

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

JULIANA VIEIRA DE BARROS

**Investigação *in vitro* do potencial citotóxico e genotóxico do extrato
da própolis vermelha do Estado de Pernambuco**

Recife
2018

JULIANA VIEIRA DE BARROS

**Investigação *in vitro* do potencial citotóxico e genotóxico do extrato
da própolis vermelha do Estado de Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^aDr^aNeide Santos

Coorientadora: Prof^aDr^aAna Christina Brasileiro Vidal

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Barros, Juliana Vieira de
Investigação *in vitro* do potencial citotóxico e genotóxico do extrato da própolis vermelha do Estado de Pernambuco / Juliana Vieira de Barros. – 2018.

54 f. : il.

Orientadora: Prof^aDr^aNeide Santos.

Coorientadora: Prof^aDr^aAna Christina Brasileiro Vidal.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Abelhas – produtos. 2. Própolis. I. Santos, Neide (Orientadora). II. Brasileiro Vidal, Ana Christina (Coorientadora) III. Título.

638.16

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 418

JULIANA VIEIRA DE BARROS

**Investigação *in vitro* do potencial citotóxico e genotóxico do extrato
da própolis vermelha do Estado de Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovada em: 24/04/2018

Banca Examinadora

Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Monica Lúcia Adam
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Silvany de Sousa Araújo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Ana Maria Benko Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2018

Aos meus pais, Luciana e Everaldo, que não medem esforços para ajudar os filhos a realizarem seus sonhos, com todo o amor do mundo, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos, nunca me deixar desamparada e por ter colocado verdadeiros anjos na minha vida.

À minha família: meus pais, Everaldo e Luciana, que são a minha base e a quem eu devo todo o meu caráter e educação, muito obrigada por sempre acreditarem no meu sonho (até mais do que eu mesma acreditei), é por vocês que eu procuro sempre melhorar; meus irmãos, Júnior e Fabiana, e meus cunhados, Rebeka, Raul e Igor, obrigada pela paciência, carinho e tolerância nos meus momentos de “antipatia”; meus padrinhos, Marlene e Junior, obrigada pelo apoio, carinho e incentivo. Eu amo muito todos vocês!

Ao meu noivo, Hugo. Por sua amizade, companheirismo, paciência e amor. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos. Você foi crucial para a realização deste trabalho. Eu te amo!

À minha orientadora, Profa. Neide Santos, que acreditou em mim desde a iniciação científica e nunca me deixou desistir deste sonho sempre acreditando que eu poderia chegar mais longe, e aqui estou. Muito obrigada por sua confiança, ensinamentos e companheirismo!

À minha coorientadora, Profa. Ana Christina Brasileiro Vidal, que me fez “correr atrás” de novos aprendizados, me dando autonomia e ao mesmo tempo me guiando ao melhor caminho. Muito obrigada por mostrar que “o novo” pode ser desesperador, mas está ao nosso alcance!

Ao meu amigo Marcos Regueira e ao Prof. Valdir Balbino, que despertaram meu interesse pelo “universo” da própolis e confiaram a mim o seu objeto de estudo. Obrigada pela confiança e apoio!

Ao Rafael Araújo, que encarou comigo todos os novos desafios que o desenvolvimento deste trabalho nos trouxe. Sem você do meu lado aperreando, encorajando e alegrando ao longo dos experimentos seria muito mais difícil de suportar. Muito obrigada por ser um amigo!

A Jorge Pereira, Silvany Araújo, Dijanah Machado, Darlene Paiva, Mariana Espósito, Laís Lima, Dominik Spindola, Cirlene Maria e João Carlos pelos ensinamentos de novas técnicas e ajuda nas análises citogenéticas e estatísticas. A vocês, meu muito obrigada!

Aos doadores voluntários que aceitaram doar seu sangue para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À Luana Oliveira e Raysa Laranjeira, muito obrigada pelos momentos de descontração e até os de “puxões de orelha”. Sem o apoio e carinho de vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada!

À Joana Suassuna, que por vezes me tirou do desespero apenas por uma conversa pelo WhatsApp. Muito obrigada por ser amiga desde a graduação!

Aos amigos do LGCAH: Rafaella, Raysa, Cibele, professora Vilma. Obrigada pelo companheirismo e por tornarem o trabalho mais descontraído, tenho orgulho de fazer parte da equipe do “Laboratório de Genética Legal”.

