018; SILVA et al., 2014b). Souza et al. (2013, 2018) e Silva et al. (2014b), observaram que as amostras de geoprópolis coletadas no estado da Paraíba exibiam um perfil semelhante de compostos fenólicos, sugerindo que as abelhas *M. subnitida* D. coletam a resina das mesmas espécies vegetais mais próximas da colmeia, mesmo em ambiente com rica diversidade de fontes vegetais, como o semiárido nordestino.

Devido a sua diversidade de componentes, a geoprópolis de *M. subnitida* D. é potencialmente fitotóxica às espécies de plantas *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia*, em intensidades que variaram em função da concentração e da parte da planta analisada (PEREIRA et al., 2017). Por essa razão, é importante a caracterização de perfis químicos da geoprópolis de várias regiões do Brasil para a ampliação do conhecimento referente as atividades biológicas e toxicidade, pois essas propriedades estão intrinsecamente associadas à sua composição química, que, por sua vez, depende da flora local, sazonalidade, secreções salivares e solo (EDUARDO, 2014).

Atualmente pesquisadores tem utilizado para a caracterização do perfil químico e atividade antioxidante da geoprópolis a cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/DAD, espectrometria de Massas HPLC-DAD-ESI-MS/MS, a solução de Folin-Ciocalteu, solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) para avaliação da atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001; FERREIRA et al., 2017).

A caracterização do perfil químico é realizado através da cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/DAD e espectrometria de Massas HPLC-DAD-ESI-MS/MS. O acoplamento dessas técnicas fornece um rápido e confiável resultado das análises sobre a

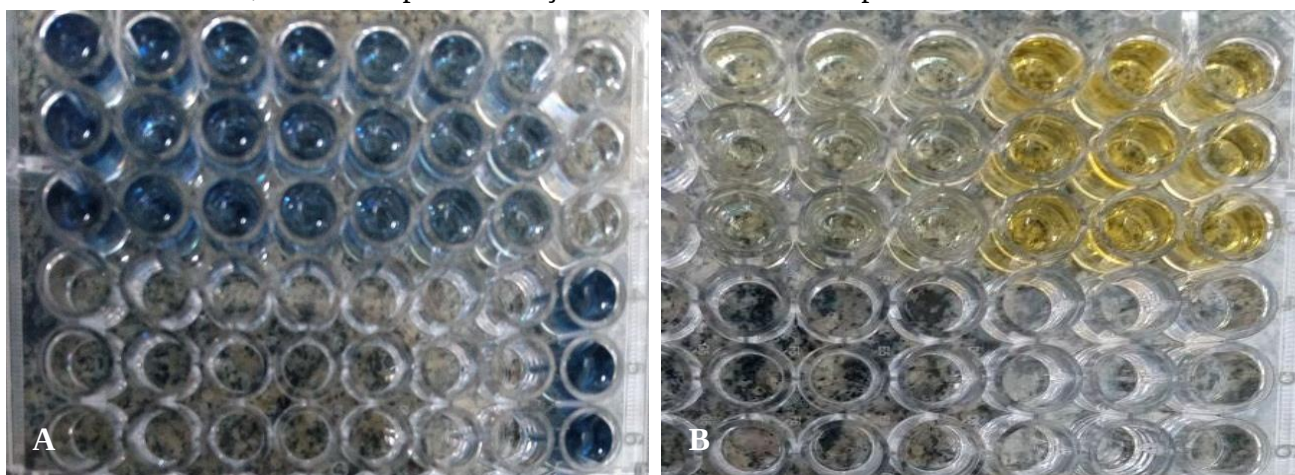
identidade química dos compostos não voláteis ou termicamente instáveis, bem como, os dados qualitativos e quantitativos. A cromatografia líquida HPLC é um método de separação de compostos químicos em solução para identificar e quantificar cada componente em uma mistura, provenientes de fluidos biológicos, produtos naturais e sedimentos de rio (SILVA; COLLINS, 2011). Requer aparatos tecnológicos complexos, necessitando de detectores como Índice de Refração, Ultravioleta, Espalhamento de luz, Fluorescência e outros, aliados a softwares dedicados para análise quantitativa dos componentes das misturas em concentrações extremamente baixas. Contudo, é uma técnica de identificação de compostos limitada, devido ao tempo e retenção, precisando do acoplamento de um espectrômetro de massa para confirmar. Este trabalha medindo átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares para a identidade de uma espécie (LANÇAS, 2009).

A solução de Folin-Ciocalteu é utilizada para determinar a concentração de fenóis totais de uma amostra de extrato de geoprópolis, o qual é realizado através de uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de ácido *p*-cumárico. Para tanto, a solução padrão e as amostras testes de extrato são misturadas a solução de Folin-Ciocalteu junto a solução saturada de carbonato de sódio em triplicatas. Os resultados são determinados por meio de uma leitura das absorbâncias em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 760 nm, sob temperatura de 24,6°C. Também é feito uma análise preliminar das concentrações de fenóis totais da amostra do extrato, através de uma mudança na colocação da amostra de extrato ao adicionar a solução de Folin-Ciocalteu com solução saturada de carbonato de sódio, a reação muda a cor da amostra para azul, que é proporcional aos teores de fenóis totais da amostra, ou seja, quanto maior a concentração dos teores de fenóis totais, mais intenso é o azul demonstrado na solução (Fig. 4 A) (WOISKY; SALATINO, 1998).

A solução metanólica de cloreto de alumínio 5% é utilizada para determinar a concentração de flavonoides totais de uma amostra de extrato da geoprópolis, o qual é realizado através de uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de quercetina. Para tanto, a solução padrão e as amostras testes de extrato são misturadas a solução metanólica de cloreto de alumínio 5% em triplicatas. Os resultados são determinados por meio de uma leitura das absorbâncias em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 420 nm, sob temperatura de 23,7°C. Também é feito uma análise preliminar das concentrações de flavonoides totais da amostra do extrato, através de uma mudança na colocação da amostra de extrato ao adicionar a solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, a reação muda a cor

da amostra para amarelo, indicando o teor de flavonoides totais. A intensidade do amarelo demonstra que a amostra apresenta elevados teores de flavonoides totais (Fig. 4 B) (WOISKY; SALATINO, 1998).

Figura 4 - A- Reação do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. com solução de Folin-Ciocalteu e solução saturada de carbonato de sódio, mostrando elevadas concentrações de fenóis totais na amostra do extrato, verificado pela coloração azul intenso nos pocinhos; B- Reação do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. com solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, mostrando elevadas concentrações de flavonoides totais na amostra do extrato, verificada pela coloração amarelo intenso nos pocinhos



Fonte: Elaboração do autor (2020)

A determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais é importante para indicar a qualidade da atividade antioxidante da amostra de extrato, demonstrada através dos baixos valores de IC_{50} (%), pois uma boa atividade antioxidante correlaciona-se aos elevados teores de fenóis e flavonoides totais (CASTRO et al., 2007; CABRAL et al., 2009; DA SILVA et al., 2013). Segundo a classificação da escala de qualidade da atividade antioxidante proposta por Melo et al. (2010), um produto natural é considerado com atividade antioxidante boa quando $IC_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$, moderada $65 \mu\text{g/mL} < IC_{50} < 152 \mu\text{g/mL}$ e baixa atividade $IC_{50} > 152 \mu\text{g/mL}$. Essa correlação acontece porque 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, promovendo proteção contra danos no DNA e atividade hepatoprotetora (MIRANDA-VILELA et al., 2008; ALMEIDA, 2009). A exemplo, as chalconas apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas, reduzem a viabilidade celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) (TAMIELLO, 2013).

Através do método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH é possível determinar a atividade antioxidante de uma amostra, pois baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância (NASCIMENTO et al., 2011). A capacidade sequestrante do radical DPPH é representada pelos valores de IC₅₀ (%) das amostras comparados com os de quercetina pura. Para tanto, é necessário, em triplicatas, adicionar nas amostras de extrato de geoprópolis a solução DPPH, a absorbância é ajustada para valor entre 0,7 a 0,8 a 517 nm. Após a adição do DPPH, as amostras reagem durante 20 min., sendo realizado a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 517 nm, sob temperatura de 33,2°C (MENSOR et al., 2001).

As substâncias antioxidantes têm a capacidade de proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo várias doenças, como cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (ALAM et al., 2013). Através de métodos eficientes para caracterização do perfil químico da geoprópolis é possível estudar e extrair substâncias capazes de combater diversas doenças, dentre elas, as que acometem o fígado, órgão vital que sofre lesões decorrentes de fatores externos e internos, os quais ocasionam inúmeras doenças hepáticas (SPIRA et al., 2002; ZHANG et al., 2008; TONG et al., 2017).

3.3 FÍGADO

3.3.1 Anatomia

O fígado é a víscera que apresenta um tamanho maior que os demais órgãos, corresponde a 4,5% da massa corporal total (MARTELLI, 2010). A sua posição anatômica na cavidade abdominal favorece a captura, transformação, acúmulo e neutralização de substâncias, situa-se no quadrado superior direito do abdômen e abaixo da superfície inferior do diafragma (LIMA, 2008). É constituído pelos lobos direito e esquerdo, dois lobos acessórios, quadrado e caudado (COGLIATI et al., 2011), organizados em lóbulos com formato hexagonal. Os dois lobos maiores, direito e esquerdo, são separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior. Entre eles há uma nítida diferença de volume com acentuado predomínio do direito sobre o esquerdo (TRIVIÑO; ABIB, 2003).

Nos vértices dos lóbulos são encontrados os espaços porta, que possuem uma artéria hepática, ducto biliar, veia porta, veia hepática terminal e vasos linfáticos, que estão conectados a um parênquima, dividido em três zonas. Esses componentes constituem a unidade estrutural básica do fígado, importante para a circulação hepática e anatomia funcional do órgão (ALOIA, 2006). Todo o sangue do fígado adentra pelo espaço porta, em direção ao centro do lóbulo, com isso todas as substâncias tóxicas ou não, presentes no sangue, atingem as células periportais, determinando o ácino hepático, local onde as funções celulares variam entre as suas regiões, determinando o comportamento celular (GUERRA et al., 2014).

3.3.2 Histologia

O fígado é revestido por cápsula de tecido conjuntivo, apresenta como principal componente celular os hepatócitos e, possui sinusóides hepáticos, como fonte de suprimento sanguíneo e nutrientes para todo o tecido hepático (RODRIGUES et al., 2012).

O parênquima hepático assume uma estrutura organizada em ácino hepático arquetizado em três zonas, conforme disposição dos hepatócitos no ácino. A primeira região é denominada de zona 1, que equivale à região perilobular, representada pela população de hepatócitos periportais, sendo a zona mais rica em nutrientes e oxigênio, facilmente afetada por hepatotoxinas (MACHADO et al., 2006).

A zona 2, corresponde a área de hepatócitos mediozonal, os quais obtêm menos suprimento sanguíneo, sendo a região do ácino menos afetadas por hepatotoxinas. A zona 3 corresponde a população de hepatócitos perivenosos mais próximos da veia hepática terminal, localizado na porção mais distante do vértice do ácino, entretanto, é mais afetada por hepatotoxinas, pois é nela que ocorre a alta atividade do citocromo P450, ou seja, as células tem grande capacidade de formar intermediários tóxicos. Essa arquitetura é de suma importância na avaliação do grau de lesão sofrida no tecido hepático (SAID, 2001).

Os sinusóides são capilares sanguíneos fenestrados que recebem sangue oxigenado e rico em nutrientes da artéria hepática e da veia porta hepática, garantindo a funcionalidade do fígado. As células endoteliais dos sinusóides, células de Kupffer, células de Ito e linfócitos, do tipo “natural killer” estão associados aos sinusóides e espaço de Disse (GAYÃO et al., 2013; BUZATO et al., 2016).

As células de Ito são as principais responsáveis pelo armazenamento de vitaminas. Em processos inflamatórios ou em lesões hepáticas perdem essa capacidade e diferenciam-se em células com características de miofibroblastos (COGLIATI, et al., 2016).

As Células de Kupffer permitem a passagem do plasma aos hepatócitos e sua deficiência pode causar patologias associadas ao armazenamento de ferro, provocando o acúmulo exacerbado desse íon nos hepatócitos, consequentemente, acarretando lesões hepática e hepatocarcinoma (CLÀRIA; TITOS, 2004). Para algumas dessas substâncias, as reservas hepáticas permitem meses a anos de privação sem consequências clínicas evidenciáveis (MARTELLI, 2010).

Os hepatócitos são células que apresentam seis superfícies, que se conectam com o canalículo biliar, membrana de hepatócitos vizinhos e com sinusóide, sendo com este último separados pelo espaço de Disse (MCCUSKEY, 2008). É formado por um núcleo central com cromatina descondensada, contendo 1 a 2 nucléolos evidentes e citoplasma amplo e eosinofílico. Essas características são importantes na identificação de lesão, necrose ou degeneração celular hepática, pois nesses casos há evidente alteração na cromatina, nucléolos e citoplasma (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A produção dos fatores e inibidores de coagulação ocorre nos hepatócitos, com o auxílio da vitamina K, que age como cofator nas reações enzimáticas (KLACK; CARVALHO, 2006). Os fatores de coagulação capazes do fígado produzir são: I (Fibrinogênio), V (Lábil), VIII (Anti-hemo- fílico A), X, XII, Pré-caliceína, Proteína C e S, Anti-trombina III, Alfa-2-antiplasmina, II (Protrombina), VII (Pró-convertina), IX (Anti-hemofílico B), XI, XIII (Estabilizador da fibrina), Cininogênio de alto peso molecular, Plasminogênio e o Alfa-2-macroglobulina (SOUZA et al., 2011; JUSTINO, 2015).

O processo de síntese de proteínas no fígado ocorre nos hepatócitos com o intuito de exportar para os tecidos proteínas que foram degradadas durante processos metabólicos do organismo e se encontram ausentes na corrente sanguínea, influenciando na regulação de substâncias no corpo (RAMANATHAN et al., 2010). Em média 75 a 100 g por dia de proteínas sanguíneas são processadas pelo fígado, como o fibrinogênio, importante nos processos de coagulação do sangue, seroalbumina e a seroglobulina. Além disso, também executa a conversão de amônia em ureia e glicogênio em glicose (CRUVINEL et al., 2010). Desse modo, o fígado controla os níveis de amônia e glicose no organismo, que são gerados, respectivamente, durante o processo de desaminação de aminoácidos e glicogenólise, que devem ser controlados para evitar intoxicação por amônia e diabetes (BUTTERWORTH, 2011; DAVID-SILVA et al., 2013). A albumina, também é uma proteína sintetizada pelo fígado, que é importante por servir de meio de transporte na corrente sanguínea para outras substâncias, como hormônios, pigmentos, drogas e, além disso, mantém a água dentro da

circulação, reduzindo a formação de ascite e edemas em várias partes do corpo, sendo um indicador da capacidade funcional hepática (ARAÚJO et al., 2015b).

Doenças hepáticas em fase avançada provocam a perda da capacidade de síntese de proteínas e prejudicam o fornecimento de substâncias, como glicose (DAVID-SILVA et al., 2013). A função de armazenamento de várias substâncias que o fígado possui, garante todo o organismo o suprimento contínuo dessas substâncias, tais como, ferro, glicose e vitaminas A, D, E, K e B₁₂, estando envolvidos nesse processo um conjunto de ações combinadas com os hepatócitos, células endoteliais fenestradas, células de Kupffer e células de Ito (SCHINONI, 2006; JESUS et al., 2014). Os hepatócitos para armazenarem glicose ampliam sua capacidade de captação de glicose, juntamente com os processos de inibição da fosforilase, que impede a transformação do glicogênio em glicose e aumento da atividade de fosfofrutoquinase e glicogênio sintetase, que promovem a síntese de glicogênio (GORLA JUNIOR et al., 2001).

Diante da estrutura e dinâmica do fígado, pesquisas são desenvolvidas com roedores (BHADAURIA et al., 2007; CARVALHO et al., 2013; DAVID-SILVA et al., 2013; MONMA et al., 2015), por apresentarem um fígado com aparência mais lobulada do que a da espécie humana, pertencerem a Classe Mammalia e possuírem desenvolvimento embriológico semelhante, o que permite ter aspectos histológicos e fisiológicos próximos (LIMA, 2008). Nessas pesquisas são utilizadas drogas hepatotóxicas com o intuito de verificar a capacidade de regeneração do fígado, bem como, a atividade hepatoprotetora das substâncias testes. Dentre as hepatotoxinas, o acetaminofen é um fármaco amplamente utilizado por produzir padrão morfológico macroscópico e histológico compatível com hepatite tóxica em humanos em um período experimental de no máximo 48 h, além de apresentar menor taxa de mortalidade entre os animais experimentais (SAID, 2001; SILVA et al., 2014b).

3.3.3 Metabolização do acetaminofen no fígado

O fígado é essencial, por desempenhar complexas funções vitais no organismo dos animais, tais como a síntese e armazenamento de várias substâncias, secreção de sais e ácidos biliares, filtragem de sangue, formação dos fatores de coagulação, biotransformação e metabolismo (GUYTON; HALL, 2002; AGUIAR et al., 2011).

A função essencial da biotransformação é diminuir a capacidade de penetração de compostos lipossolúveis na membrana plasmática, através do aumento da hidrossolubilidade e

polaridade, tornando o composto menos lipossolúvel (LIMA, 2008). Entretanto, algumas das atividades hepáticas tornam as drogas mais tóxicas para o organismo. A exposição crônica a substâncias tóxicas geralmente resulta na alteração da função orgânica, na diminuição do órgão e no aumento do tecido conjuntivo fibroso intra-hepático (MACÍAS et al., 2017).

Dentre as drogas hepatotóxicas, tem se destacado o acetaminofen, antipirético muito usado pela população, por apresentar eficácia terapêutica, não interagir com a maioria dos medicamentos e não precisar de prescrição médica. É um anti-inflamatório não-esteróidal (AINE), inibidor da ciclo-oxidase (COX), não seletivo para COX-1 e COX-2 e seletivo para COX-3 que é expresso em maiores quantidades no córtex cerebral e no coração (BRAYNER et al., 2018).

O acetaminofen foi introduzido como agente antipirético em 1886. Somente em 1949 foi utilizado pela prática médica (INSEL, 1991). O primeiro relato de toxicidade por acetaminofen foi realizado por Eder em 1964, que associou seu uso prolongado com quadros de hepatotoxicidade em felinos (SAID, 2001). A partir dessa descoberta, tem-se aumentado o uso de acetaminofen como indutor de lesão hepática em pesquisas sobre efeito hepatoprotetor de produtos naturais (LORENZONI et al., 2014).

A hepatotoxicidade dessa droga é estabelecida a partir dos compostos formados durante o processo de metabolização hepática. O composto tóxico formado é o n-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), sua produção ocorre após a saturação das vias metabólicas principais: detoxificação por glucuronidação e por sulfatação. O que não foi conjugado sofre N-hidroxilação mediada pela via citocromo P450. Ao ativar essa via, ocorre o aumento dos níveis de NAPQI, o qual irão se conjugar com a enzima glutathione (GSH) endógena, consumindo todo o estoque de GSH, e consequentemente, acumula-se na forma de radicais livres no organismo, o que reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica no fígado, provocando alterações na homeostase do cálcio intracelular e no metabolismo energético (LOPES; MATHEUS, 2012). Tais casos resultam no desenvolvimento de insuficiência hepática fulminante, associada à hemorragias, degeneração e necrose hepatocelular que, dependendo do caso, evolui para o óbito (OLIVEIRA et al., 2014; JUNAPUDI et al., 2018).

3.4 LESÕES E CICATRIZAÇÕES HEPÁTICAS

O fígado possui um ritmo lento de renovação celular, com grande capacidade de regeneração (AGUIAR et al., 2011). A regeneração do tecido hepático é um processo que

acontece quando há um déficit funcional do fígado causado por injúrias e ocorre através de crescimento compensatório da porção remanescente, havendo proliferação celular, acompanhada de hiperplasia das células quiescentes, a fim de restaurar a capacidade funcional do fígado (FAUSTO et al., 2006). Esse processo é complexo e envolve diversos mecanismos que necessitam da ativação de múltiplas vias, como também, dos fatores de crescimento epidermal, fator de crescimento transformador α (TGF- α), fator de crescimento de hepatócitos, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6, que podem ocorrer em diferentes células hepáticas e fases de regeneração hepática distintas (NAVES; MORENO, 2000; SILVA et al., 2015).

Além disso, após uma injúria, as células de Ito participam dos processos regenerativos, com o intuito de restaurar a massa hepática perdida, essas células sofrem migração no espaço de Disse em torno das células endoteliais, para se conectarem com os hepatócitos e criar novos ramos de sinusóides (BORGES, 2013). Os hepatócitos são importantes nesse processo, pois são os primeiros a se regenerar e iniciam sua proliferação nas regiões periportais dos lóbulos e proporcionam estímulos mitogênicos às outras células hepáticas, através da produção de fatores de crescimento e da própria cinética de proliferação celular (DE JESUS et al., 2000).

Nas doenças hepáticas inflamatórias crônicas, a resposta cicatricial do fígado é a produção de uma fibrose, o qual apresenta como resultado final um acúmulo de matriz extracelular e a substituição do colágeno tipo IV, pelo colágeno tipo I, dentro do espaço de Disse, sendo um processo patológico progressivo, que envolve múltiplos eventos celulares e moleculares, levando à deposição da matriz extracelular (JIN et al., 2017). Quando esse processo é combinado com regeneração e reparo ineficaz, ocorre uma distorção hepática normal resultando em cirrose (ARAÚJO et al., 2015b).

Nas lesões hepáticas agudas as células diferenciadas residuais sofrem divisão e reconstróem a massa hepática e a substituição dos hepatócitos perdidos ocorre principalmente pela divisão mitótica dos hepatócitos periportais (BRAUN; PRANKE, 2006).

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde de ordem mundial (LORENZON et al., 2014). Na África e na Ásia, as principais causas de doenças hepáticas são infecções virais e parasitárias, destacando-se a hepatite B (HVB), um dos principais patógenos humanos que infecta cerca de 400 milhões de pessoas no mundo (ROSA, 2015). Na Europa e na América, o consumo de álcool e a hepatite C (HVC) são as maiores causas de doenças hepáticas, juntamente com a esteato-hepatite não alcoólica (ZHANG et al., 2008). No Brasil, a taxa de mortalidade por cirrose hepática é de 13,2% por

100 mil habitantes no sexo masculino e 2,9% no sexo feminino (CARVALHO et al., 2014a). O consumo abusivo do álcool ainda é considerado a principal causa, entretanto há um aumento da incidência de hepatites de caráter crônico, contribuindo para os altos índices de mortalidade por cirrose (MINCIS; MINCIS, 2011).

3.5 HEPATOPROTETORES

Os extratos vegetais ricos em compostos bioativos, com propriedades antioxidantes, que combatem o estresse oxidativo, tem despertado interesse na comunidade científica e no mercado consumidor, por apresentar relevância para o tratamento de diversas enfermidades e estarem relacionados com efeitos benéficos ao organismo, como retardo do envelhecimento, efeito hepatoprotetor e prevenção de diversas patologias. Os extratos com efeito hepatoprotetor apresentam mecanismos de ação diferentes, para proteger o fígado de possíveis patologias, dentre os quais destacam-se os extratos de *Camellia sinensis* (chá verde), *Desmodium gangeticum*, *Phyllanthus urinaria*, *Tinospora cordifolia*, *Tinospora sinensis*, *Neem guduchi* e própolis de *A. mellifera* (LORENZONI et al., 2014).

Estudos realizados por Salminen et al. (2012), utilizando extrato aquoso de *C. sinensis* (500 ou 1000 mg/kg) contra danos hepáticos induzidos por acetaminofen (150, 200 e 300 mg/kg) administrado depois da aplicação do extrato, demonstrou que a planta apresenta efeito hepatoprotetor, devido os compostos bioativos presentes em sua composição, como catequinas polifenólicas e epigallocatequina galato. Quando administrado o acetaminofen antes do extrato sob as mesmas doses, ocorreu a potencialização do dano hepático. Isso foi explicado por meio dos processos de depleção dos níveis de GSH reduzida hepática encontrados.

Já pesquisas realizadas por Hau et al. (2009) com *P. urinaria*, planta que apresenta possível efeito anticancerígeno, foi testada por via oral em diferentes doses (20, 40, 80 e 200 mg/kg), frente ao dano induzido por acetaminofen na dose de 550 mg/kg, via intraperitoneal, em modelo experimental com camundongos. Os resultados demonstraram que o extrato inibiu a hepatotoxicidade provocada pelo acetaminofen e ajudou a reduzir a atividade da enzima CYP2E1 a nível hepático. Isso se deve a presença de ácido gálico na composição do extrato, o qual atua como inibidor da CYP2E1 e o mecanismo de ação está relacionado a regulação do citocromo P450 e também da enzima CYP2E1.

O gênero *Tinospora* apresenta plantas que são muito utilizadas para a regulação das funções hepáticas, tratamento da febre, reumatismo crônico e hemorroidas ulceradas

(MITTAL et al., 2014). Esse gênero tem demonstrado efeito hepatoprotetor em pesquisa realizada por Chavan et al. (2013), no qual apresentaram resultados diferentes entre as espécies de plantas, sendo que *T. cordifolia* influenciou nos teores de colesterol total e, nos exames histológicos os hepatócitos centrolobulares se mostraram inchados, enquanto os periportais estavam dentro da normalidade. *T. sinensis* apresentou efeito específico sobre a atividade da alanina aminotransferase (TGP), fosfatase alcalina e nos níveis de triglicérides, demonstrando na avaliação histológica o tecido hepático com células normais, evidenciando regeneração hepática. *N. guduchi* reduziu a atividade da aspartato aminotransferase (TGO), os níveis de bilirrubina e preservou a arquitetura hepática. Tais resultados reforçam que espécies de plantas pertencentes ao mesmo gênero apresentam mecanismos de ações diferentes, relacionados com a restauração das transaminases, conteúdo de bilirrubina e controle do perfil lipídico, o que não impede de serem administradas em associação para o restabelecimento das funções hepáticas.

O extrato de própolis administrado após o uso de tetracloreto de carbono (CCl₄) na dose de 0,15 ml/kg, por via intraperitoneal, reverteu as alterações nas variáveis bioquímicas do sangue e do tecido, incluindo o teste da função hepática e marcadores de estresse oxidativo e a histologia apresentou melhor arquitetura celular do fígado, confirmando sua eficácia hepatoprotetora, diante de injúrias, como elevação acentuada na atividade das transaminases séricas, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase, redução no nível de glicose no sangue, aumento das proteínas séricas, na bioquímica tecidual, revelou redução significativa nos teores totais de proteínas e glicogênio, atividade da fosfatase alcalina e adenosina trifosfatase e aumento significativo na atividade da fosfatase ácida no fígado (BHADAURIA et al., 2007). Quanto à geoprópolis dos meliponídeos, ainda é muito baixo o número de estudos, porém, alguns estudos já demostram bons resultados quanto suas ações imunomoduladora, antimicrobiana e genoprotetora, havendo a necessidade de estudos no combate a doenças crônicas, como o câncer (LIBERIO et al., 2011; FRANCHIN et al., 2012; CUNHA et al., 2013; SILVA et al., 2019b).

3.6 POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA GEOPRÓPOLIS

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação exacerbada das células, sem haver um controle pelo organismo, formando tumores, com grande potencial infiltrativo em diversos tecidos e órgãos (REBECCA et al., 2015). Essa proliferação exacerbada pode ocorrer por exposição ao tabagismo, radiação, vírus, produtos químicos com potencial

carcinogênico e inflamação crônica, desencadeando mutações com alterações severas na estrutura do DNA das células (OLIVEIRA et al., 2015). Por essa razão, o câncer é uma doença com casuística de óbitos elevados, que apresenta um tratamento quimioterápico invasivo com reações adversas graves, que não só tem efeito deletério em células tumorais, como também em células normais (KAMB, 2005; PANIS et al., 2018). Segundo Carvalho et al. (2014b), no Brasil, em 2011, o câncer foi responsável por 16,4% dos óbitos, sendo a segunda causa de mortalidade. O Sistema Único de Saúde (SUS) aponta que neoplasias foram a terceira causa de internação no período de 2002 a 2012 (MALTA et al., 2012).

Diante da casuística de pessoas doentes de câncer, estudos sobre a capacidade genoprotetora e efeitos biológicos tradicionais, como citotóxico e antitumoral de produtos naturais, tem alavancado bastante interesse entre a comunidade científica, pois os prejuízos à saúde humana e animal, podem estar atrelados aos danos no DNA causado por substâncias desconhecidas administradas em altas doses (PUPO; GALLO, 2007; MACEDO et al., 2013), como por exemplo, pode interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição, além de levar à morte celular e induzir mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento (HOEIJMAKERS, 2009). A procura de produtos naturais como fonte terapêutica vem aumentando no mercado consumidor, no entanto, o contato com substâncias de atividades biológicas desconhecidas pode trazer consequências graves para a saúde humana. Por isso, a realização de estudos que verifiquem o efeito tóxico de produtos naturais, industriais e de substâncias químicas é um desafio cada vez mais recorrente (MASLOV et al., 2015). Por esse motivo cresce o interesse em desenvolver fármacos a base de produtos naturais com potencial antineoplásico e genoprotetor, em doses terapêuticas, que concedam o máximo de segurança no uso (LOTUFO et al., 2010).

Os testes *in vitro* são muito bem aplicados em pesquisas para verificar a capacidade citotóxica dos produtos naturais (ROGERO et al., 2003), havendo a necessidade de desenvolver e padronizar esses testes, 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). O teste muito bem aplicado em estudos para verificação da atividade antineoplásica de produtos naturais, como também, é utilizado 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 (MOSMANN, 1983; ARAÚJO et al., 2008), é o ensaio quantitativo pelo método colorimétrico do MTT {brometo de [3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio}}, que tem como objetivo analisar a viabilidade ou proliferação celular através do dano celular, pela ação da enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias das células vivas, em reduzir o sal MTT, por clivagem do anel tetrazólio à cristais de formazan. Essa reação é observada através da mudança de cor do sal, que tem um colocaração amarelada, ao ser reduzido para o composto formazan, ocorre a mudança de cor para um tom azul escuro. Dessa maneira, a quantidade de formazan medida por espectrofotometria é diretamente proporcional ao número de células viáveis (PORTO et al., 2011).

Como parâmetro de atividade antitumoral, o 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). Inserido nesse parâmetro de avaliação, pesquisas com própolis tem demonstrado excelentes resultados antineoplásicos. Sanches et al. (2017), em estudo com extrato etanólico de geoprópolis da espécie *Scaptotrigona aff. postica* demonstraram excelente atividade antineoplásica em linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF7), melanoma murino (B16-F10), astrocitoma (U343MG-a) e fibroblastos de camundongos (3T3), nas concentrações utilizadas.

Frozza et al. (2013), quando testaram o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de *A. mellifera*, proveniente do estado de Sergipe, em linhagens celulares de câncer Hep-2 (carcinoma epidermóide laríngeo humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e células não tumorais Hek-293 (rim embrionário epitelial normal humano), obtiveram IC_{50} de 63,48; 81,40 e >150 , respectivamente, após 24 h de exposição. Campos et al. (2014) ao testarem o extrato etanólico de geoprópolis da abelha *Melipona orbignyi* em células de eritroleucemia K562, demonstraram uma citotoxicidade nas concentrações mais altas testadas 250, 274, 500 $\mu\text{g/mL}$. Ambas as pesquisas demonstraram em seus extratos atividade antineoplásica.

O potencial antineoplásico de um produto natural, como a própolis ou geoprópolis está intimamente associado a sua composição química, que por sua vez, apresenta elevados teores de fenóis e flavonoides totais, com grande capacidade antioxidante, além disso, existem substâncias que promovem diretamente efeito deletério nas células tumorais, destacando as chalconas, apigenina ou outros compostos isolados (TAMIELLO, 2013; ZILLA et al., 2014; ZHANG et al., 2015; SALMANI et al., 2017; MADUNIC et al., 2018; SEM et al., 2019).

De acordo com Zilla et al. (2014) lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside exibe notável potencial citotóxico em diversas linhagens celulares de câncer.

O seu potencial terapêutico foi estudado pela primeira vez, exibindo atividade antiproliferativa e geradora de espécies reativas de oxigênio (ERO). Tamiello (2013) revelou as chalconas como compostos químicos com diversas atividades biológicas, dentre elas, a capacidade de reduzir a viabilidade celular de HepG2, com alto potencial citotóxico nesse tipo de célula. A apigenina também é responsável por efeitos deletérios em células tumorais (ZHANG et al., 2015; SALMANI et al., 2017; MADUNIC et al., 2018). Sen et al. (2019), observaram um maior potencial citotóxico e apoptótico de apigenina em células de carcinoma do cólon humano HCT-15 e HT-29, quando comparado com 5-Fluorouracil, e ao administrar um fármaco constituído de lipossoma duplo contendo apigenina e 5-Fluorouracil, verificaram o aumento da eficácia terapêutica no câncer colorretal, devido a associação sinérgica com apigenina.

O potencial genotóxico de uma substância é conferido através do estresse oxidativo, que é caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas (ERs) na célula, as quais induzem lesões em suas estruturas, incluindo o DNA, promovendo morte ou proliferação celular, devido a sua citotoxicidade e genotoxicidade (SULCZEWSKI et al., 2014). O dano ao DNA pode interferir em processos celulares essenciais, provocando mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento (HOEIJMAKERS, 2009).

Os estudos de genotoxicidade são imprescindíveis na elaboração de novos fármacos que irão para o mercado consumidor, devendo ser realizados nos estágios iniciais das pesquisas, para o descobrimento do potencial genotóxico das substâncias envolvidas no fármaco, evitando a introdução de medicamentos lesivos ao organismo (NIWA et al., 2013).

As análises sobre o efeito genoprotetor de um produto natural estão sendo amplamente realizadas através do ensaio cometa, devido a sua capacidade de detectar danos ao DNA (FIKROVÁ, 2011). Nesse ensaio é feito a extração do DNA das células do tecido e visualizadas no gel de eletroforese em meio alcalino. Após, são submetidas aos processos de neutralização e fixação, as lâminas são coradas com uma solução de nitrato de prata, para analisar os danos no DNA de cada célula, que são visualizados por meio da formação de uma cauda (cometa) no material determinando a lesão. Os cometas são quantificados em danos 0, 1, 2, 3, 4 e apoptose (SILVA, 2007; SULCZEWSKI et al., 2014). É importante para a realização desse ensaio, que os valores de viabilidade celular analisados no teste de citotoxicidade, sejam superiores a 70% (TICE et al., 2000). Ao final, é mensurada as médias dos índices de dano ao DNA (idDNA) celular e os percentuais de redução da genotoxicidade em todas as concentrações testadas, quando elevados confere o potencial genoprotetor do extrato (SILVA et al., 2019b).

O potencial genoprotetor de produtos naturais está relacionado com a atividade antioxidante dos compostos fenólicos (HOSHINA, 2012), pois antioxidantes naturais podem diminuir o estresse oxidativo e consequentemente promover proteção contra danos no DNA. Em pesquisas com produtos naturais são avaliados os valores de fenóis e flavonoides totais que estão correlacionados com a atividade antioxidante (MIRANDA-VILELA et al., 2008). Aprotosoiaie et al. (2017), testaram o extrato hidrometanólico de *Ramaria largentii* Marr & D. E. Stuntz (cogumelo coral laranja), coletado no Nordeste da Romênia, como agente genoprotetor em células Vero (ATCC CCL 81), associado a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Os autores estimaram boa capacidade de eliminação e redução de radicais livres ($EC_{50} \pm 64,3 \pm 0,2$ e $61,54 \pm 0,46$ mg/mL) e elevados teores do conteúdo fenólico ($42,33 \pm 0,18$ mg de GAE/g). Associado a esses valores, nas células Vero normais, o extrato em todas as concentrações testadas (100, 200 e 300 mg/mL) não apresentou potencial genotóxico e, além disso, DNA quase completamente protegido contra danos induzidos por peróxido de hidrogênio, possuindo assim expressiva atividade genoprotetora, decorrente da atividade antioxidante dos composto fenólicos presentes no extrato.

O mesmo ocorreu em pesquisas realizadas por Costa (2018), Nunes (2018) e Silva et al. (2019b), no semiárido do Rio Grande do Norte, os extratos hidroetanólico de geoprópolis da *Partamona cupira*, *Frieseomelitta doederleini* e de própolis vermelha de *A. mellifera* apresentaram atividade genoprotetora em linhagem L929 de fibroblasto murino, no ensaio cometa (*P. cupira* e *A. mellifera*) e pelo teste de detecção *in vitro* de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (*F. doederleini*), bem como elevado potencial antioxidante. Reforçando que a atividade genoprotetora está intimamente relacionada ao potencial antioxidante dos compostos fenólicos.

Diante de diversos resultados satisfatórios com própolis de *A. mellifera*, a geoprópolis de meliponídeos tem despertado interesse dos pesquisadores em estudos voltados para o conhecimento de sua composição química e atividades farmacológicas (FIANCO et al., 2013; SOUSA et al., 2015; SILVA et al., 2016; BONAMIGO et al., 2017), tornando-se essencial estudos *in vitro* que avaliem o potencial citotóxico e genotóxico (HOEIJMAKERS, 2009; GOULART et al., 2015).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. R. F. et al. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. **ABCD – Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 1, p. 144-151, 2011.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

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

ALMEIDA, D. C. et al. Própolis na odontologia: uma abordagem de suas diversas aplicabilidades. **Revista Fluminense de Odontologia**, v. 22, n. 46, p. 1-12, 2016.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 1698-1706, 2013.

ALOIA, T. P. A. **Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)**. 2006. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A. Notas sobre a bionomia de *Melipona mandacaia* (Apidae: Meliponina). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 204-212, 2007.