Ao Frei Dennys Pimentel e ao doutor Ullisses Pernambucano, que juntos fizeram e fazem de tudo para que eu continue a minha caminhada, tenho vocês como verdadeiros alicerces na minha vida. Muito obrigada pelos conselhos cheios de carinho e otimismo!

À Dona Zizi e seu Romildo, pela amizade, brincadeiras e conselhos durante os vários almoços na copa do departamento. Obrigada!

A todo o corpo docente da Pós-Graduação em Genética por todo ensinamento e ao secretário Manassés, por não medir esforços na hora de ajudar com as questões burocráticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!”.

Augusto Cury.

RESUMO

A própolis é colhida pelas abelhas melíferas de diferentes exsudatos de plantas, sendo amplamente utilizada na medicina alternativa. O efeito terapêutico da própolis aumentou o interesse na compreensão de suas propriedades biológicas, tornando necessária a investigação de possíveis danos aos organismos após sua exposição. Este trabalho avaliou o potencial citotóxico e genotóxico do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) de Pernambuco em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). A análise da viabilidade celular mediante teste de MTT, com concentrações variando de 0,39 a 300 µg/mL, mostrou que concentrações de 100 µg/mL ou abaixo não foram consideradas citotóxicas em PBMC. Com base nos resultados de citotoxicidade, três concentrações (15, 30 e 60 µg/mL) foram testadas para os ensaios de genotoxicidade. A maior concentração testada (60 µg/mL), através do teste de micronúcleos, apresentou uma diferença estatisticamente significativa, em relação ao controle negativo e à menor concentração (15 µg/mL), indicando que apenas esta concentração foi genotóxica para as células testadas. Contudo, análise através do teste de metáfases mostrou que o EHPV não possui atividade genotóxica visto que as concentrações testadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles. O uso da própolis na concentração comercialmente utilizada, de 30 µg/mL, é seguro para uso medicinal, uma vez que não apresentou atividade citotóxica e genotóxica. Contudo, seu uso em altas concentrações pode trazer riscos à saúde humana.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas. Micronúcleos. Teste MTT. Própolis.

ABSTRACT

Propolis is harvested by honey bees from different plant extracts and is widely used in alternative medicine worldwide. The therapeutic effect of propolis has increased interest in understanding its biological properties, making it necessary to investigate possible damage to organisms after exposure. This work evaluated the cytotoxic and genotoxic potential of Pernambuco hydroethanolic extract of red propolis (HERP) in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Analysis of cell viability by MTT assay, with concentrations ranging from 0.39 to 300 µg/mL, showed that concentrations of 100 µg/mL or below were not considered cytotoxic in PBMC. Based on the cytotoxicity results, three concentrations (15, 30 and 60 µg/mL) were tested for genotoxicity assays. The highest concentration tested (60 µg/mL), through micronucleus assay, showed a statistically significant difference, in relation to the negative control and the lowest concentration (15 µg/mL), indicating that only this concentration was genotoxic for the tested cells. However, metaphase analysis showed that HERP does not have genotoxic activity since the concentrations tested did not present a statistically significant difference in relation to the controls. The use of propolis in the commercially used concentration of 30 µg / mL is safe for medicinal use, as it did not present cytotoxic and genotoxic activity. However, its use in high concentrations may pose a risk to human health.