APROTOSOAIE, A. C. et al. Antioxidant and antigenotoxic potential of *Ramaria largentii* Marr & D. E. Stuntz, a wild edible mushroom collected from Northeast Romania. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 429-437, 2017.

ARAÚJO, M. et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, p. 12-20, 2015a.

ARAÚJO, S. A. C. et al. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008.

ARAÚJO, S. V. S. et al. Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada na cirrose hepática: uma revisão. **Uniciências**, v. 19, n. 1, p. 38-44, 2015b.

ARNOSO, B. J. M.; COSTA, G. F.; SCHMID, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2019.

BARRETO, L. S.; TEIXEIRA, A. F. R. Manejo Avançado e Conservação de Meliponíneos. **Researchgate**, p. 1-3, 2006.

BARTOLOMEU, A. R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48-55, 2016.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S. K.; SHUKLA, S. Própolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 302, n. 2, p. 215-224, 2007.

BIESMEIJER, J. C.; HARTFELDER, K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Stingless bees: biology and management. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 121-123, 2006.

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.

BORGES, D. S. **Avaliação do papel das células estreladas hepáticas, células endoteliais sinusoidais e macrófagos tipo II, no remodelamento pós-quimioterápico das lesões hepáticas na esquistossomose mansônica experimental**. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

BRASIL. Portaria n. 162, de 24 de abril de 2014. Estabelece as Rotas de Integração Nacional como estratégia de Inclusão Produtiva e Desenvolvimento Regional do Ministério de Integração Nacional. **Diário Oficial da União, Poder Executivo**, Brasília, DF, 2014. Seção 1, p. 30.

BRAUN, A. C.; PRANKE, P. Potencialidades da terapia com células-tronco na regeneração hepática. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 3, p. 146-156, 2006.

BRAYNER, N. F.; SILVA, A. A.; ALMEIDA, F. R. O risco do uso irracional do paracetamol na população brasileira e seus efeitos na hemostasia. **Revista Científica da FASETE**, v. 2018, n. 16, p. 138-153, 2018.

BRUENING, H. **Abelha Jandaíra**. 3 ed. Natal: SEBRAE/RN, 2006.

BUTTERWORTH, R. F. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder?. **Hepatology**, v. 53, n. 4, p. 1372-1376, 2011.

BUZATO, C. B. C.; ARANA, S.; CARVALHO, C. P. F. Histologia do fígado, vias biliares e pâncreas, sistema digestório: Integração básico-clínica. p. 335-368, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/9788580391893-14>.

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

CAMARA, J. Q. Estudos de meliponídeos, com ênfase à *Melipona subnitida* no município de Jandaíra, RN. **Revista Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz. 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – bionomia e biogeografia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 3, p. 311-372, 2003.

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

CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Antioxidantes previnem doenças e envelhecimento. **Visão Agrícola**, n. 7, p. 15-17, 2007.

CARTAXO, R. T. **Fracionamento bioguiado e caracterização química de compostos com atividade antimicrobiana de geoprópolis de Uruçu nordestina: abelha indígena sem ferrão *Melipona scutellaris***. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

CARVALHO, J. R. et al. Método para estimação de prevalência de hepatites B e C crônicas e cirrose hepática – Brasil, 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 691-700, 2014a.

CARVALHO, M. D. et al. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599-608, 2014b.

CARVALHO, W. L. et al. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 339-344, 2013.

CARVALHO-ZILSE, G. A. et al. Does beekeeping reduce genetic variability in *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini)? **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 758-765, 2009.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; KERR, W. E. Substituição natural de rainhas fisogástricas e distância de vôo dos machos em Tiuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) e Uruçu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). **Acta Amazonica**, v. 34, n. 4, p. 649-652, 2004.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; NUNES-SILVA, C. G. Threats to the stingless bees in the Brazilian Amazon: how to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction. In: FLORIO, R. M. (Eds.). **Bees: Biology, Threats and Colonies**. New York: Nova Science Publishers, 2012. p. 147-168.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHAVAN, T. et al. Satwa from three *Tinospora* species exhibits differential hepatoprotective activity against repeated acetaminophen dosing in rats. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 1, p. 123-28, 2013.

CLÀRIA, J.; TITOS, E. La célula de Kupffer. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 4, p. 264-273, 2004.

COGLIATI, B. et al. Morphological and molecular pathology of CCL4-induced hepatic fibrosis in connexin43-deficient mice. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 5, p. 421-429, 2011.

COGLIATI, B. et al. Connexin32 deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced hepatocellular injury and liver fibrosis in mice. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 18, p. 1-9, 2016.

COSTA, K. M. F. M. **Efeito antioxidante, genoprotetor e hepatoprotetor da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semiárido nordestino.** 2018. 93f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

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. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 13, n. 23, p. 1-9, 2013.

DA ESCÓSSIA PINHEIRO, C. G. M. et al. Microbiological quality of honey from stingless bee, jandaíra (*Melipona subnitida*), from the semiarid region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 48, n. 9, p. 1-6, 2018.

DA SILVA, E. C. C. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013.

DAVID-SILVA, A. et al. Hepatocyte nuclear factors 1 α /4 α and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. **Life Sciences**, v. 93, p. 805-813, 2013.

DE 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. 242-254, 2000.

DOS SANTOS SILVA, A. et al. Induced blooming of jurema preta to provide pollen for honey bees during drought in caatinga. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 197-206, 2015.

EDUARDO, L. F. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos da geoprópolis (*Melipona scutellaris*) bioguiado pelo efeito antimicrobiano.** 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**, v. 43, n. 2, p. 45-53, 2006.

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**, v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 2017.

FERREIRA, J. M. et al. Própolis e geoprópolis verde do semiárido derivadas de Jurema-preta. **Mensagem Doce (Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias)**, v. 1, n. 147, p. 7-12, 2019.

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, n. 21, p. 1-112, 2013.

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

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

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

FRANCOY, T. M.; FONSECA, V. L. I. A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 317-321, 2010.

FREITAS, M. F. et al. Preservação de abelha sem ferrão no semi-árido através da criação racional. **Mensagem Doce**, n. 81, p. 1, 2005.

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

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

GAYÃO, A. L. B. A. et al. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilapia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 991-997, 2013.

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

GORLA JUNIOR, J. A. et al. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte I: o papel dos hormônios. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 1-7, 2001.

GOULART, T. L. S.; BOYLE, R. T.; SOUZA, M. M. Cytotoxicity of the association of pesticides Roundup Transorb_ and Furadan 350 SC_ on the zebrafish cell line, ZF-L. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 1377-1384, 2015.

GUERRA, J. M. et al. Hypervitaminosis A-induced hepatic fibrosis in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, p. 243-248, 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p.

HAU, D. K. et al. *Phyllanthus urinaria* extract attenuates acetaminophen induced hepatotoxicity: Involvement of cytochrome P450 CYP2E1. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 751-760, 2009.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, 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 em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

INSEL, P. A. Substâncias analgésicas – antipiréticas e anti-inflamatórias, drogas empregadas no tratamento de artrite reumatoide e da gota. In: GILMAN, A. G. **Goodman and Gilman's: as bases farmacológicas da terapêutica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 26, p.1864-1891.

ITHARAT, A. et al. *In vitro* cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004.

JAFFE, R. et al. Diagnóstico da meliponicultura no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 120, p. 1, 2013.

JESUS, G. C.; SOUSA, H. H. B. A.; BARCELOS, R. S. S. Principais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas. **Estudos**, v. 41, n. 3, p. 525-537, 2014.

JIN, H. et al. Hepatic stellate cell interferes with NK cell regulation of fibrogenesis via curcumin induced senescence of hepatic stellate cell. **Cellular Signalling**, v. 6568, n. 17, p. 30043-30048, 2017.

JUNAPUDI, S.; JANAPATI, Y. K.; BRAMHACHARI, P. V. Hepatoprotective activity of *Talinumportulacifolium* forsk, extract against paracetamol induced hepatic damage in rats. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 171-179, 2018.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUSTINO, C. L. **Hemofilia: o diagnóstico em face da profilaxia em pacientes hemofílicos**. 2015. 29f. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Patos de Minas Biomedicina, Patos de Minas, 2015.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, 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, n. 1, p. 121-129, 2013.

KLACK, K.; CARVALHO, J. F. Vitamina K: Metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante Varfarina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 6, p. 398-406, 2006.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LAVINAS, F. C. et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 389-399, 2019.

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, n. 108, p. 1-9, 2011.

LIMA, M. V. D. **Geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas: atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

LIMA, T. C. **Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratos Wistar**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA-VERDE, L. W.; FELIX, J. A.; FREITAS, B. M. Aspectos da meliponicultura no estado do Ceará. **Mensagem Doce (Associação Paulista De Apicultores, Criadores De Abelhas Melificas Européias)**, v. 151, p. 04-06, 2019.

LOBATO, T.; VENTURIERI, G. C. **Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste paraense**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2010, 36p.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do paracetamol (acetaminofem). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 411-414, 2012.

LORENZONI, A. A. et al. Efeito protetor de produtos naturais sobre o dano hepático induzido pelo paracetamol. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 11, n. 2, p. 43-52, 2014.

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.

MACEDO, J. et al. Avaliação de genotoxicidade de nanofibras de celulose utilizando teste Allium Cepa. In: WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 7. São Carlos: Embrapa Instrumentação. **Anais...** São Carlos-SP, 2013.

MACHADO, C. B. et al. Characterization of *in vitro* healthy and pathological human liver tissue periodicity using backscattered ultrasound signals. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 32, n. 5, p. 649-657, 2006.

MACHADO, P. A. et al. Mecanismos moleculares de ação antioxidante de vias celulares intrínsecas e do resveratrol. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13 n. 23, p. 750-763, 2016.

MACÍAS, J.; PINEDA, J. Á.; REAL, L. M. Non-alcoholic fatty liver disease in HIV infection. **AIDS Reviews**, v. 19, n. 1, p. 35-46, 2017.

MACIEL, C. R. et al. Atividade antimicrobiana da geoprópolis da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) contra bactérias isoladas em leite de vacas mestiças leiteiras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 1, p. 38-46, 2015.

MADUNIC, J. et al. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. **Cancer Letters**, v. 413, p. 11-22, 2018.

MALTA, D. C. et al. Morbidade hospitalar e ambulatorial em doenças crônicas não transmissíveis no Sistema Único de Saúde – DCNT. In: BRASIL. **Saúde Brasil 2012: uma análise da situação de saúde e dos 40 anos do Programa Nacional de Imunizações**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p.243-71.

MARTELLI, A. Metabolismo hepatocelular dos lipídeos: uma abordagem clínica e histopatológica do acúmulo intracelular de lípidos (esteatose) do parênquima hepático induzida pelo álcool. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 1, p. 55-59, 2010.

MASLOV, A.Y. et al. High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests?. **Mutation Research**, v. 776, n. 1, p. 136-43, 2015.

MCCUSKEY, R. S. The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants. **The Anatomical Record**, v. 291, n. 6, p. 661-671, 2008.

MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Álcool e o fígado. **GED: gastroenterologia endoscopia digestiva**, v. 30, n. 4, p. 152-162, 2011.

MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 693-699, 2014.

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

MITTAL, J.; SHARMA, M. M.; BATRA, A. *Tinospora cordifolia*: a multipurpose medicinal plant- A review. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 2, n. 2, p. 32-47, 2014.

MONMA, C. A. et al. Estudo piloto: análise do fígado de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental e tratados com *Morinda citrifolia* (noni). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 4, p. 11-18, 2015.

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

MONTEIRO, W. R. Meliponicultura (criação de abelhas sem ferrão): A mandaçaia. **Mensagem Doce**, n. 57, 2000.

MORENO, M. I. N. et al. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 2, 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, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação celular: importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 389-399, 2000.

NETO, A. V.; MENEZES, C.; FONSECA, V. L. I. Meliponicultura em Mossoró-RN. **Mensagem Doce**, n. 112, 2011.

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

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

NUNES, F. V. A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* produzida no semi-árido nordestino**. 2018. 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

OLIVEIRA, A. V. C.; ROCHA, F. T. R.; ABREU, S. R. O. Falência hepática aguda e automedicação. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 27, n. 4, p. 294-297, 2014.

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

OLIVEIRA, L. P. G. et al. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sciences**, v. 217, p. 81-90, 2019.

OLIVEIRA, M. M. et al. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 146-157, 2015.

PANIS, C. et al. Revisão crítica da mortalidade por câncer usando registros hospitalares e anos potenciais de vida perdidos. **Einstein**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2018.

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

PEREIRA, D. S. et al. Phytotoxic potential of the geopropolis extracts of the jandaira stingless bee (*Melipona subnitida*) in weeds. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 876-884, 2017.

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.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAMANATHAN, V. S. et al. Hypervitaminosis A inducing intra-hepatic cholestasis: a rare case report. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, p. 324-325, 2010.

REBECCA, L. et al. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

RIBEIRO, M. F.; RODRIGUES, F.; FERANADES, N. S. A Mandaçaia (*Melipona mandaçaia*) e seus hábitos de nidificação na região do Pólo Petrolina (PE) – Juazeiro (BA). **Mensagem Doce**, n. 15, 2012.

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

RODRIGUES, M. N. et al. Morfologia e topografia do fígado e pâncreas de emas *Rhea americana*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 474-479, 2012.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSA, K. S. **Estudo comparativo do estado nutricional em pacientes cirróticos atendidos ambulatorialmente em um hospital de ensino**. 2015. 79f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SAID, R. A. **Atividade hepatoprotetora de diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico da própolis, nas intoxicações agudas por acetaminofen, em camundongos**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SALMANI, J. M. M. et al. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future prospectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 5, p. 0321-0329, 2017.

SALMINEN, W. F. et al. Green tea extract can potentiate acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1439-1446, 2012.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50-57, 2017.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SCHINONI, M. I. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 76, n. 1, p. 5-9, 2006.

SEM, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, M. Dual drug loaded liposome bearing apigenin and 5-Fluorouracil for synergistic therapeutic efficacy in colorectal cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 9-22, 2019.

SILVA, A. P. C.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; RIBEIRO, S. F. A. The role of *Mimosa* L. (Fabaceae) on pollen provision of *Melipona asilvai* Moure 1971 in a Caatinga area from Brazil. **Grana**, v. 57, n. 4, p. 311-321, 2018.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, D. V. et al. Abelhas-sem-ferrão e espécies vegetais com potencial apícola em quintais agroflorestais do acre. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 7. Luziânia: Diálogo e integração dos saberes em sistemas agroflorestais para sociedades sustentáveis. **Anais...** Luziânia-GO, 2009.

SILVA, F. R. G. et al. Phytochemical screening and *in vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 3, p. 452-459, 2019a.

SILVA, G. R. et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014a.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p. 30-33, 2007.

SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geopropolis de *Plebeia* aff. *flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-880, 2016.

SILVA, J. B. et al. Hepatoprotective and antineoplastic potencial of red propolis produced by the bees *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 744-756, 2019b.

SILVA, R. M. et al. Avaliação da regeneração hepática com dieta suplementada com ácidos graxos ômega-3: estudo experimental em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 42, n. 6, p. 393-398, 2015.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 7, p. 507-511, 2006.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 560-565, 2014b.

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

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002. 253p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007.

SOARES, N. P. et al. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, p. 991-1010, 2016.

SOETHE, C. et al. Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas 'Tupy' e 'Guarani' armazenadas a diferentes temperaturas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 8, p. 950-957, 2016.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, D. M. N. et al. Phytochemical screening, *in vitro* toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bee's geopropolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, p. 134-140, 2015.

SOUZA, A. S. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

SOUZA, R. S. et al. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 333-336, 2004.

SOUZA, S. A. et al. Characterization of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 549-558, 2018.

SOUZA, T. B. et al. Farmacogenética do desenvolvimento de anticorpos inibidores do fator VIII na hemofilia A. **Revista Científica da FMC**, v. 6, n. 1, p. 7-13, 2011.

SPIRA, G. et al. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

SULCZEWSKI, F. B. et al. Efeitos genotóxicos do extrato aquoso de avenca em linfócitos humanos. **Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2014.

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

TICE, R. R. et al. Sigle cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TONG, Y. et al. Effect of a hypoxic microenvironment after radiofrequency ablation on residual hepatocellular cell migration and invasion. **Cancer Science**, v. 108, n. 4, p. 753-762, 2017.

TRIVIÑO, T.; ABIB, S. C. V. Anatomia cirúrgica do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 407-414, 2003.

VENTURIERI, G. et al. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **Polinização no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: EDUSP, 2012. Cap. 11, p. 213-236.

VENTURIERI, V. G. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 2 ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 60p.

VIEIRA, L. M. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 521-527, 2015.

VILLAS-BÔAS, J. **Mel de abelhas sem ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2012. 96p.

VOLKART, P. A.; SPAGIARI, M. S.; BIZANI, D. Avaliação da susceptibilidade e resistência bacteriana aos agentes controladores do crescimento de uso hospitalar e industrial. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 21, n. 1, p. 25-32, 2017.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZHANG, Y. et al. Liquiritigenin protects rats from carbon tetrachloride induced hepatic injury through PGC-1 α pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

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.

ZILLA, M. K. et al. 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside isolated from *Podophyllum hexandrum* exhibits potential anticancer activities by altering Chk-2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 100-107, 2014.

CAPÍTULO II

4 POTENCIAL HEPATOPROTETOR, ANTINEOPLÁSICO E GENOPROTETOR DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR *Melipona subnitida* D. (MELIPONINAE) NO SEMIÁRIDO DO NORDESTE BRASILEIRO

Hepatoprotector, antineoplastic and genoprotector potential of geoprópolis produced by *Melipona subnitida* D. (Meliponinae) in the northeast brazilian

Artigo submetido ao periódico
JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH

Potencial hepatoprotetor, antineoplásico e genoprotetor da geoprópolis produzida por *Melipona subnitida* D. (Meliponinae) no semiárido do nordeste brasileiro

RESUMO: Objetivou-se avaliar o potencial hepatoprotetor frente as injúrias induzidas por acetaminofen, a atividade antineoplásica e genoprotetora do extrato hidroetanólico da geoprópolis produzida por *Melipona subnitida* D., na região semiárida do Nordeste brasileiro. Foram avaliadas a composição química e atividade antioxidante das seis amostras (A1, A2, A3, A4, A5, A6) de extrato hidroetanólico da geoprópolis. Foram avaliados o potencial hepatoprotetor através das análises bioquímica da função hepática, avaliação macroscópica, histológica e estereológica dos fígados em 04 grupos experimentais (G1- controle negativo, G2- 50 mg/kg de extrato hidroetanólico da geoprópolis, G3- 50 mg/kg de extrato hidroetanólico da geoprópolis e 600 mg/kg de acetaminofen, G4- 600 mg/kg de acetaminofen) constituídos por 06 roedores da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, com lesão hepática aguda induzida por acetaminofen. O potencial antineoplásico foi determinado pela avaliação do efeito citotóxico do extrato hidroetanólico da geoprópolis em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e fibroblastos de camundongos L929. O efeito genoprotetor foi analisado em linhagem celular de fibroblastos de camundongo L929. As amostras do extrato hidroetanólico da geoprópolis apresentaram 41 compostos fenólicos, distribuídos entre fenóis e flavonoides. Relata-se pela primeira vez, em geoprópolis de meliponídeos, a presença de lignan 4-demethyldeoxydophyllotoxin 4-O-glucopyranoside. As amostras A1, A2, A4, A5 e A6 apresentaram moderada atividade antioxidante expressas pelos valores de IC₅₀ igual a 82,50, 122,20, 98,80, 76,30 e 144,0, respectivamente, correlacionados com os elevados teores de fenóis e flavonoides totais que variaram entre $16,62 \pm 3,91$ a $28,46 \pm 1,73$ e $14,72 \pm 3,75$ a $32,22 \pm 4,43$, respectivamente. Os resultados dos níveis séricos das enzimas TGO e TGP dos ratos, indicaram que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. não causou hepatotoxicidade. Na avaliação macroscópica dos fígados, no grupo G3 foi possível constatar coloração marrom pálida e discreta hemorragia, no G4 presença de sufusões hemorrágicas na cápsula, contornos irregulares e acentuação do padrão lobular. Na histoarquitetura dos fígados verificou no G3 focos de hepatócitos tumefeitos, vacuolizados e necrosados, no G4 degeneração e necrose difusa de hepatócitos. Na estereologia, observou aumento no percentual de hepatócitos e sinusóides, bem como, redução de colágeno no grupo G3 em relação ao G4. O extrato hidroetanólico da geoprópolis apresentou efeito citotóxico contra linhagem celular HepG2 e fibroblastos-L929, após 72 h de exposição, com valores de IC₅₀ igual a 365,00 e 250,9 µg/mL, respectivamente. Também apresentou efeito genoprotetor, com percentuais de redução de genotoxicidade de 90,74%, 73,12% e 48,18%, nas concentrações de 500, 250 e 100 µl/mL do extrato, respectivamente. Conclui-se que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresenta composição química variada, elevados teores de fenóis e flavonoides totais, potencial hepatoprotetor contra lesões hepáticas agudas, efeito citotóxico em células neoplásicas e atividade genoprotetora, podendo ser um produto natural promissor na quimioterapia.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão. Genoproteção. Geoprópolis. Lesão hepática. Quimioterápico.

ABSTRACT: The objective was to evaluate the hepatoprotective potential against injuries induced by acetaminophen, the antineoplastic and genoprotective activity of the

hydroethanolic extract of the geopropolis produced by *Melipona subnitida* D., in the semiarid region of Northeast Brazil. The chemical composition and antioxidant activity of the six samples (A1, A2, A3, A4, A5, A6) of geopropolis hydroethanolic extract were evaluated. The hepatoprotective potential was evaluated through biochemical analysis of liver function, macroscopic, histological and stereological evaluation of the livers in 04 experimental groups (G1- negative control, G2- 50 mg/kg of hydroethanolic extract from geopropolis, G3- 50 mg/kg of hydroethanolic extract of geopropolis and 600 mg/kg of acetaminophen, G4- 600 mg/kg of acetaminophen) consisting of 06 rodents of the species *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, Wistar strain, with acute liver damage induced by acetaminophen. The antineoplastic potential was determined by evaluating the cytotoxic effect of the hydroethanolic extract of geopropolis in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell lines and fibroblasts from L929 mice. The genoprotective effect was analyzed in the L929 mouse fibroblast cell line. Samples of the geopropolis hydroethanolic extract showed 41 phenolic compounds, distributed between phenols and flavonoids. The presence of 4-demethyldeoxydopodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside is reported for the first time in a meliponid geopropolis. Samples A1, A2, A4, A5 and A6 showed moderate antioxidant activity expressed by IC₅₀ values equal to 82.50, 122.20, 98.80, 76.30 and 144.0, respectively, correlated with high levels of total phenols and flavonoids ranging from 16.62 ± 3.91 to 28.46 ± 1.73 and 14.72 ± 3.75 to 32.22 ± 4.43 , respectively. The results of the serum levels of the enzymes TGO and TGP of the rats, indicated that the hydroethanolic extract of the geopropolis of *M. subnitida* D. did not cause hepatotoxicity. In the macroscopic evaluation of the livers, in the G3 group it was possible to observe a pale brown color and slight hemorrhage, in the G4 the presence of hemorrhagic suffusions in the capsule, irregular contours and accentuation of the lobular pattern. In the histoarchitecture of the livers, in G3 it was found foci of tumefied, vacuolized and necrotic hepatocytes, in G4 degeneration and diffuse necrosis of hepatocytes. In stereology, there was an increase in the percentage of hepatocytes and sinusoids, as well as a reduction in collagen in the G3 group compared to G4. The hydroethanolic extract of the geopropolis showed a cytotoxic effect against HepG2 cell line and L929 fibroblasts, after 72 h of exposure, with IC₅₀ values equal to 365.00 and 250.9 µg/mL, respectively. It also had a genoprotective effect, with percentages of genotoxicity reduction of 90.74%, 73.12% and 48.18%, at concentrations of 500, 250 and 100 µl/mL of the extract, respectively. It is concluded that the hydroethanolic extract of the *M. subnitida* D. geopropolis presents varied chemical composition, high levels of total phenols and flavonoids, hepatoprotective potential against acute liver lesions, cytotoxic effect on neoplastic cells and genoprotective activity, being a promising natural product in chemotherapy.

Keywords: Stingless Bee. Genoprotection. Geopropolis. Hepatic lesions. Chemotherapy

INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas e neoplasias, como o hepatocarcinoma humano, constituem um dos maiores problemas de saúde de ordem mundial, contabilizando no Brasil, 30 mil mortes por ano com doenças hepáticas e 16,4% por câncer (KAMB, 2005; CARVALHO et al., 2014; MELO et al., 2017; PANIS et al., 2018). Ademais, o fígado é um órgão vital que

facilmente sofre lesões decorrentes de infecções virais, ingestão de álcool, ataques imunológicos, acúmulo hereditário de metal, parasitoses e uso excessivo de drogas para combater diversas doenças, especialmente pelo consumo de acetaminofen como antipirético (SPIRA et al., 2002; LOPES; MATHEUS, 2012; TONG et al., 2017). Além disso, sofre lesões devido a algumas atividades hepáticas, como a saturação das vias por detoxificação e a N-hidroxilação mediada pela via citocromo P450, que tornam as drogas mais tóxicas para o organismo e a exposição crônica a essas substâncias geralmente resulta na alteração da função orgânica, na diminuição do órgão e no aumento do tecido conjuntivo fibroso intra-hepático (MACÍAS et al., 2017). Com isso, a indústria farmacêutica tem se preocupado em desenvolver novas drogas hepatoprotetoras e antineoplásicas, com a finalidade de conseguir uma maior eficiência e disponibilizar ao consumidor uma variedade de medicamentos no mercado (SPIRA et al., 2002; ZHANG et al., 2008).

Nesse contexto, cresce o interesse por estudos relacionados ao efeito hepatoprotetor e antineoplásico de produtos naturais (KUMAZAWA et al., 2004; LORENZONI et al., 2014; SILVA et al., 2014; BERBECARU-IOVAN et al., 2016), pois segundo Miranda-Vilela et al. (2008), antioxidantes naturais podem diminuir o estresse oxidativo e consequentemente promover proteção contra danos no DNA. A própolis por apresentar uma composição química com altos teores de fenóis e flavonoides totais, que variam de acordo com a vegetação explorada, clima da área e espécie de abelha, no Brasil realiza-se várias pesquisas sobre o efeito protetor da própolis de *Apis mellifera* contra danos quimicamente induzidos no DNA, atividade hepatoprotetora e antineoplásica com nove diferentes própolis provenientes de Minas Gerais e São Paulo (CAMPELLO et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; PARK et al., 2004; ALMEIDA, 2009).

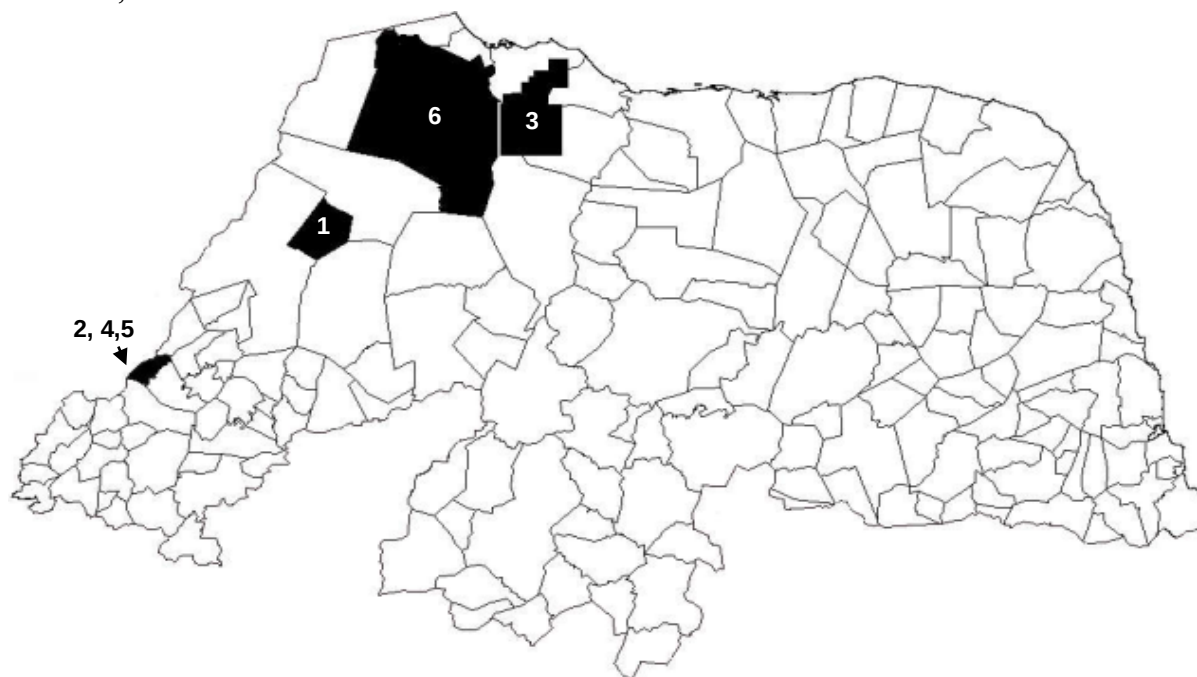
Entretanto, sabe-se que o Brasil apresenta grande biodiversidade de abelhas, dentre essas, as abelhas sem ferrão, que ocupam toda extensão da região semiárida do Nordeste brasileiro, e constitui fonte de renda para agricultura familiar, que comercializa a geoprópolis como produto terapêutico (LOPES et al., 2005). Com isso, torna-se importante realizações de pesquisas sobre atividades biológicas da geoprópolis, uma vez que possui substâncias bioativas com grande potencial antioxidante e genoprotetor, podendo o extrato hidroetanólico da geoprópolis de abelhas sem ferrão prevenir lesões as células hepáticas, quando submetidas a substâncias hepatotóxicas. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial hepatoprotetor, antineoplásico e genoprotetor da geoprópolis produzida pela abelha *Melipona subnitida* D. no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas da geoprópolis e identificação taxonômica da abelha

Seis amostra de geoprópolis da abelha jandaíra (A1, A2, A3, A4, A5 e A6) foram coletadas em abril de 2016, nos meliponários situados na zona rural dos municípios do Rio Grande do Norte: Felipe Guerra, São Francisco do Oeste, Pau dos Ferros, Serra do Mel e Mossoró (Fig. 1). O clima da região é do tipo semiárido, com temperatura média anual de 27°C, umidade relativa de 50% e precipitação média anual de 500 mm.

Figura 1 - Mapa do Rio Grande do Norte, demarcando os municípios de coleta das seis amostras de geoprópolis: Felipe Guerra- A1; São Francisco do Oeste- A2, A4 e A5; Serra do Mel- A3; Mossoró- A6



Fonte: Elaboração do autor (2020)

A geoprópolis foi coletada por raspagem das partes móveis da colmeia e acondicionadas em tubos plásticos estéreis e transportadas para o Laboratório de Patologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e mantidas em freezer sob temperatura de -20°C, até a produção dos extratos.

As abelhas mortas próximas à colmeia foram doadas pelos meliponicultores e coletadas, para realização da confirmação taxonômica da espécie, a qual foi feita pelo Prof. Dr. Michael Hrcir da UFERSA, conforme descrito por Fonseca et al. (2017).

Preparação do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D.

O extrato hidroetanólico da geoprópolis foi produzido no Laboratório de Patologia Veterinária da UFERSA, seguindo recomendações de Garcia et al. (2004). Foram pesadas 50 g de cada amostra da geoprópolis e colocadas em estufa de circulação de ar a 40°C por 48 h para secagem. Após foram maceradas a frio em liquidificador e diluídas em álcool de cereais na proporção de 1:5 (m/v), em frasco de vidro âmbar identificados. Durante 20 dias consecutivos de infusão, as amostras passaram por um processo de agitação manual (60 segundos). Para remoção do solvente, o material foi concentrado por rotaevaporizador a 40°C e secados em estufa a 37°C por 24 h. Para a determinação do extrato seco, as amostras de extratos hidroetanólicos foram evaporadas em nitrogênio e pesadas, obtendo concentrações para cada amostra: A1 65,80 mg/mL, A2 35,20 mg/mL, A3 15,20 mg/mL, A4 44,60 mg/mL, A5 63 mg/mL e A6 46 mg/mL.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Cromatografia líquida de alta eficiência: HPLC/DAD

Foram utilizadas seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., as quais foram diluídas em metanol HPLC para obtenção da concentração de 1 mg/mL, em seguida filtradas em filtro 0,45 µm e injetado uma alíquota de 10 µL de cada amostra para análise em um cromatógrafo HPLC HP 1260 (Agilent Technologies) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) a 40°C. Os solventes usados foram H₂O 0,1%, ácido acético (A) e MeOH HPLC (B), com gradiente de concentração B: 0-80 min., 10-20%; 10-60 min., 20-40%; 20-40 min., 40-60%; 40-20 min., 60-80%; 47-0 min., 80-100%; 50-0 min., 100%. O fluxo foi estabelecido em 1.000 mL/min e a temperatura da coluna em 40°C. O detector DAD foi ajustado para detecção em 210 e 400 nm.

Espectrometria de Massas: HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Os constituintes das amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. foram caracterizados através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS/MS, conforme metodologia descrita por Ferreira et al. (2017a). 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. 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. Utilizou como gás nebulizador o nitrogênio, auxiliado 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 contra-corrente 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 ions e os números de MS para obter os espectros médios de MS foram estabelecidos em 30 e 3 MS, respectivamente.

A identificação dos constituintes foi realizada por espectros de ultravioleta e massa, com base nas referências citadas na Tabela 1. Os espectros de UV foram compatíveis com flavonas ($\lambda_{\text{max}} \approx 265$ e 330nm), flavonóis ($\lambda_{\text{max}} \approx 270$ e 360nm) e chalconas ($\lambda_{\text{max}} \approx 370$ nm) (FERREIRA et al., 2017a, b).

Determinação de fenóis e flavonoides totais

A determinação da concentração de fenóis totais nas seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., 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 1 mL de água destilada, ao qual foram adicionados 160 µL do Folin-Ciocalteu e 240 µL de solução saturada de carbonato de sódio, e o volume final completado com água destilada para 2 mL. Em seguida foi feito a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 760 nm, sob temperatura de 24,6°C.

Para os ensaios com as amostras de extratos hidroetanólico, em triplicatas adicionou 10 µL de cada extrato a 1 mg/mL, foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada. Em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos para a construção da curva de calibração (WOISKY; SALATINO, 1998).

A determinação da concentração de flavonoides totais nas seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., 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 2 mL. Em seguida foi feito a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 420 nm, sob temperatura de 23,7°C.

Para os ensaios com as amostras de extratos hidroetanólicos, em triplicatas adicionou 50 µL de extrato a 1 mg/mL, em seguida, foram realizados os mesmos procedimentos para a construção da curva de calibração (WOISKY; SALATINO, 1998).

Atividade antioxidante pelo método DPPH

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Mensor et al. (2001). Para tanto, adicionou 400 µL dos extratos hidroetanólicos das amostras na concentração de 1 mg/mL, em triplicatas. Em seguida, com 2 min. 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 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. e realizado a leitura da absorbância em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 2.06.10), com espectrofotometria UV-visível a 517 nm, 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 abaixo (NIEVA MORENO et al., 2000; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

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

Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmos foram analisados em ELISA Synergy H1 microplate reader absorbance, (Software Version 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).

ATIVIDADE HEPATOPROTETORA *IN VIVO*

Local e animais da pesquisa

A pesquisa foi realizada em parceria com a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), desenvolvida no Biotério Central, utilizando 24 roedores da espécie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, com 45 dias de idade pesando aproximadamente 160-200 g. Os animais foram divididos em 04 grupos e acondicionados em caixas (04 animais por caixa) confeccionadas com policarbonato, forradas com maravalha e mantidos em sala com ciclo de luz de 12 h, aeração, exaustão e climatização controladas (23°C), recebendo ração balanceada (Purina) e água *ad libitum*.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UERN, e aprovado na CEUA/UERN com número de protocolo 006/15.

Indução de lesão hepática aguda

As administrações de água, extrato hidroetanólico de geoprópolis e acetaminofen ocorreram por gavagem. Durante oito dias consecutivos administrou-se água potável e extrato hidroetanólico da geoprópolis, sendo no oitavo dia administrado o acetaminofen 1 h após a administração de água potável e extrato.

Os animais foram divididos em 04 grupos constituídos por 06 animais: G1 (Controle Negativo): água potável; G2: 50 mg/kg de extrato hidroetanólico da geoprópolis; G3: 50 mg/kg de extrato hidroetanólico da geoprópolis, junto a última administração (1 h após), receberam uma dose 600 mg/kg de acetaminofen (200 mg/mL, Paracetamol, EMS S/A, Brasil); G4: (Controle positivo): água potável, junto à última administração (1 h após), receberam uma dose 600 mg/kg de acetaminofen (200 mg/mL, Paracetamol, EMS S/A, Brasil). Para administração dos extratos hidroetanólicos de *M. subnitida* D., foi feito um pool com as seis amostras de extrato na concentração de 45 mg/mL.

Os animais foram pesados no primeiro e último dia da administração e suas características físicas foram monitoradas diariamente. A metodologia de aplicação do acetaminofen e extrato baseou-se em Silva et al. (2014) e Said (2001).

Coleta de sangue e eutanásia

Após 48 h à última administração do extrato hidroetanólico e acetaminofen, os animais foram anestesiados com uma dose Cetamina (10 mg/kg, i.p.) e Xilazina (10 mg/kg, i.p.). Constatado o plano anestésico, realizou-se a celiotomia sobre a linha alba, para acesso à veia hepática. Com uma seringa e agulha 0,30 x 0,70 mm, 3 mL de sangue de cada animal foi coletado. O sangue foi acondicionado em tubos de ensaio contendo EDTA como anticoagulante e acondicionado em caixas térmicas e enviado ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFRSA para realização das análises bioquímicas.