Keywords: Chromosomal changes. Micronucleus. MTT test. Propolis

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 -** *Apis mellifera* colhendo resina da planta *Dalbergia escastophyllum*.
Fonte: <http://www.ufal.edu.br/noticias/2014/07/pesquisa-da-propolis-vermelha-resulta-em-dois-produtos-farmaceuticos>. **16**
- FIGURA 2 -** *Dalbergia escastophyllum*. Fonte: <http://viver-melipona.blogspot.com.br/2010/09/abelhas-em-dalbergia-ecastophyllum.html>. **17**
- FIGURA 3 -** Estrutura química do MTT antes e depois de ser clivado na mitocôndria de células viáveis. Fonte: Ebada *et al.* (2008). **22**
- FIGURA 4 -** Célula binucleada com presença de micronúcleo (indicado pela seta). Fonte: A autora. **23**
- FIGURA 5 -** Esquema de formação de micronúcleos. Fonte: Adaptada de Terradas *et al.* (2010). **24**
- FIGURA 6 -** Metáfases parciais provenientes de linfócitos cultivados apresentando: (A), (B) e (D) quebra cromatídica; (C) fragmento acêntrico; (E) quebra cromossômica. Todas as alterações estão indicadas por seta. Fonte: Estécio e Silva (2008). **25**
- FIGURA 7 -** Análise citotóxica baseada na viabilidade celular do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV), mediante teste de MTT (n = 5). CP: Controle positivo (Triton-X 100%, a 1%). CN: Controle negativo (meio de cultura). CS: Controle de solvente (DMSO 1%). **31**
- FIGURA 8 -** Células bi (a), tri (b) e tetranucleadas (c) com a presença de um ou mais micronúcleos. **33**
- FIGURA 9 -** Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) submetidas à própolis vermelha (a) ou ao MMS (b). (a) Célula binucleada com a presença de brotos. (b) Célula tetranucleada com a presença de um micronúcleo (MN) (seta) e uma ponte nucleoplasmática (seta vermelha). **33**
- FIGURA 10 -** Metáfases mitóticas. (a) Metáfase normal (46,XY), (b-f) Alterações cromossômicas (b) cromossômico em anel; (c) Fragmento cromossômico duplo; (d) Fragmento simples; (e) Gap cromatídico; (f) Quebras cromatídica (seta verde) e cromossômica (seta vermelha). **36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes tipos de própolis.	20
Tabela 2 -	Média, desvio padrão e frequência do número de micronúcleos e de brotos observados para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em linfócitos do sangue periférico (1.000 células/repetição, n =3).	32
Tabela 3 -	Números e tipos de alterações cromossômicas observadas para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em metáfases mitóticas do sangue periférico de quatro doadores. CN: controle negativo; CS: controle de solvente (DMSO).	35
Tabela 4 -	Média, desvio padrão e frequência do número de alterações cromossômicas observadas para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em metáfases mitóticas do sangue periférico. CN: controle negativo; CS: controle de solvente (DMSO).	36
Tabela 5 -	Número de alterações cromossômicas observadas para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em metáfases mitóticas do sangue periférico.	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
ACs	Alterações cromossômicas
BN	Célula binucleada
CBMN	Teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (<i>Lymphocyte cytokinesis-block micronucleus</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHPV	Extrato hidroetanólico da própolis vermelha
KCl	Cloreto de potássio
INPI	Instituto Nacional De Propriedade Industrial
LGCAH	Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana
MN	Micronúcleo
MTT	(3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5 difenil brometo de tetrazólio)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
BtN	Broto nuclear
PN	Ponte nucleoplasmática
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Rpm	Rotações por minute
SVP	Sangue venoso periférico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 PRÓPOLIS VERMELHA.....	16
2.1.2 Importância econômica da própolis.....	18
2.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	19
2.2.1 Citotoxicidade.....	21
2.2.2 Genotoxicidade.....	22
2.2.2.1 Teste de Micronúcleos.....	22
2.2.2.2 Teste de Metáfases.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DA PRÓPOLIS VERMELHA.....	27
4.2 LOCAL, PARTICIPANTES, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO...	27
4.3 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO.....	28
4.4 OBTENÇÃO DE PBMC.....	28
4.5 TESTE DO MTT.....	28
4.6 TESTE DO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN)	29
4.7 TESTE DE METÁFASES.....	29
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 CITOTOXICIDADE.....	31
5.2 GENOTOXICIDADE.....	32
5.2.1 Teste de Micronúcleos.....	32
5.2.2 Teste de Metáfases.....	34
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	49

ANEXO B - PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS CCS-UFPE).....	51
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância produzida por abelhas a partir de resinas secretadas pelas plantas nas quais as abelhas adicionam cera, saliva e pólen. Essa mistura é utilizada na colmeia como forma de proteção. Para os seres humanos a própolis é empregada, principalmente, como remédio fitoterápico devido a diversas propriedades biológicas já confirmadas como: antifúngica, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, cicatrizante, antioxidante, imunoestimulatória, hepatoprotetora, entre outras.