A eutanásia foi realizada por exsanguinação, nos animais anestesiados com cetamina, associado a xilazina, via intraperitoneal, conforme a Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA (2015).

Exame anatomopatológico

Constatado o óbito, os animais foram submetidos à necropsia utilizando a técnica proposta por Vasconcelos (1996), com exame externo do animal. A análise anatomopatológica do fígado foi realizada sob observações das alterações: tamanho, coloração, consistência, contornos, presença de hemorragias e necrose.

Análise bioquímica da função hepática

Foram determinados nas amostras de soro sanguíneos os marcadores de lesão hepática: alanina aminotransferase (TGP), aspartato aminotransferase (TGO), albumina, proteína total (PT), glicose e triglicerídeo total, utilizando reagentes comerciais VIDA Bioteconologia®, em seguida submetidas à leitura em aparelho analisador bioquímico automático (BIOPLUS 2000) por meio de espectrofotometria.

Exame histopatológico

Os fígados de todos os animais experimentais foram lavados 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 5 μ de espessura, corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Os 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.

Esterologia

Estudo esterológico do fígado foi realizado seguindo um padrão de amostragem aleatório, uniforme e sistemático (SUR) conforme descrito por Marcos et al. (2012). Os fragmentos hepáticos foram selecionados aleatoriamente e submetidos a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina e corados com hematoxilina e eosina. De cada fragmento foram obtidas duas secções de 5 μ m 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.), considerando os hepatócitos, os sinusóides e colágeno.

Análise estatística

Os dados obtidos dos parâmetros bioquímicos séricos e estereológicos (hepatócitos, sinusóides e colágeno), foram expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão, bem como valores mínimos e máximos através da estatística software SAS versão 8.0. A influência das concentrações da geoprópolis (matéria seca) na atividade antioxidante, em fenóis e flavonoides totais foi determinada pela correlação de Spearman. Após análise dos pressupostos paramétricos, as diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais foram obtidas pela análise de variância (One-Way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os dados percentuais tiveram uma transformação no arco-seno $\sqrt{x}$. Quando a distribuição gaussiana foi interrompida, os valores foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Avaliação do efeito citotóxico em células neoplásicas

A atividade antineoplásica do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., foi realizada no Laboratório BiotechCell e avaliada pelo ensaio de redução do tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) em linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Para comparação e avaliação do efeito seletivo da citotoxicidade, foi utilizada uma linhagem celular saudável (fibroblastos-L929), de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983).

As substâncias testes, foram ensaiadas em nove diferentes concentrações: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625, 1,953125, 0,9765625 $\mu\text{g/mL}$. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $0,1 \times 10^5$ células/mL. As células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media; GIBCO®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução composta dos antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$).

As placas de 96 poços foram incubadas a 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, as amostras do extrato hidroetanólico e o controle negativo (DMSO) foram adicionadas às culturas celulares. Após o período de exposição (24 h), foi adicionado a cada poço 50 μL de solução de MTT (1 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂ por 3 h e logo após a solução de MTT foi removida e o precipitado de formazan foi ressuspensionado em 100 μL de DMSO. Utilizou-se como controle positivo o fármaco Doxorrubicina, utilizado na quimioterapia do câncer.

Para a quantificação do 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 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.

A partir dos dados da viabilidade celular foi determinado a IC₅₀, que corresponde à concentração da amostra capaz de induzir 50% de citotoxicidade. As IC₅₀ obtidas para HepG2 e fibroblastos-L929 foram comparadas entre si e com IC₅₀ da Doxorrubicina.

Avaliação do potencial genoprotetor

A amostra de extrato hidroetanólico foi encaminhada ao Laboratório BiotechCell, onde foi avaliado o efeito genotóxico e genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. através da análise do ensaio Cometa Alcalino.

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 h 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. Para análise dos efeitos anti-genotóxicos das amostras testes, as culturas celulares foram co-tratadas com concentrações crescentes das amostras testes (100, 250 e 500 µg/mL) e H₂O₂ (150 µM) durante 2 h 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, 10 mM Tris, 1% N-Laurilsarcosina, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), abrigada da luz a 4°C por no mínimo 1 h.

Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 min. Posterior a esta etapa, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com uma solução alcalina a 4°C (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH>13,0). As lâminas repousaram por 20 min. 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 min. Todos esses procedimentos foram realizados na ausência de luz. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 min. e fixadas em etanol a 100%. Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio (20 µg/mL). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. Foram analisados 100 cometas por lâmina (LOVELL et al., 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 H_2O_2 (50 μ M por 2 h de exposição) foi calculado de acordo com Waters et al. (1990), segundo a fórmula: %Redução = $(A-B/A-C) \times 100$. Onde A corresponde ao ID induzido pelo H_2O_2 , B corresponde ao ID induzido pelo tratamento anti-genotóxico (H_2O_2 + amostra teste) e C corresponde ao ID atribuído ao controle negativo (água destilada).

Análise estatística

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

Identificação taxonômica da abelha

Identificou-se características anatômicas específicas da espécie *M. subnitida* D., a presença de coloração ferrugínea da pilosidade do tórax, contrastando com a cor preta do tegumento do abdômen e cabeça, manchas subnitidas nos segundo e terceiro tergito metassomal, cabeça de operária completamente escura e uma mancha em formato de “W” invertido no clipeo de zangões, conforme descrito por Fonseca et al. (2017).

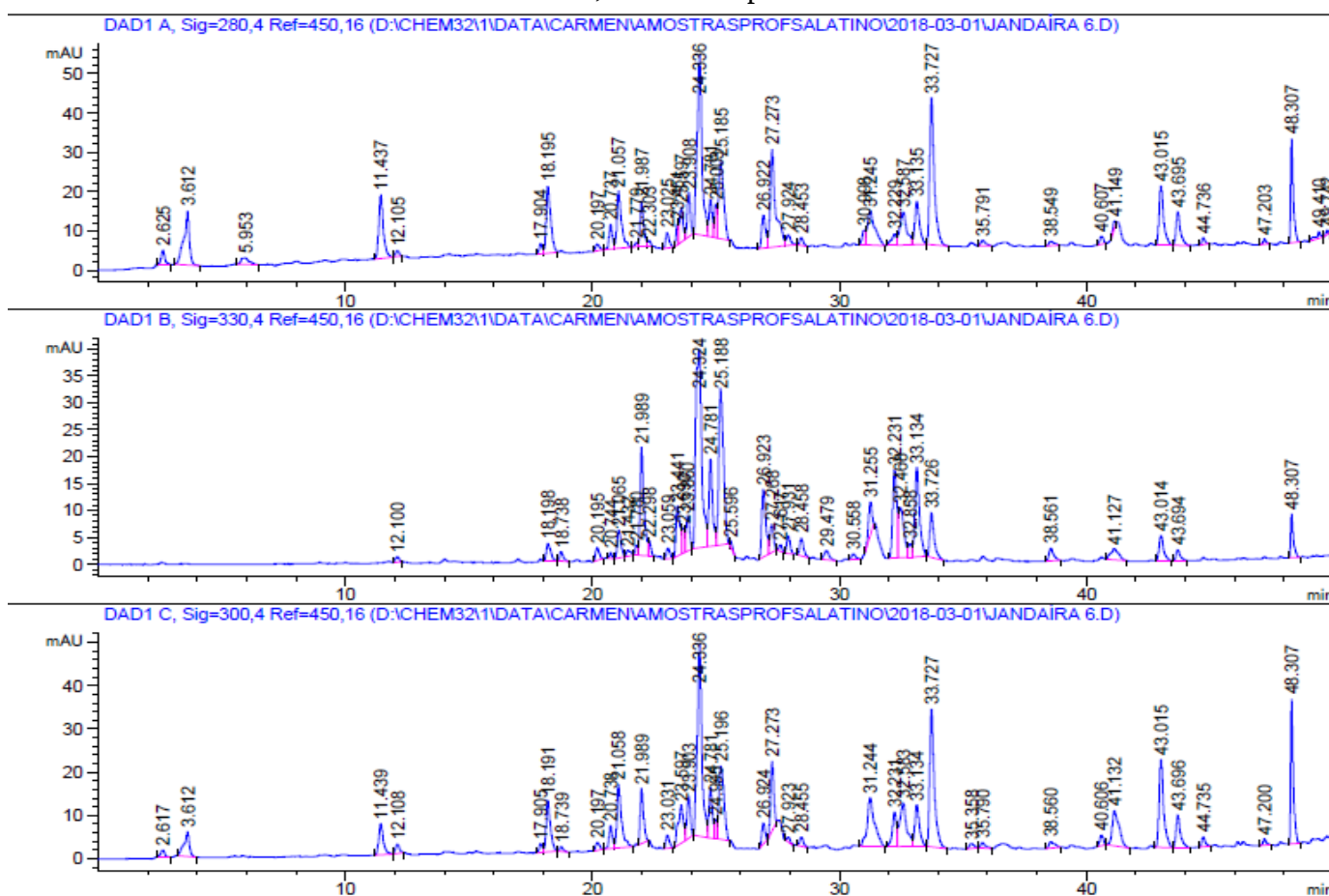
COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Compostos fenólicos detectados por HPLC-ESI-MS/MS em extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D.

As amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., oriundas dos meliponários da região semiárida do Rio Grande do Norte, demonstraram o mesmo perfil químico, contendo 41 compostos fenólicos, distribuídos entre fenóis e flavonoides, este último, sendo chalconas, flavonas e flavonóis. Dentre estes, os principais constituintes detectados são: éteres de flavonóis e metil, metoxi-chalconas, ácidos benzóicos glicosídeos e derivados do ácido cumárico. A presença de lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside é relatada pela primeira vez em geoprópolis neste estudo (Tab. 1).

Apigenina é o constituinte com maior pico no tempo de retenção indicado em todas as amostras de extrato hidroetanólico analisadas em HPLC/DAD (Fig. 2).

Figura 2 - Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. oriundos do semiárido do Rio Grande do Norte, analisados por HPLC-DAD



Fonte: Elaboração do autor (2020)

Tabela 1 - Constituintes detectados nas seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. oriundos do semiárido do Rio Grande do Norte

Rt	UV nm	(+) ESI-MS/MS m/z	(-) ESI-MS/MS m/z	Identificação	Referências
11.3	260, 375		[M - H] ⁻ – 255 MS/MS – 135	4,2',4'-trihydroxy chalcone – isoliquiritigenin	Li et al. (2017), Sun et al. (2017), Smoluch et al. (2014)
12.6	255, 360	[M + H] ⁺ - 303	[M - H] ⁻ - 301	quercetin	Ferreira et al., (2017 a,b), Brito et al. (2014), Pellati et al. (2013), Wang et al. (2017)
13.8	255, 360	[M + H] ⁺ - 317 MS/MS – 302	[M - H] ⁻ – 315 MS/MS – 300	isorhamnetin - (3'-methoxyquercetin)	Bruto et al. (2014), de Oliveira Dembogurski et al. (2018)
14.5	255, 360	[M + H] ⁺ – 287	[M - H] ⁻ – 285	kaempferol	Wang et al. (2017), Mahfoudhi et al. (2014), Falcão et al. (2013)
15.1	255, 360	[M + H] ⁺ - 301	[M - H] ⁻ – 299 MS/MS – 285	4'-O-methyl kaempferol - Kaempferide	Souza et al. (2013), Mahfoudhi et al. (2014), de Oliveira Dembogurski et al. (2018)
15.7	370	[M + H] ⁺ - 317 MS/MS – 302 (70), 197 (100)	[M - H] ⁻ – 315 MS/MS – 300	4,5',6'-trihydroxy-2',4'-dimethoxy chalcone	Ferreira et al. (2017a, b), Zhang et al. (2011), Li et al. (2017)
16.0	260-360	[M + H] ⁺ – 317 MS/MS – 302	[M - H] ⁻ – 315 MS/MS -300	Rhamnetin (7-O-methylquercetin)	Wang et al. (2017), de Oliveira Dembogurski et al. (2018), Souza et al. (2013)
16.4	270-340	[M + H] ⁺ - 271	[M - H] ⁻ – 269	apigenin	Wang et al. (2017), Mahfoudhi et al. (2014), Brito

					et al. (2014), Falcão et al. (2013)
16.6	270-340	[M + H] ⁺ - 301 MS/MS - 286	[M - H] ⁻ -299 MS/MS -284	chrysoeriol (5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone	Jamzad et al. (2003), Zhang et al., (2011), Facundo et al. (2012)
18.2	ND		[M - H] ⁻ -355 MS/MS – 151	mandelic acid acetyl glucoside	Songsong et al. (2015), Fukuda et al. (2003)
19.0	270-340	[M + Na] ⁺ – 353 [M + H] ⁺ – 331 MS/MS – 316 (100), 298 (40)	[M – H] ⁻ – 329 MS/MS – 314	cirsiliol (5,3',4'-trihydroxy-6,7-dimethoxyflavone)	Jamzad et al. (2003)
19.9	260-360	[M + H] ⁺ – 361 MS/MS - 346 (100), 328 (50)		myricetin 3,7,3'-trimethyl ether;	Kranjc et al. (2016), Zhang et al. (2011)
21.1	270-345	[M + H] ⁺ – 315 MS/MS – 300	[M - H] ⁻ -313	cirsimaritin	Guo et al. (2019)
21.9	260-360	[M + H] ⁺ - 331 MS/MS - 316		quercetin dimethyl ether	Mahfoudhi et al. (2014), Ferreira et al. (2017a, b), Falcão et al. (2013)
22.4	260-360	[M + H] ⁺ – 315 MS/MS – 300	[M - H] ⁻ -313 MSMS – 298	kaempferol dimethyl ether	Falcão et al., (2013), Mahfoudhi et al. (2014)
27.0	290		[M - H] ⁻ -271	naringenin	Singh et al. (2019)
29.0	260-360		[M - H] ⁻ -283	3-O-methyl galangin or 5,7-dihydroxy-3-methoxy flavone	Tao et al. (2006) Falcão et al. (2013)
29.6	260-360	[M + H] ⁺ – 315 MS/MS – 300	[M - H] ⁻ -313 MSMS – 298	kaempferol dimethyl ether isomer	Falcão et al. (2013), Mahfoudhi et al. (2014)

29.7	260-360	[M + H] ⁺ - 331 MS/MS - 316	[M - H] ⁻ -329	quercetin dimethyl ether isomer	Falcão et al. (2013) Ferreira et al. (2017 a,b), Kranjc et al. (2016)
30.0	245 - 360	[M + H] ⁺ - 271 MS/MS – 253 (50), 161 (100), 137 (60)	[M - H] ⁻ -269	2',4' -dihydroxy-4-methoxychalcone	Sun et al. (2017), Smoluch et al. (2014)
30.5	370	[M + H] ⁺ – 287 MS/MS – 167 (100), 147 (80)	[M - H] ⁻ -285 MSMS – 165	4'-methoxy-2',6',4- trihydroxy chalcone	Ferreira et al. (2017a, b), Sun et al. (2017), Zhang et al. (2011), Smoluch et al. (2014)
32.5	260-360	[M + H] ⁺ – 345 MS/MS – 330 (100), 313 (50)	[M - H] ⁻ -343 MS/MS – 328 (100)	quercetin 3,7,3 -trimethyl ether also known as pachypodol	Kranjc et al. (2016)
38.5		[M + H] ⁺ – 341 MS/MS – 285 (100), 267 (100), 179 (70)	[M - H] ⁻ -339 MS/MS – 151	mandelic acid acetyl rhamnoside	Wang et al. (2017), Zahoor et al. (2018), Songsong et al. (2015), Fukuda et al. (2003).
39.8		[M + H] ⁺ – 547 MS/MS – 385, 367		4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside	Iida et al. (2010), Zilla et al. (2014)
40.3			[M - H] ⁻ – 423 MS/MS - 219	4-methoxy-3-prenyl benzoic acid acetylglucoside 1.	Taddeo et al. (2016), Quilez et al. (2010),
42.1	330 -350	[M + H] ⁺ – 579 MS/MS – 301		Kaempferol methyl ether coumaroyl arabinoside	Zhang et al. (2011)
43.4			[M - H] ⁻ – 407 MS/MS - 219	4-methoxy-3-prenyl benzoic acid acetyl rhamnoside	Mahfoudhi et al. (2014), Wang et al. (2017)

47.2	330	[M - H] – 341 MSMS - 297	4-O-vinyl-3,5-diprenyl coumaric acid	Taddeo et al. (2016), de Oliveira Dembogurski et al. (2018), Guzman (2014)
48.3	330	[M - H] – 343 MSMS - 299	4-O-ethoxy-3,5-diprenyl coumaric acid	Taddeo et al. (2016), de Oliveira Dembogurski et al. (2018), Guzman (2014)

Rt: tempo de retenção
Fonte: Elaboração do autor (2020)

Teores de fenóis e flavonoide totais

Dentre as seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., analisadas no presente estudo, as amostras A1, A4, A5 e A6 apresentaram elevados teores de fenóis totais. Entre as amostras A1 e A6, A4 e A5 não apresentaram diferença estatística. Quanto aos teores de flavonoides, entre as amostras A4 e A5, A1 e A6 se destacaram por apresentar altos teores de flavonoides totais, não havendo diferença significativa dos valores. A amostra A3 constitui-se o extrato com menores teores de fenóis e flavonoides totais (Tab. 2).

Atividade antioxidante

Os compostos fenólicos, as concentrações de massa seca, teores de fenóis e flavonoides totais e os baixos valores de IC₅₀ (%) presentes nas amostras A1, A2, A4, A5 e A6 do extrato hidroetanólico da geoprópolis, obtidas através do método fotolorimétrico do radical livre DPPH, indicam moderada atividade antioxidante, demonstrada pelos reduzidos valores de IC₅₀, que correlaciona-se aos elevados teores de fenóis e flavonoides totais das amostras (Tab. 2).

Tabela 2 - Média $\pm$ desvio-padrão dos teores de fenóis (%) (m/m) e flavonoides totais (mg/100g), atividade antioxidante (%) e concentrações de massa seca (mg/mL) de seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D., obtidas no semiárido do Rio Grande do Norte

Amostras	Fenóis Totais	Flavonoides	IC ₅₀	Massa seca
A1	25,37 $\pm$ 6,36AB	20,04 $\pm$ 5,22BC	82,50	65,80
A2	16,62 $\pm$ 3,91B	14,72 $\pm$ 3,75C	122,20	35,20
A3	5,08 $\pm$ 1,05C	0,36 $\pm$ 0,13D	662,70	15,20
A4	28,46 $\pm$ 1,73A	32,22 $\pm$ 4,43A	98,80	44,60
A5	28,3 $\pm$ 4,4A	24,88 $\pm$ 0,58AB	76,30	63,0
A6	20,91 $\pm$ 3,29AB	22,05 $\pm$ 2,79BC	144,0	46,0

A, B, C, D Médias seguida de letras maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$ – Kruskal-Wallis)

Fonte: Elaboração do autor (2020)

Análise bioquímica da função hepática

Entre os grupos G1, G2 e G3 os valores médios dos níveis séricos das enzimas TGO, TGP, glicose e triglicerídeos não apresentaram diferenças estatísticas significativas e permaneceram dentro dos valores de referência. No G4 esses valores aumentaram significativamente, TGO e TGP obtiveram níveis acima dos valores de referência indicados, enquanto que triglicerídeos e glicose, aumentaram seus níveis, quando comparado com os grupos G1, G2 e G3 (Tab. 3).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos valores médios dos níveis séricos de albumina, proteínas totais e ureia entre G1, G2 e G3, permanecendo dentro dos valores de referência. No G4 observou-se uma redução desses valores médios, quando comparado a G1, G2 e G3 (Tab. 3).

Tabela 3 - Valores de média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar nos grupos experimentais G1 (Controle Negativo), G2 (extrato hidroetanólico da geoprópolis), G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen) e G4 (acetaminofen)

Grupos experimentais

Variáveis	G1	G2	G3	G4	Valores de referência (MELO et al., 2012)
TGO	138 $\pm$ 23,01b	111,8 $\pm$ 26,4b	109 $\pm$ 32,32b	267,75 $\pm$ 56,72a	81-180U/L
TGP	74,67 $\pm$ 9,81b	91,17 $\pm$ 10,55b	114,6 $\pm$ 26,52ab	144,0 $\pm$ 51,59aa	74-143U/L
Albumina	7,63 $\pm$ 0,19a	5,7 $\pm$ 0,24b	5,0 $\pm$ 0,25c	4,36 $\pm$ 0,32d	3,4-4,8g/dL
Ureia	58,2 $\pm$ 9,47a	55,17 $\pm$ 3,6ab	46,0 $\pm$ 5,13b	43,02 $\pm$ 9,36b	30-42mg/dL
Glicose	96,6 $\pm$ 17,02a	99,0 $\pm$ 15,82a	93,29 $\pm$ 10,58a	100,67 $\pm$ 10,35a	79-144mg/dL
Triglicerídeos	71,67 $\pm$ 12,95b	75,75 $\pm$ 29,67b	65,0 $\pm$ 23,13b	129,50 $\pm$ 24,56a	42-160mg/dL
PT	7,73 $\pm$ 0,48a	8,47 $\pm$ 0,21a	7,97 $\pm$ 0,58a	6,93 $\pm$ 0,65b	5,5-10,4g/dL

a,b,c Letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$).

TGO: Aspartato aminotransferase. TGP: Alanina aminotransferase. PT: Proteínas totais.

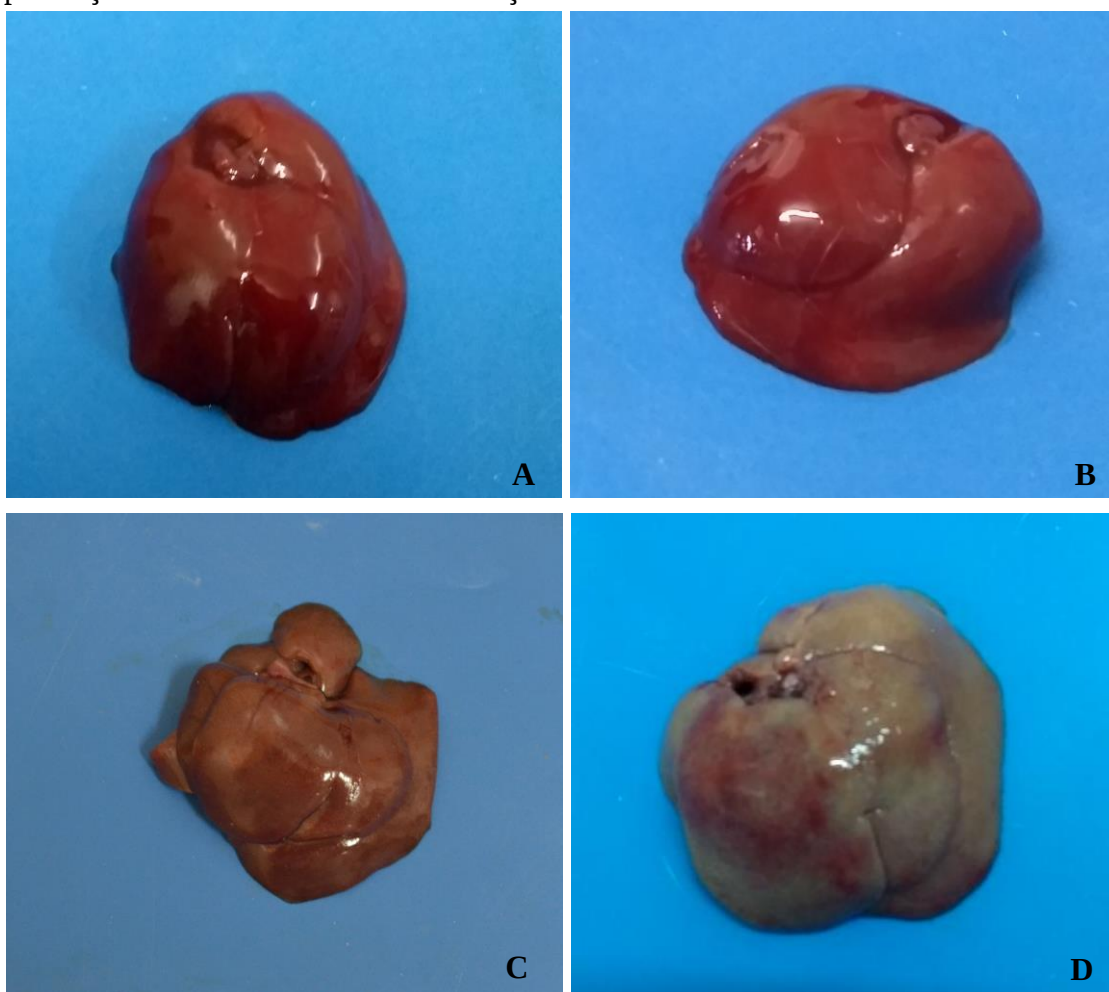
Fonte: Elaboração do autor (2020)

Exame macroscópico e histopatológico do fígado

Foi possível constatar que os animais dos grupos G1 e G2 apresentaram fígados com aspecto morfológico dentro da normalidade observada para a espécie, sem alterações anatômicas (Fig. 3 A, B). Nos fígados dos animais do grupo G3 foi possível constatar coloração marrom pálida e discreta hemorragia, evidenciada pela presença de pequenos pontos hemorrágicos na cápsula e parênquima do órgão (Fig. 3 C). Os animais do grupo G4 apresentaram fígado com presença de sufusões hemorrágicas na cápsula, contornos irregulares, consistência friável e na superfície de corte presença de áreas multifocais de coloração branco amarelada (Fig. 3 D).

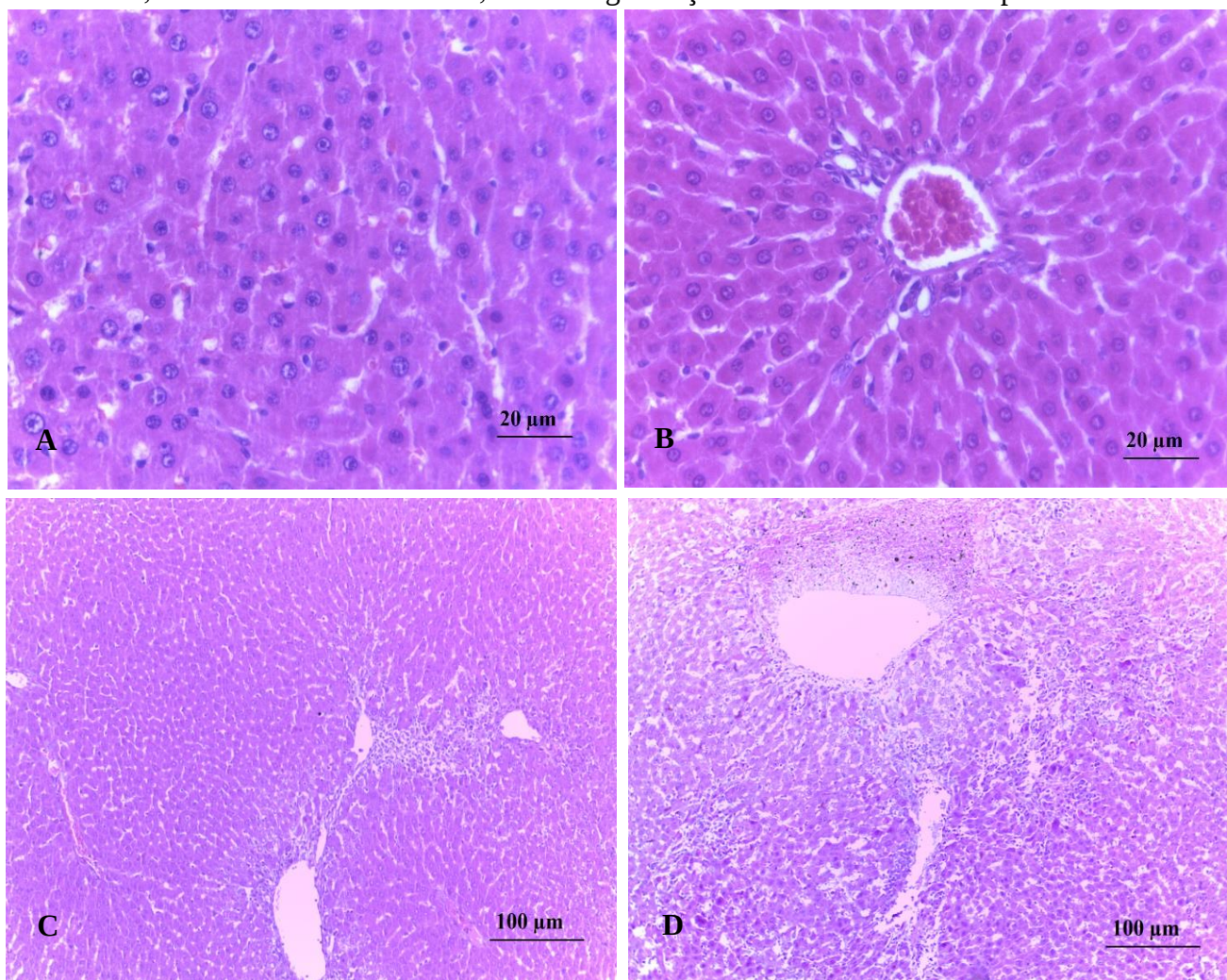
Na avaliação histopatológica, evidenciou-se que o tecido hepático dos animais dos grupos G1 e G2, não apresentaram alterações, demonstrando aspecto histopatológico normal (Fig. 4 A, B). Nos animais do grupo G3, o exame histopatológico revelou focos de hepatócitos tumefeitos, vacuolizados (degeneração hidrópica) e necrosados. Também foram constatados moderada dissociação dos cordões de hepatócitos e congestão de sinusóides (Fig. 4 C). As alterações histológicas foram mais intensas nos fígados dos animais do grupo G4, onde foi possível constatar perda do padrão arquitetônico do órgão, com presença de degeneração e necrose difusa dos hepatócitos, áreas de hemorragia, além de acentuada dissociação dos cordões de hepatócitos (Fig. 4 D).

Figura 3 - Fígados de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar nos grupos experimentais: A- G1 (Controle Negativo); B- G2 (extrato da hidroetanólico da geoprópolis); C- G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen); D- G4 (acetaminofen). Notam-se nos G1 e G2 fígados com aspecto morfológico normal, no G3 fígado com coloração marrom pálida e discreta hemorragia, no G4 presença de sufusões hemorrágicas na cápsula, contornos irregulares e na superfície de corte presença de áreas multifocais de coloração branco amarelada



Fonte: Elaboração do autor (2020)

Figura 4 - Fígados de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, nos grupos experimentais, corados com hematoxilina e eosina: A- G1 (Controle Negativo); B- G2 (extrato hidroetanólico da geoprópolis); C- G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen); D- G4 (acetaminofen). Nota-se no G1 e G2 arquitetura tecidual normal, no G3 focos de hepatócitos tumefeitos, vacuolizados e necrosados, no G4 degeneração e necrose difusa de hepatócitos



Fonte: Elaboração do autor (2020)

Estereologia

A análise dos tecidos hepáticos nos diferentes grupos experimentais, mostrou que não houve diferença estatística entre o percentual de hepatócitos e sinusóides hepáticos nos grupos G1, G2 e G3 (Tab. 4). O percentual de hepatócitos do G4 reduziu significativamente em relação aos demais grupos. Os percentuais de sinusóides diminuíram nos G3 e G4 em relação ao G1 e G2 (Tab. 4). 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 em relação aos G1 e G2. Quando realizado a

comparação entre os grupos G3 e G4, fica evidente que o percentual de colágeno do G3 foi significativamente inferior ao G4 (Tab. 4).

Tabela 4 - Valores de média $\pm$ desvio padrão da densidade de volume dos hepatócitos, sinusóides e colágeno nos fígados de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar nos grupos experimentais: G1 (Controle Negativo), G2 (extrato hidroetanólico da geoprópolis), G3 (extrato hidroetanólico da geoprópolis e acetaminofen) e G4 (acetaminofen)

Variáveis	Grupos experimentais			
	G1	G2	G3	G4
Hepatócitos	74,56 $\pm$ 6,12a	73,96 $\pm$ 6,89a	72,6 $\pm$ 3,42a	66,2 $\pm$ 9,69b
Sinusóides	22,84 $\pm$ 2,72a	21,95 $\pm$ 3,55a	18,76 $\pm$ 4,51b	11,5 $\pm$ 2,09c
Colágeno	6,04 $\pm$ 1,54c	6,1 $\pm$ 1,04c	8,47 $\pm$ 2,1b	12,96 $\pm$ 3,9a

a,b,c Letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística ($p < 0,05$)

Fonte: Elaboração do autor (2020)

Efeito citotóxico em células neoplásicas.

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresentou efeito citotóxico contra a linhagem celular HepG2 e fibroblastos-L929, após 72 h de exposição, não havendo diferença significativa entre as linhagens celulares (Tab. 5). Observou-se diferença significativa nos valores de IC₅₀ da Doxorrubicina em relação ao IC₅₀ de HepG2 e fibroblastos-L929, obtidos para o extrato hidroetanólico. Vale ressaltar que a Doxorrubicina é um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer e apresenta alta toxicidade e baixos valores de IC₅₀.

Tabela 5 - Valores da concentração inibitória (IC₅₀) promovidos pelo extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. e quimioterápico Doxorrubicina frente às linhagens celulares de fibroblastos-L929 e de hepatocarcinoma humano (HepG2) pelo ensaio MTT, após 72 h de exposição

Compostos	Linhagens celulares – IC ₅₀ μ g/mL	
	L929	HepG2
Extrato hidroetanólico da geoprópolis	250.9Aa	365,00Ab
Doxorrubicina	2,2645Ba	0,5491Bb

Valores de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%. a,b Letras minúsculas diferentes na linha significa diferença estatística. A, B Letras maiúsculas diferentes na coluna significa diferença estatística.

Fonte: Elaboração do autor (2020)

Potencial genoprotetor

A amostra do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. não exerceu efeito genotóxico em linhagem de fibroblastos de camundongo L929, uma vez que, em comparação entre as médias dos idDNA celular, em todas as concentrações testadas, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle negativo (água destilada). Contudo, ao comparar as médias dos idDNA da amostra do extrato hidroetanólico, com as do controle positivo (H_2O_2) verificou-se diferença estatística (Tab. 6), pois o H_2O_2 é utilizado como substância genotóxica padrão em exposições *in vitro* capaz de promover fragmentação no DNA.

Tabela 6 - Média $\pm$ desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D., após exposição de células da linhagem de fibroblastos de camundongo L929, por 24 h 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	10,00a $\pm$ 2,73	8,22a $\pm$ 3,23	5,66a $\pm$ 2,91	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 (2020)

Consoante aos resultados da Tabela 6, as amostras do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., em todas as concentrações avaliadas, apresentaram efeito genoprotetor em culturas fibroblastos de camundongo (L929) co-tratadas com as amostras teste e H_2O_2 , uma vez que, os percentuais de redução da genotoxicidade foram elevados e na maior concentração testada (500 $\mu\text{L/mL}$) obtiveram valor igual a 90,74% (Tab. 7).

Tabela 7 - Média $\pm$ desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa, para avaliação do efeito genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D., em células da linhagem de fibroblastos de camundongo L929, co-tratadas com três concentrações de amostras do extrato hidroetanólico da geoprópolis e peróxido de hidrogênio

Parâmetro analisados	Concentração do extrato ($\mu\text{L/mL}$)		
	500	250	100
% de redução da genotoxicidade	90,74 $\pm$ 4,03	73,12 $\pm$ 4,96	48,18 $\pm$ 9,27

Fonte: Elaboração do autor (2020)

DISCUSSÃO

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. é um produto natural promissor para a indústria farmacêutica, pois apresenta um perfil químico com ampla variedade de compostos fenólicos com propriedades terapêuticas. Os fenóis constituem uma parcela com 09 diferentes substâncias. Dentre os flavonoides, os flavonóis são importantes características químicas, com 14 diferentes substâncias dos constituintes químicos. Esses resultados corroboram com os estudos realizados no Rio Grande do Norte por Ferreira et al. (2017a), que utilizaram própolis verde como fonte de pesquisa e verificaram os flavonoides como constituintes abundantes nesse tipo de própolis, dentre os quais, flavonóis e chalconas aparecem em grande quantidade, quando comparado com os demais compostos. Nos espectros de massa de flavonóis éteres metílicos, flavonas éteres metílicos e metoxi chalconas, os grupos metoxilas foram confirmados por perdas de CH₃, produzidas por um ânion radical estável [M-H-15]•- (KRANJC et al., 2016; DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI et al., 2018).

Com exceção da naringenina e de alguns metil flavonóis, o perfil químico das seis amostras de extrato hidroetanólico da geoprópolis estudada apresenta pela primeira vez lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside, como também, exibiram um perfil semelhante de compostos fenólicos de uma amostra de geoprópolis de *Scaptotrigona* aff. *depillis* e de um novo tipo de própolis verde coletada no estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil, que possui *Mimosa tenuiflora* como fonte de resina (FERREIRA et al., 2017a, b). O mesmo ocorreu no espectro de pólen de *Melipona asilvai*, coletado ao longo de dois anos em uma região da Caatinga na Bahia, Brasil, que apesar da variedade de fontes florais registradas, foi possível identificar a preferência floral desta abelha pelo gênero *Mimosa* (SILVA et al., 2018). A presença de *M. tenuiflora* nessas geoprópolis e própolis acontece porque a indução de sua floração aumenta o suprimento e a coleta de pólen pelas abelhas no período de seca do ano, minimizando o efeito da escassez de alimentos nas colônias, indicando a importância das espécies desse gênero como fonte de recursos utilizados por estas abelhas (DOS SANTOS SILVA et al., 2015).