Atualmente a própolis é classificada em 13 diferentes tipos, sendo a própolis vermelha a mais recente descoberta e está presente ao longo do Nordeste brasileiro, acompanhando a distribuição da *Dalbergia escastophyllum*, planta da qual é coletada a resina de cor avermelhada.

Apesar das vantagens terapêuticas, compostos naturais podem apresentar substâncias tóxicas, incluindo as de natureza cancerígena e mutagênica, aos seres humanos. Testes que avaliem a concentração segura de tais substâncias fazem-se necessários para a segurança da saúde dos indivíduos que as utilizam. A Agência de Vigilância Sanitária do Brasil preconiza que os efeitos danosos aos indivíduos sejam determinados em relação ao dano celular e no material genético.

Deste modo, uma análise do potencial citotóxico e genotóxico da própolis vermelha de Pernambuco permitirá um maior conhecimento científico sobre a eficácia e segurança do seu uso medicinal, que tem um uso cada vez mais crescente dentro e fora do país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRÓPOLIS VERMELHA

A própolis é uma resina que contém uma mistura complexa composta por aproximadamente 50% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de impurezas (Burdock, 1998). A resina é colhida pelas abelhas melíferas (Figura 1) de diferentes exsudatos de plantas (secreções de árvores, folhas e flores), sendo utilizada como proteção para a colmeia contra a proliferação de microrganismos, para selar as paredes, reforçar as bordas da colmeia e embalsamar invasores mortos (Bankova, 2005; Silva *et al.*, 2015).



Figura 1. *Apis mellifera* colhendo a resina da planta *Dalbergia ecastophyllum*. Fonte: [http://www.ufal.edu.br/noticias/2014/07/pesquisa-da-propolis-vermelha-
resulta-em-dois-produtos-farmaceuticos](http://www.ufal.edu.br/noticias/2014/07/pesquisa-da-propolis-vermelha-resulta-em-dois-produtos-farmaceuticos).

A mais popular e mais bem estudada própolis brasileira é a própolis verde ou própolis do alecrim. Contudo, Park *et al.* (1999) classificaram a própolis brasileira quanto à composição química, origem geográfica e planta fonte (da qual a abelha recolhe o exsudato) em 12 grupos: cinco no Sul, um no Sudeste e seis no Nordeste. Em 2008, foi descoberta a própolis vermelha em colmeias localizadas ao longo do litoral e margens de rios da região Nordeste (Daugusch *et al.*, 2008), totalizando 13 tipos diferentes de própolis presentes no território brasileiro.

A espécie leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (Figura 2), pertencente à família Fabaceae, foi sugerida como a fonte botânica para a própolis vermelha brasileira (Souza e Lorenzi, 2005). *Dalbergia ecastophyllum* se distribui ao longo da costa do continente americano, desde o sul da Flórida (EUA) ao sul do Brasil, assim

como na costa ocidental da África. Sua ocorrência é quase sempre associada a leitos de rios e manguezais onde é dominante, possuindo raízes, ramos e caules que auxiliam sua fixação na areia (Mata *et al.*, 2014).



Figura 2. *Dalbergia ecastophyllum*. Fonte: <http://vivermelipona.blogspot.com.br/2010/09/abelhas-em-dalbergia-ecastophyllum.html>

Na própolis, existe uma alta complexidade e variação química a depender da sazonalidade, iluminação, altitude, tipo de coletor, disponibilidade de comida, atividade desenvolvida durante a exploração da mesma e a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (Bankova *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2006; Toreti *et al.*, 2013). Mais de 300 componentes químicos foram identificados em amostras de própolis, dentre os quais: ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, entre outros), terpenos, esteroides, aldeídos e ácidos aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (Burdock, 1998; Park *et al.*, 1999; Bankova *et al.*, 2000; Marcucci *et al.*, 2001).

Recentemente, Regueira-Neto *et al.* (2017) descreveram os seguintes compostos químicos contidos na própolis vermelha de Pernambuco: rutina, ácido p-coumarico, quercetina, luteolina, ácido cafeico, apigenina, ácido clorogênico, ácido elágico e vitexina, sendo os quatro últimos compostos descritos pela primeira vez. No período de chuva os compostos mais abundantes foram rutina e quercetina, enquanto no período de seca os mais abundantes o ácido p-coumárico e a apigenina.

Devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas e seu uso em alimentos, bebidas e na medicina popular, há um interesse renovado na composição e atividades biológicas da própolis (Banskota *et al.*, 2000). Extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos da própolis têm sido utilizados e analisados em diversas situações como agentes bactericidas, antivirais, fungicidas, anti-inflamatórios, antitripanossomais, antiparasitários, imunoestimulantes, hepatoprotetores, antioxidantes, cicatrizante, anestésicos e até mesmo anticancerígenos (Marcucci *et al.*, 2001; Castaldo e Capasso, 2002; Gekker *et al.*, 2005; Cabral *et al.*, 2009; de Mendonça *et al.*, 2015; Corrêa *et al.*, 2017).

Não é possível apontar uma substância individual ou uma classe de substância específica que poderia ser responsável por cada atividade biológica da própolis, visto que em diferentes amostras existem diferentes combinações de substâncias necessárias para determinadas atividades (Kujumgiev *et al.*, 1999).

2.1.2 Importância econômica da própolis

A própolis tem sido amplamente comercializada pelas indústrias farmacêuticas como uma medicina alternativa em várias partes do mundo (Feng *et al.*, 2008) e está disponível na forma de cápsulas, extrato, como antisséptico bucal, em pastilhas para a garganta, cremes e na forma de pó (Castaldo e Capasso, 2002). Também tem sido amplamente utilizada em alimentos e bebidas para melhorar a saúde e prevenir doenças como diabetes, câncer e doenças cardíacas (Ozkul *et al.*, 2006).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de própolis, ocupando a terceira posição com uma produção estimada em torno de 50 a 150 toneladas por ano, onde cerca de 75% desse total é exportado, especialmente para o Japão. O apicultor pode vender o produto, em média, por R\$ 120/kg, por uma própolis de alta qualidade. A própolis vermelha, em especial, possui uma agregação de valor diferenciada em relação à própolis verde (tipo mais comum), com o quilo do produto podendo ser comercializado a R\$ 450,00 (Agronegócios: produção de própolis, 2017). No Japão, 92% de toda a própolis *in natura* consumida é de origem brasileira, onde o extrato alcoólico da substância é vendido a US\$ 110 o frasco, de

acordo com dados da Japan Trade Organization (Boletim: O mercado da própolis, 2014).

O mercado apícola da própolis apresenta oportunidades em diversos níveis do mercado: (1) consumidor final, que adquire para consumo próprio ou em família; (2) consumidor de negócios, empresas que compram, fracionam e comercializam em porções menores; (3) consumidor industrial, que utiliza como ingrediente para fabricação de diversos alimentos, cosméticos ou produtos farmacêuticos; (4) consumidor de revenda, que adquire de forma fracionada ou a granel para revender às indústrias ou empresas de fracionamento; (5) mercado atacadista, que compra e revende a redes varejistas; (6) consumidor governamental, instituições que adquirem os produtos por meio de programas governamentais; (7) mercado internacional, com exportação para outros mercados (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2010).

Em 29 de maio de 2012 foi concedido pelo INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) o registro de Indicação Geográfica na modalidade Denominação de Origem para a própolis vermelha dos Manguezais de Alagoas (IG20110), com essa certificação, o produto da apicultura brasileira se torna ainda mais forte na competitividade do mercado global (Machado et al., 2012).

2.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

A relação entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto é um parâmetro para avaliar a utilidade de um produto e a determinação dos seus efeitos citotóxicos e genotóxicos é indispensável (Montoro *et al.*, 2012). Ensaio que detectam componentes genotóxicos (substâncias com propriedades químicas e físicas que interagem com o DNA) permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos, ao ambiente e a vários organismos vivos (Varanda, 2006). Estes estudos vêm crescendo no que diz respeito à própolis, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes tipos de própolis.