Portanto, podemos supor que *M. tenuiflora* é provavelmente uma fonte de resina da geoprópolis do semiárido do Rio Grande do Norte, pois de acordo com Paulino et al. (2011), o semiárido da região Oeste do Rio Grande do Norte é constituído por Caatinga hiperxerófila, com um pasto apícola composto por espécies medicinais como: *Myracrodruon urundeuva*, *Zizyphus joazeiro*, *Anadenanthera columbrina*, *Anacardium occidentale* e *M.*

tenuiflora (Willd.) Poir., com predominância de *M. tenuiflora* (Willd.) Poir., devido ser uma espécie resistente à seca, cresce com muita facilidade em solos rasos e possui grande potencial forrageiro, portanto, é uma planta bem estabelecida em instalação de plantios homogêneos de espécies florestais nessa região (RIEGELHAUPT; PAREYN, 2010).

Apesar da semelhança do perfil químico nas amostras de geoprópolis, é possível haver variações nos valores de fenóis e flavonoides totais, tal como foi visto no presente estudo, o qual demonstrou na amostra A3 baixos valores. Contudo, esses valores não indicam redução na qualidade da geoprópolis da região, apenas demonstram uma variação de predileção da abelha pela espécie vegetal em locais distintos dentro da região semiárida do Rio Grande do Norte. Esse comportamento foi relatado por Souza et al. (2013, 2018) e Silva et al. (2014), com amostras de geoprópolis coletadas no estado da Paraíba, observaram que as abelhas *M. subnitida* D. coletam a resina de espécies vegetais mais próximas da colmeia, mesmo em ambiente com rica diversidade de fontes vegetais, como o semiárido nordestino, assim exibem um perfil semelhante de compostos fenólicos, com variações nos teores de fenóis e flavonoides totais, podendo em algumas amostras ocorrer uma redução de compostos químicos em sua composição.

Uma triagem fitoquímica de um extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. revelou a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóis, flavonas, xantonas e triterpenos pentacíclicos livres (SOUSA et al., 2015). Fenilpropanóides, hexosídeos de galoílo, ácido elágico, acil-(cinaminoil/coumaroil)-hexósidos, acil-(cinaminoil/coumaroil)-galoil-hexosídeos e flavonóides, 7-O-metil naringenina, 7-O-metil aromadendrina, 7,4'-di-O-metil aromadendrina, 4'-O-metil-caempferol, 3-O-metil-quercetina, 5-O-metil-aromadendrina e 5-O-metil-kaempferol e flavonóides O-glicósidos acilados foram detectados em geoprópolis de *M. subnitida* D. coletado no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, que exibia potencial atividades antioxidantes e antinociceptivas (SOUZA et al., 2013, 2018; SILVA et al., 2014).

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, promovendo proteção contra danos no DNA e atividade hepatoprotetora (MIRANDA-VILELA et al., 2008; ALMEIDA, 2009). A capacidade sequestrante do radical DPPH é representada pelos valores de IC₅₀ (%) das amostras comparados com os de quercetina pura, cujo valor é de 12,3. Segundo a classificação da escala de qualidade da atividade antioxidante proposta por Melo et al. (2010), um produto natural é considerado com atividade antioxidante boa quando

$IC_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$, moderada $65 \mu\text{g/mL} < IC_{50} < 152 \mu\text{g/mL}$ e baixa atividade $IC_{50} > 152 \mu\text{g/mL}$. Portanto, seguindo essa classificação, os resultados sugerem que as amostras A1, A2, A4, A5 e A6 apresentam moderada capacidade sequestrante do radical DPPH. Tais dados corroboram com várias pesquisas, que mostraram como resultados a atividade antioxidante sendo correlacionada aos teores de fenóis e flavonoides totais, ou seja, quanto maior for os teores na amostra, maior será a atividade antioxidante exercida (CASTRO et al., 2007; CABRAL et al., 2009; DA SILVA et al., 2013).

Resultados semelhantes foram descritos por Ferreira et al. (2017a) com própolis verde e Silva et al. (2019) com própolis vermelha no semiárido do Rio Grande do Norte, os quais apresentaram valores IC_{50} (%) igual a $56,2 \pm 0,4$ a $72,9 \pm 0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $61,04 \pm 0,31$ a $129,10 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, demonstrando uma atividade antioxidante variando de boa a moderada. Diferentemente dos resultados obtidos em pesquisas realizadas no Rio Grande do Norte, no estado do Pará, a geoprópolis de duas espécies de meliponídeos apresentaram baixa atividade antioxidante ($0,20$ e $0,21 \text{ mmol/L}$) e, apenas uma espécie apresentou boa atividade antioxidante ($2,75 \text{ mmol/L}$) (LIMA, 2015). No estado de Sergipe a própolis vermelha obteve baixa atividade antioxidante com valores de IC_{50} igual a $270,13 \pm 24,77 \mu\text{g/mL}$ (FROZZA et al., 2013). Tais resultados demonstram que a ecologia de cada região interfere nos teores de fenóis e flavonoides totais da própolis (CARDINAULT et al., 2012; NUNES; GUERREIRO, 2012), podendo os meliponicultores realizar um manejo florestal com espécies vegetais com potencial medicinal, tais como, *M. urundeuva*, *Z. joazeiro*, *A. columbrina*, *A. occidentale* e *M. tenuiflora* (Willd.) Poir., para se obter uma geoprópolis com melhor qualidade nas propriedades medicinais (PAULINO et al., 2011).

Apesar dos meliponicultores da região de coleta das amostras de geoprópolis estudada não realizarem manejo florestal adequado do pasto apícola, os resultados demonstraram que nos grupos G1, G2 e G3, o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. promoveu um efeito hepatoprotetor frente a administração do acetaminofen, que segundo Lopes e Matheus (2012), é uma droga com alta hepatotoxicidade capaz de aumentar a atividade das enzimas TGO e TGP, elevar os níveis séricos de triglicerídeos e glicose, como também, reduzir os níveis séricos de albumina, PT e ureia, concomitante destrói a arquitetura tecidual, demonstrado em dados macroscópicos e histológicos (SAID, 2001; BHADARIA et al., 2007), semelhante ao ocorrido com o grupo G4.

Os resultados da presente pesquisa corroboram com os já descritos na literatura. Bhadaria et al. (2007) com extrato etanólico da própolis de *A. mellifera* na Índia, utilizaram tetracloreto de carbono (CCl_4), na dose de $0,15 \text{ mL/kg}$, via intraperitoneal, como indutor de

lesão hepática em ratos albinos Sprague-Dawley. Nesse estudo, as análises bioquímicas e histopatológicas representaram eficácia hepatoprotetora do extrato de própolis contra lesão subcrônica induzida por CCl₄. A administração da própolis ocorreu por cinco dias, o que foi suficiente para reverter alterações bioquímicas no sangue, ou seja, a própolis mostrou 60,26% e 35,15% de proteção no nível de açúcar no sangue e no conteúdo sérico de proteínas, respectivamente e 80% de recuperação das enzimas TGO e TGP, bem como, manteve o padrão lobular normal com hepatócitos poligonais bem formados com núcleo conspícuo, demonstrando uma histoarquitetura normal do fígado, diferentemente do que ocorreu com o grupo que recebeu somente CCl₄, o qual apresentou intensas lesões teciduais, evidenciadas por necrose hepática maciça, com alguns hepatócitos sobreviventes, grande vacuolização, degeneração e desintegração da arquitetura das células hepáticas, ocasionando lesões subcrônicas no fígado, conforme ação esperada pelo agente.

Outra pesquisa realizada no Himalaia com extrato etanólico de própolis nas doses de 200-400 mg/kg, via oral, como hepatoprotetor em roedores estressados com hepatoxina isoniazida e a rifampicina (INH-RIF) na dose de 100 mg/kg, via intraperitoneal, conferiu a hepatoproteção do extrato de própolis durante administração por 14 dias. A ação tóxica de INH-RIF causa necrose hepatocelular evidente, congestões de espaços sinusoidais na área centrolobular, esteatose e inflamação, alterando a arquitetura tecidual normal do fígado. Contudo, a administração do extrato etanólico da própolis, juntamente com INH-RIF, promoveu redução significativa no conteúdo de TGO, TGP e triglicerídeos e elevação nos níveis de proteínas plasmáticas e outros parâmetros bioquímicos ao normal, demonstrando notável atividade hepatoprotetora, como também impediu algumas anormalidades histopatológicas induzida por INH-RIF, estimulando uma recuperação acentuada do tecido. O autor atribui as lesões celulares hepáticas aos metabólitos reativos de oxigênio e da peroxidação lipídica (WALI et al., 2015). De acordo com Graham et al. (2004) a acetil-hidrazina, liga-se covalentemente às membranas lipídicas do fígado e causa deterioração oxidativa dos lipídios, resultando no deslocamento do tecido adiposo nas células hepáticas.

A regulação dos níveis de biomarcadores de função hepática, a diminuição da peroxidação lipídica e atenuação do potencial de eliminação de radicais, frente a injúria de uma droga hepatotóxica, como o acetaminofen, é realizada devido a presença de flavonoides e ácidos fenólicos presentes no extrato de própolis ou geoprópolis, que propicia ao organismo a realizar uma boa atividade antioxidante, com isso, promovendo benefícios à saúde (WALI et al., 2015).

As enzimas TGP e TGO são encontradas, respectivamente, livre no plasma, citosol e mitocôndrias dos hepatócitos, por isso são consideradas hepato-específicas, pois em lesão hepatocelular ocorre elevação nos seus níveis séricos (JESUS et al., 2014). Hipóxia, acúmulo de lipídeos hepáticos, doenças bacterianas e virais, inflamações, neoplasias hepáticas e medicamentos podem induzir a lesão hepatocelular e a liberação dessas enzimas na corrente circulatória. O nível glicêmico sanguíneo é aumentado em lesões hepáticas, após o animal ser submetido a última refeição, devido os hepatócitos realizar glicólise a partir de aminoácidos e glicerol (LEITNER et al., 2010; BESSONE, 2010). O triglicerídeo pode sofrer um aumento no seu nível sérico em hepatopatias, devido o metabolismo lipídico ocorrer no fígado, sendo estes na forma de triglicerídeos, durante sua metabolização os hepatócitos hidrolisam os triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol, promovendo assim a remoção dos triglicerídeos (FERREIRA et al., 2003).

O fígado é o órgão responsável por sintetizar as proteínas plasmáticas e ureia, esta última é produzida a partir da amônia circulante, por isso casos de hipoalbuminemia ou redução de PT e ureia só acontecem quando 60 a 80% da função hepática já está comprometida. No caso da ureia, com o comprometimento extensivo da função hepática ocorre a diminuição da conversão de amônia em ureia (JESUS et al., 2014; THRALL et al., 2015).

A avaliação macroscópica e histológica dos fígados dos animais do G2 evidencia que a administração oral do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. não exerce hepatotoxicidade ao fígado, uma vez que apresentaram aspecto macroscópico e histopatológico normal, o que indica segurança de sua utilização na concentração de 45 mg/mL, sob dose de 50 mg/kg. Igualmente a esses resultados, Said (2001) testou o extrato aquoso e hidroetanólico da própolis de *A. mellifera* nas doses de 50-400 mg/kg de peso corporal, por via intraperitoneal, em camundongos da raça swiss, como hepatoprotetor frente a injúria de acetaminofen. O autor verificou, que não houve nenhuma alteração nos hepatócitos, assim como em toda arquitetura tecidual, demonstrando a hepatoproteção dos extratos em todas as doses testadas nos grupos tratados com os extratos aquoso e hidroetanólico da própolis, bem como nos grupos tratados com extratos aquoso e hidroetanólico da própolis e acetaminofen na dose mais alta (400 mg/kg). Diferentemente, ocorreu nos grupos tratados na dose de 50 mg/kg, nos quais foram observados necrose difusa, intensa hemorragia e vacuolização citoplasmática nos hepatócitos. O autor sugere que os extratos da própolis exercem atividade hepatoprotetora nas intoxicações por acetaminofen, em uma relação dose dependente, sendo mais efetiva em elevadas concentrações.

Ramadan et al. (2015), ao avaliarem o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico da própolis de *A. mellifera* na dose 500 mg/kg peso, não verificaram lesões histológicas significativas nos fígados dos *R. norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar que receberam o extrato etanólico da própolis junto a administração (i.p.) de D-GalN e LPS nas doses de 300 mg/kg e 30 µg/kg, respectivamente. O quadro histológico dos fígados desses animais mostrou a maioria dos hepatócitos íntegros, exceto por poucas células que apresentaram picnose.

Através da avaliação macroscópica, histológica e dos parâmetros bioquímicos séricos dos fígados é possível sugerir que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. analisado exerceu efeito hepatoprotetor, por inibir a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofen, uma vez que nos fígados dos animais do G3 foi possível constatar redução na intensidade das lesões degenerativas e necróticas que ocorrem nos hepatócitos, bem como, os valores médios dos níveis séricos das enzimas TGO, TGP, glicose, triglicerídeos, albumina, PT e ureia permaneceram dentro dos valores de referência.

Os resultados das pesquisas com própolis revelam um excelente potencial hepatoprotetor em injúrias hepáticas induzidas por qualquer agente tóxico. A macroscopia e histologia dos fígados no presente estudo, demonstraram um efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. mais pronunciado que as própolis de *A. mellifera*, uma vez que em uma dose menor (50 mg/kg) foi capaz de proteger o fígado da mesma maneira que a própolis de *A. mellifera* protegeu em doses mais elevadas (500 mg/kg). Portanto, a geoprópolis de *M. subnitida* D., pode se configurar um produto promissor contra hepatotoxinas.

A estereologia foi um outro método utilizado para avaliação do efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. no presente estudo, por ser um método que tem como objetivo interpretar o arranjo estrutural tridimensional interno com base na análise de cortes da estrutura que mostra apenas uma informação bidimensional. Por essa razão, o uso da estereologia em pesquisa é cada vez mais frequente, principalmente nos campos da patologia e neurociências (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Portanto, a redução do percentual de hepatócitos do G4 pode ser atribuído ao efeito lesivo do acetaminofen sobre essas células, enquanto que o maior valor do percentual de hepatócitos no G3 em relação ao G4 pode indicar que a geoprópolis protegeu os hepatócitos do efeito deletério do acetaminofen.

Silva et al. (2019), obtiveram o mesmo resultado com o extrato hidroetanólico da própolis vermelha de *A. mellifera*, coletada na região semiárida do Rio Grande do Norte,

frente a injúria causada por tioacetamida. As análises estereológicas no tecido hepático revelaram que no grupo tratado com extrato hidroetanólico da própolis e no grupo tratado com extrato e tioacetamida não houve redução nos percentuais de hepatócitos, cujos percentuais foram $77,47 \pm 3,18a$ e $64,60 \pm 0,50ab$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($77,64 \pm 5,91a$). Já no grupo tratado com tioacetamida apresentou diferença estatística ($55,68 \pm 3,70b$). Do mesmo modo, houve redução significativa no percentual de sinusóides no grupo tratado com tioacetamida ($9,78 \pm 4,78b$), já nos grupos controle, extrato e extrato + tioacetamida não diferiram significativamente, $19,01 \pm 5,01a$, $18,02 \pm 5,31a$ e $17,29 \pm 8,48a$, respectivamente. Quanto ao percentual de colágeno presente nas amostras de tecido hepático, foi observado que não houve diferença significativa nos grupos controle e extrato ($3,35 \pm 1,49a$ e $4,45 \pm 4,78a$). Nos grupo extrato + tioacetamida e grupo tioacetamida verificou-se aumento significativo do percentual de colágeno e diferença significativa em relação aos demais grupos, $18,11 \pm 7,98b$ e $34,54 \pm 5,22c$, respectivamente.

Resultado semelhante ocorreu com Costa (2018), com extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Partamona cupira*, oriundo da região semiárida do Rio Grande do Norte, utilizando também a tioacetamida como agente indutor de lesão hepática. Os resultados obtidos foram: grupo tratado com extrato hidroetanólico da geoprópolis e extrato + tioacetamida não houve redução nos percentuais de hepatócitos ($71,44 \pm 1,33ab$ e $62,64 \pm 7,49b$, respectivamente). Já no grupo tratado com tioacetamida apresentou diferença estatística ($48,56 \pm 3,76c$). Consoante ocorreu no percentual de sinusóides no grupo tratado com tioacetamida ($15,76 \pm 4,11b$), já nos grupos extrato e extrato + tioacetamida não diferiram significativamente ($23,0 \pm 1,83a$ e $18,8 \pm 3,09ab$, respectivamente). Os percentuais de colágeno corroboraram com os de hepatócitos e sinusóides, sendo possível observar que não houve diferença significativa nos grupos controle e extrato ($6,04 \pm 1,54c$ e $5,56 \pm 2,34c$). Nos grupos extrato + tioacetamida e tioacetamida verificou-se aumento significativo do percentual de colágeno, $19,56 \pm 6,45b$ e $37,68 \pm 6,7a$, respectivamente.

Os resultados de ambas pesquisas e da presente pesquisa com extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., indicam o uso da geoprópolis como ação profilática contra as drogas hepatotóxicas.

As alterações dos percentuais de sinusóides 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 com nutrientes 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 perda significativa de sinusóides culmina para um quadro de hipóxia hepática, agravando a fibrose e inibe o suprimento sanguíneo para os hepatócitos, acarretando a morte celular (MAEDA et al., 2008). A formação de fibrose ocorre devido as células de Kupffer secretar uma série de citocinas inflamatórias, que atuam nas células de Ito estimulando-a a produzir de maneira exacerbada o colágeno, resultando na formação de fibrose (FREITAS et al., 2014). Por essa razão, o grupo G3 e G4, sob ação do acetaminofen, apresentaram diminuição de hepatócitos e sinusóides, com consequente aumento de colágeno.

As alterações verificadas nos percentuais de colágenos, a morte de hepatócitos e acentuada alteração da relação entre os elementos estruturais que compõe o fígado, refletem as mudanças histológicas ocorridas no tecido hepático, caracterizando as hepatopatias (SILVA et al., 2003). Histologicamente, o fígado é composto por parênquima (representado por células como hepatócitos, células epiteliais dos ductos hepáticos e células endoteliais) e do estroma de sustentação, o qual refere-se ao tecido conjuntivo não funcional de sustentação, composto principalmente de colágeno (CLÀRIA; TITOS, 2004).

Dessa forma, o medicamento utilizado para induzir hepatotoxicidade no presente estudo provocou alterações na histoarquitetura, marcada por degeneração e necrose de hepatócitos e consequente alteração da relação existente entre os percentuais de células e de colágeno que compõem o estroma.

O presente estudo avaliou também a atividade antineoplásica e genoprotetora do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., pois o câncer é uma doença com casuística de óbitos elevados, que apresenta um tratamento quimioterápico invasivo com reações adversas graves, com efeito deletério em células tumorais e células normais (KAMB, 2005; PANIS et al., 2018). Para tanto, o presente estudo utilizou o ensaio de redução do tetrazólio MTT, e os resultados obtidos demonstraram que o efeito citotóxico contra a linhagem celular HepG2 e fibroblastos-L929 não foi seletivo para as células neoplásicas. No entanto, é importante considerar que os quimioterápicos empregados no tratamento do câncer são poucos seletivos.