Origem da própolis	Teste utilizado	Tipos de células	Concentrações	Resultados	Autor
Turquia	Micronúcleo	Linfócitos humanos	0,01 a 1 mL	Genotoxicidade cerca de 2 a 3 vezes maior que o controle na concentração de 1 mL	Ozkul <i>et al.</i> , 2005
Turquia	Troca de cromátides irmãs	Linfócitos humanos	0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mL	Genotoxicidade a partir de 0,5 mL	Ozkul <i>et al.</i> , 2005
Minas Gerais	Alterações cromossômicas	Células de ovário de hamster chinês	12,5; 25; 50 e 100 µg/mL	Genotoxicidade a partir de 100 µg/mL	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Turquia	Micronúcleo	Linfócitos humanos	6,25; 12,5; 25; 50 e 100 ppm	Não apresentou genotoxicidade	Turkez e Yousef, 2009
São Paulo, Minas Gerais e NE do Brasil	MTT	Diversos tipos celulares	1 a 1000 100 µg/mL	Maior citotoxicidade da própolis vermelha	Franchi Jr <i>et al.</i> , 2012
Espanha	Alterações cromossômicas e troca de cromátides irmãs	Linfócitos humanos	20 a 2000 µg/mL	Genotoxicidade a partir de µg/mL	Montoro <i>et al.</i> , 2012
NE do Brasil e Cuba	MTT	Queratinócitos humanos e fibroblastos de ratos	50 a 200 µg/mL	Citotoxicidade a partir de 65 µg/mL	Lopez <i>et al.</i> , 2015
Minas Gerais	Ensaio do cometa e micronúcleo	Hepatoma de rato	Não informado	Não apresentou genotoxicidade	Roberto <i>et al.</i> , 2016

No Brasil, para a segurança de uso de fitofármacos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar danos no DNA (ANVISA, 2004). Os ensaios *in vitro* apresentam como vantagens uma melhor reprodutibilidade das condições de teste e resultados assistidos, menores custos, maior velocidade e simplicidade com a redução do número de animais

utilizados para ensaios globais (Araújo *et al.*, 2015a). Dentre eles, destacam-se ensaios de mutação reversa em bactéria (teste de *Salmonella* - Ames), de micronúcleo e análise citogenética para a detecção de danos cromossômicos (teste de metáfases) (ANVISA, 2004).

Testes em cultura de células *in vitro*, como o ensaio do micronúcleo e o teste de metáfases, permitem avaliar o potencial de uma substância em induzir quebras cromossômicas e/ou alterações nas fibras do fuso acromático utilizando linhagens celulares de mamíferos ou culturas de células primárias humanas. Essas alterações podem ocorrer por clastogênese, originando alterações cromossômicas estruturais através de quebras nos cromossomos, que resultam na perda ou rearranjo de segmentos cromossômicos, ou por aneugênese originando ganho ou perda de cromossomos nas células (Eastmond *et al.*, 2009; ECHA, 2014).

2.2.1 Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade são aplicados na avaliação de possíveis alterações na estrutura celular e sua viabilidade após exposição a um determinado composto ou extrato. Eles são comumente realizados *in vitro*, devido à possibilidade de análise individual da viabilidade celular, podendo ser precisamente quantificados (Araújo *et al.*, 2015a).

Dentre os testes para análise da citotoxicidade, destaca-se o MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2-5 difenil brometo de tetrazólio], que é um teste colorimétrico amplamente utilizado para determinar a viabilidade de células isoladas. O MTT é capturado por células e reduzido intracelularmente em uma reação dependente de mitocôndria para produzir os cristais de formazan. A capacidade das células para reduzir o MTT fornece uma indicação de sua atividade mitocondrial intacta, que serve como uma medida de viabilidade (Franchi Jr *et al.*, 2012).

O MTT apresenta uma estrutura molecular com forma de anel, sendo clivado na célula por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, formando os cristais (Figura 3) que são insolúveis e apresentam a cor violeta. Quando as células estão viáveis apresentam atividade de enzimas mitocondriais e são coradas em violeta. Por sua vez, as células mortas são incapazes de formar os cristais de formazan e, por conseguinte, não são coradas. A leitura do ensaio é efetuada num espectrofotômetro que pode avaliar por absorvância o número de células mortas,

uma vez que quanto maior a absorvância maior será o número de células viáveis (Araújo *et al.*, 2015a).