Por esse motivo cresce o interesse em desenvolver fármacos a base de produtos naturais com o máximo de segura no uso (LOTUFO et al., 2010). Os testes *in vitro* são muito bem aplicados em pesquisas para verificar a capacidade citotóxica dos produtos naturais, devido o controle rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório (ROGERO et al., 2003), havendo 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 causam reações adversas e nem lesiona o organismo (FROZZA et al., 2013).

Sanches et al. (2017), em estudo com meliponídeos da espécie *Scaptotrigona aff. postica* demonstraram excelente atividade antineoplásica em linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF7), melanoma murino (B16-F10), astrocitoma (U343MG-a) e fibroblastos de camundongos (3T3). Frozza et al. (2013), quando testaram o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de *A. mellifera*, proveniente do estado de Sergipe, em linhagens celulares de câncer Hep-2 (carcinoma epidermóide laríngeo humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e células não tumorais Hek-293 (rim embrionário epitelial normal humano), obtiveram IC₅₀ de 63,48, 81,40 e >150, respectivamente, após 24 h de exposição. Campos et al. (2014) ao testarem o extrato etanólico da geoprópolis de *Melipona orbignyi* em células de eritroleucemia K562, demonstraram uma citotoxicidade nas concentrações mais altas testadas 250, 274, 500 µg/mL. Ambas as pesquisas demonstraram em seus extratos atividade antineoplásica.

Dessa forma, o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresentou atividade antineoplásica em HepG2. Na avaliação da composição química do extrato foi possível identificar as substâncias lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside, chalconas e apigenina, que segundo a literatura descreve como possuindo atividade antineoplásica (TAMIELLO, 2013; ZILLA et al., 2014; ZHANG et al., 2015; SALMANI et al., 2017; MADUNIC et al., 2018; SEM et al., 2019). Dessa forma, é provável que a atividade antineoplásica observada no presente estudo tenha sido por essas substâncias. Em estudos realizados por Costa (2018) e Silva et al. (2019), no semiárido do Rio Grande do Norte, o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *P. cupira* e de própolis vermelha da *A. mellifera*, respectivamente, não apresentaram atividade antineoplásica em linhagem celular HepG2, após 72 h de exposição, como também não foram verificados os compostos lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside e apigenina.

De acordo com Zilla et al. (2014), lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside exibe notável potencial citotóxico em diversas linhagens celulares de câncer. O seu potencial terapêutico foi estudado pela primeira vez, exibindo atividade antiproliferativa e geradora de espécies reativas de oxigênio (ERO). Tamiello (2013) revelou as chalconas como compostos químicos com diversas atividades biológicas, dentre elas, a capacidade de reduzir a viabilidade celular de HepG2, com alto potencial citotóxico nesse tipo de célula. A apigenina também é responsável por efeitos deletérios em células tumorais

(ZHANG et al., 2015; SALMANI et al., 2017; MADUNIC et al., 2018). Sem et al. (2019) observaram um maior potencial citotóxico e apoptótico de apigenina em células de carcinoma do cólon humano HCT-15 e HT-29, quando comparado com 5-Fluorouracil, e ao administrar um fármaco constituído de lipossoma duplo contendo apigenina e 5-Fluorouracil, verificaram o aumento da eficácia terapêutica em câncer colorretal, devido a associação sinérgica com apigenina.

De acordo com Niwa et al. (2013), os testes de genotoxicidade são importantes por que atuam 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 genoprotetores para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA.

Os resultados do presente estudo indica que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. exerce atividade genoprotetora. Tais resultados corroboram com os da composição química que demonstraram valores elevados de fenóis e flavonoides totais, associados a intensa capacidade antioxidante, o que segundo Hoshina (2012), afirma que o potencial genoprotetor está relacionado com a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Aprotosoai et al. (2017), testaram o extrato hidrometanólico de *Ramaria largentii* Marr & D. E. Stuntz (cogumelo coral laranja), coletado no Nordeste da Romênia, como agente genoprotetor em células Vero (ATCC CCL 81), associado a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Os autores estimaram boa capacidade de eliminação e redução de radicais livres ($EC_{50} \pm 64,3 \pm 0,2$ e $61,54 \pm 0,46$ mg/mL, respectivamente) e elevados teores do conteúdo fenólico ($42,33 \pm 0,18$ mg de GAE/g). Associado a esses valores, nas células Vero normais, o extrato em todas as concentrações testadas (100, 200 e 300 mg/mL), não apresentou potencial genotóxico e, além disso, DNA quase completamente protegido contra danos induzidos por H_2O_2 , possuindo assim expressiva atividade genoprotetora, decorrente da atividade antioxidante dos composto fenólicos presentes no extrato.

O mesmo ocorreu em pesquisas realizadas por Costa (2018), Nunes (2018) e Silva et al. (2019) no semiárido do Rio Grande do Norte, os extratos hidroetanólico de geoprópolis de *P. cupira*, *Frieseomelitta doederleini* e de própolis vermelha de *A. mellifera*, respectivamente, apresentaram atividade genoprotetora em linhagem L929 de fibroblasto murino, no ensaio cometa (*P. cupira* e *A. mellifera*) e pelo teste de detecção *in vitro* de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (*F. doederleini*), bem como elevado potencial antioxidante. Reforçando que a atividade genoprotetora está intimamente relacionada ao potencial antioxidante dos compostos fenólicos, semelhante ao presente

estudo, confirmando que o potencial antioxidante da geoprópolis de *M. subnitida* D. pode ser a possível explicação para efeito genoprotetor.

Nesse sentido, não existe na literatura estudos sobre a atividade genoprotetora da geoprópolis de *M. subnitida* D., caracterizando o ineditismo desta pesquisa. Por isso, foi verificado o potencial genotóxico e genoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. em linhagem de fibroblastos de camundongo L929, pois segundo Miranda-Vilela et al. (2008), antioxidantes naturais podem diminuir o estresse oxidativo e consequentemente promover proteção contra danos no DNA.

Desse modo, o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., apresenta atividade hepatoprotetora frente as lesões agudas causadas pelo acetaminofen, atividade antineoplásica e genoprotetora, sugerindo que a geoprópolis do Rio Grande do Norte contribuirá significativamente para a indústria farmacêutica, uma vez que, o uso de produtos elaborados pelos meliponídeos, como remédio caseiro, é hábito das comunidades rurais no semiárido do Nordeste brasileiro (SOUZA et al., 2004), com isso, aprimora-se a economia local, devido comprovações científicas da eficácia farmacológica dos produtos.

CONCLUSÃO

Os resultados dos indicadores de lesão hepática presentes na bioquímica sérica, juntamente com a avaliação histopatológica dos fígados indicaram que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. exerceu efeito hepatoprotetor, frente as injúrias induzidas pelo acetaminofen.

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresentou em sua composição química elevados teores de fenóis e flavonoides totais e baixo valores de IC₅₀ (%), indicando moderada atividade antioxidante, que pode ter contribuído para as atividades hepatoprotetora e genoprotetora, com percentual de redução de genotoxicidade igual a 90,74 ± 4,03. Foi descrito pela primeira vez o composto Lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside em geoprópolis.

A atividade genoprotetora verificada no extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. em células da linhagem de fibroblastos de camundongo L929, permite sugerir que a geoprópolis pode ser um possível produto na prevenção de doenças desencadeadas por danos ao DNA.

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresentou efeito citotóxico contra a linhagem celular HepG2 e fibroblastos-L929, demonstrando efeito antineoplásico, podendo ser um produto natural promissor na quimioterapia.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

REFERENCIAS

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

APROTOSOAIE, A. C. et al. Antioxidant and antigenotoxic potential of *Ramaria largentii* Marr & D. E. Stuntz, a wild edible mushroom collected from Northeast Romania. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 429-437, 2017.

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

BERBECARU-IOVAN, A. et al. Hepatoprotective effect of *Syringae vulgaris flos* ethanolic extracts in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 57, n. 4, p. 1279-1284, 2016.

BESSONE F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 45, p. 5651-5661, 2010.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S. K.; SHUKLA, S. Hepatoprotective efficacy of propolis extract: a biochemical and histopathological approach. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 6, n. 2, p. 145-154, 2007.

BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17400-17421. 2014.

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

CAMPELLO, F. B. et al. **Diagnóstico florestal da região Nordeste**, Natal, n. 2, maio. 1999. Boletim técnico.

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

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

CARVALHO, M. D. et al. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599-608, 2014.

CASTRO, M. L. et al. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CLÀRIA, J.; TITOS, E. La célula de Kupffer. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 4, p. 264-273, 2004.

COSTA, K. M. F. M. **Efeito antioxidante, genoprotetor e hepatoprotetor da geoprópolis da abelha *Partamona cupira* produzida no semiárido nordestino**. 2018. 93f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

DA SILVA, E. C. C. et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628-633, 2013.

DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI, D. S. et al. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. **Food Research International**, v. 111, p. 661-673, 2018.

DOS SANTOS SILVA, A. et al. Induced blooming of jurema preta to provide pollen for honey bees during drought in Caatinga. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 197-206, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. 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, n. 2, p. 446-452, 2006.

FACUNDO, V. A. et al. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1134-1139, 2012.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 309-318, 2013.

FERREIRA, A. M. D.; BARBOSA, P. E. B.; CEDDIA, R. B. A influência da suplementação de triglicerídeos de cadeia média no desempenho em exercícios de ultra-resistência. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n. 6, p. 413-419, 2003.

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**, v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 2017a.

_____. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: Chemical characterization and likely botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-6, 2017b.

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

FREITAS, J. S. et al. Avaliação de citocinas na fibrose hepática induzida em ratos pela ligadura do ducto biliar. **Revista Univap**, v. 20, n. 36, p. 54-65, 2014.

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

FUKUDA, T. et al. Anti-tumor promoting effect of glycosides from *Prunus persica* seeds. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 2, p. 271-273, 2003.

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

GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F.; DAY, R. O. Alcohol and paracetamol. **Australian Prescriber**, v. 27, n. 1, p. 14-15, 2004.

GUO, Z.; LIANG, X.; XIE, Y. Qualitative and quantitative analysis on the chemical constituents in *Orthosiphon stamineus* Benth. using ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 135-147, 2019.

GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

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 em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

IIDA, N. et al. New phenylpropanoid glycosides from *Juniperus communis* var. depressa. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 5, p. 742-746, 2010.

JAMZAD, Z. et al. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 587-600, 2003.

JESUS, G. C.; SOUSA, H. H. B. A.; BARCELOS, R. S. S. Principais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas. **Estudos**, v. 41, n. 3, p. 525-537, 2014.

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.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, 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 Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 121-129, 2013.

KRANJC, E. et al. Non-targeted chromatographic analyses of cuticular wax flavonoids from *Physalis alkekengi* L. **Journal of Chromatography A**, v. 1437, n. 11, p. 95-106, 2016.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LEITNER, J. M.; GRANINGER, W.; THALHAMMER, F. Hepatotoxicity of antibacterials: Pathomechanisms and clinical. **Infection**, v. 38, n. 1, p. 3-11, 2010.

LI, S. et al. Chemical profiling of Fufang-Xialian-Capsule by UHPLC-Q-TOF-MS and its antioxidant activity evaluated by *in vitro* method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, p. 289-301, 2017.

LIMA, M. V. D. **Geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas: Atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos**. 2015. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol (acetaminofem). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 411-414, 2012.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: A biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, p. 7-9, 2005.

LORENZONI, A. A. et al. Efeito protetor de produtos naturais sobre o dano hepático induzido pelo paracetamol. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 11, n. 2, p. 43-52, 2014.

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.

LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBROW, 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, n. 2, p. 109-119, 1999.

MACÍAS, J.; PINEDA, J. Á.; REAL, L. M. Non-alcoholic fatty liver disease in HIV infection. **AIDS Reviews**, v. 19, n. 1, p. 35-46, 2017.

MADUNIC, J. et al. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. **Cancer Letters**, v. 413, p. 11-22, 2018.

MAEDA, M. F. Y. et al. Vascularização na cirrose hepática: Estudo imunoistoquímico baseado em necropsias. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 45, n. 1, p. 38-45, 2008.

MAHFOUDHI, A. et al. Metabolite profiling of polyphenols in the Tunisian plant *Tamarix aphylla* (L.) Karst. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 97-105, 2014.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. 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.

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 de Epidemiologia**, v. 20, n. 1, p. 61-74, 2017.

MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p.1-6, 2012.

MENSOR, L. L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

NIEVA-MORENO, M. I. et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis of several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 2, p. 109-114, 2000.

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

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

NUNES, F. V. A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica da própolis da abelha *Frieseomelitta doederleini* produzida no semi-árido nordestino**. 2018. 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

PANIS, C. et al. Revisão crítica da mortalidade por câncer usando registros hospitalares e anos potenciais de vida perdidos. **Einstein**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2018.

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.

PAULINO, R. C. et al. Riqueza e importância das plantas medicinais do Rio Grande do Norte. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 157-168, 2011.

PELLATI, F. et al. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 82, p. 126-132, 2013.

QUILEZ, A. et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpubya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 583-589, 2010.

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.

RIEGELHAUPT, E. M.; PAREYN, F. G. C. A questão energética e o manejo florestal da Caatinga. In: GARIGLIO, M. A. et al. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. Cap. 01, p.65-75.

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

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAID, R. A. **Atividade hepatoprotetora de diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico da própolis, nas intoxicações agudas por acetaminofen, em camundongos**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SALMANI, J. M. M. et al. Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 5, p. 0321-0329, 2017.

SANCHES, M. A.; PEREIRA, A. M. S.; SERRÃO, J. E. Pharmacological actions of extracts of propolis of stingless bees (*Meliponini*). **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 50-57, 2017.

SEM, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, M. Dual drug loaded liposome bearing apigenin and 5-Fluorouracil for synergistic therapeutic efficacy in colorectal cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 9-22, 2019.

SILVA, A. P. C.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; RIBEIRO, S. F. A. The role of *Mimosa* L. (Fabaceae) on pollen provision of *Melipona asilvai* Moure 1971 in a Caatinga area from Brazil. **Grana**, v. 57, n. 4, p. 311-321, 2018.

SILVA, G. H. et al. Avaliação da atividade hepatoprotetora do asiaticosídeo em modelo experimental de lesão hepática por paracetamol em ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 489-496, 2014.

SILVA, J. B. et al. Hepatoprotective and antineoplastic potencial of red propolis produced by the bees *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 744-756, 2019.

SILVA, M. O. et al. Papel de mediadores endógenos na fisiopatologia da cirrose hepática. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, n. 3, 2003.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013.

SINGH, A. P. et al. HPLC method development and validation for Azithromycin in oral suspension. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 1, p. 7-12, 2019.

SMOLUCH, M. et al. FAPA mass spectrometry of hydroxychalcones. Comparative studies with classical methods of ionization. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 27-31, 2014.

SONGSONG, W. et al. Characterization and rapid identification of chemical constituents of NaoXinTong capsules by UHPLC-linear ion trap/Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 104-118, 2015.

SOUSA, D. M. N. Phytochemical screening, *in vitro* toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaíra bee's geopropolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, p. 134-140, 2015.

SOUZA, A. S. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

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.

SOUZA, S. A. et al. Characterization of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 549-558, 2018.

SPIRA, G. et al. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

SUN, J. et al. Characterization and quantitative analysis of phenolic derivatives in Longxuetongluo Capsule by HPLC-DAD-IT-TOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 462-472, 2017.

TADDEO, V. A. et al. Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw Italian propolis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 219-223, 2016.

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

TAO, L. et al. HPLC analysis of bioactive flavonoids from the rhizome of *Alpinia officinarum*. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 1, p. 163-166, 2006.

THRALL, M. A. et. al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 360p.

TONG, Y. et al. Effect of a hypoxic microenvironment after radiofrequency ablation on residual hepatocellular cell migration and invasion. **Cancer Science**, v. 108, n. 4, p. 753-762, 2017.

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

WALI, A. F. et al. Antioxidant, hepatoprotective potential and chemical profiling of propolis ethanolic extract from Kashmir Himalaya region using UHPLC-DAD-QToF-MS. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

WANG, X. et al. Profiling and quantification of phenolic compounds in *Camellia* seed oils: Natural tea polyphenols in vegetable oil. **Food Research international**, v. 102, p. 184-194, 2017.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZAHOOR, M. et al. Isolation of quercetin and mandelic acid from *Aesculus indica* fruit and their biological activities. **BMC Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2018.

ZHANG, J. Y. et al. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 950-961, 2011.

ZHANG, Y. et al. Liquiritigenin protects rats from carbon tetrachloride induced hepatic injury through PGC-1 α pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

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.

ZILLA, M. K. et al. 4'-Demethyl-deoxypodophyllotoxin glucoside isolated from *Podophyllum hexandrum* exhibits potential anticancer activities by altering Chk-2 signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 100-107, 2014.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na composição química do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *Melipona subnitida* D. foi descrito pela primeira vez o composto Lignan 4-demethyldeoxypodophyllotoxin 4-O-glucopyranoside, como também, apresentou elevados teores de fenóis e flavonoides totais, que podem ter contribuído para o potencial antioxidante, atividade hepatoprotetora e genoprotetora.

Os resultados dos indicadores de lesão hepática presentes na bioquímica sérica indicaram que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. exerceu efeito hepatoprotetor, frente as injúrias induzidas pelo acetaminofen.

A avaliação histopatológica dos fígados indicaram que o extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. exerceu efeito hepatoprotetor, frente as injúrias induzidas pelo acetaminofen, uma vez que as alterações macroscópicas e histológicas indicativas de lesão aguda foram menos expressivas.

A análise estereológica demonstrou aumento do percentual de hepatócitos e sinusóides hepáticos, além da redução do percentual de colágeno no grupo tratado com extrato e acetaminofen, indicando o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., frente a lesão hepática induzida por acetaminofen.

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D., não apresentou efeito genotóxico, em todas as concentrações testadas, demonstrando atividade genoprotetora sobre os danos ao DNA induzido pelo peróxido de hidrogênio.

O extrato hidroetanólico da geoprópolis de *M. subnitida* D. apresentou efeito citotóxico em células neoplásicas.

Dessa forma, a perspectiva desse estudo é contribuir como uma nova possibilidade de quimioterapia no tratamento contra o hepatocarcinoma humano, bem como, medida profilática contra lesões agudas causadas por medicamentos, tornando-se um produto natural promissor no mercado consumidor. Futuros estudos devem abordar tal possibilidade, objetivando encontrar plantas que possam aumentar o efeito antineoplásico da geoprópolis, a dose terapêutica e verificar o efeito sinérgico com outras drogas, isolando compostos químicos para ampliar o tratamento de neoplasias e lesões hepáticas.

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 hidroalcólico 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 VFS Moreira

Paula Vivianne Souza de Queiroz Moreira
 Coordenadora do CEEA/UERN