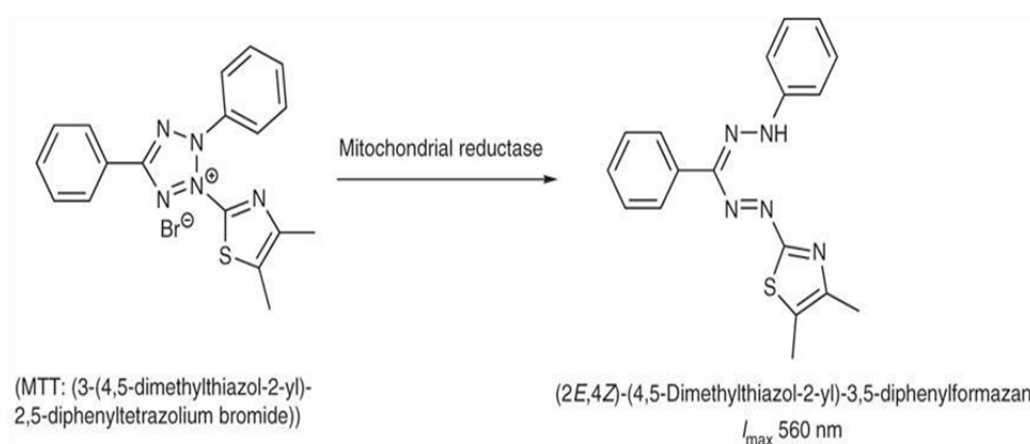


Figura 3. Estrutura química do MTT antes e depois de ser clivado na mitocôndria de células viáveis. Fonte: Ebada *et al.* (2008)

2.2.2 Genotoxicidade

A genotoxicidade é um termo amplo e refere-se a processos que alteram a estrutura, conteúdo de informação ou segregação de DNA e não está necessariamente associada à mutagenicidade. Assim, os testes de genotoxicidade incluem testes que fornecem uma indicação de dano induzido no DNA por meio de efeitos como quebras na fita do DNA, síntese de DNA não programada, troca de cromátides-irmãs, formação de adutos de DNA (formas de DNA resultantes da exposição à agentes cancerígenos) e recombinação mitótica (Araújo *et al.*, 2015b). Os dados de genotoxicidade são úteis para a determinação do modo geral de ação de uma substância [ou seja, tipo(s) de dano genotóxico induzido] e pode fornecer alguma indicação sobre a relação dose-concentração (ECHA, 2014).

2.2.2.1 Teste de Micronúcleos

Um micronúcleo (MN) (Figura 4) é um pequeno núcleo extra separado do núcleo principal, gerado durante a divisão celular por cromossomos retardatários ou por fragmentos cromossômicos (Figura 5) (Ozkul *et al.*, 2006). O teste de

micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) permite a avaliação rápida de células e baseia-se no bloqueio de citocinese, cujos linfócitos de uma amostra de sangue são cultivados e as células uma vez divididas são reconhecidas pela sua aparência binucleada após o bloqueio de citocinese com citocalasina-B (Fenech, 2000). Esse bloqueio de células em divisão no estágio binucleado torna possível reconhecer perda cromossômica, quebra cromossômica, brotos nucleares (BtN) e pontes nucleoplasmáticas (PN) (Terradas *et al.*, 2010).

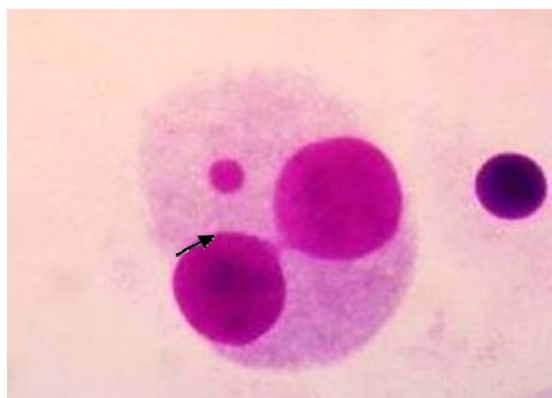


Figura 4. Célula binucleada com presença de micronúcleo (indicado pela seta). Fonte: a autora.

Segundo Fenech *et al.* (2003), os MN são morfologicamente idênticos, mas menores que os núcleos e devem apresentar as seguintes características:

- (a) o diâmetro do MN deve variar entre $1/16$ e $1/3$ do diâmetro médio dos núcleos principais, que corresponde a $1/256$ e $1/9$ da área de um dos núcleos principais em uma célula binucleada (BN), respectivamente;
- (b) devem ter a forma oval ou redonda;
- (c) por não serem refractáveis, devem ser facilmente distinguidos de artefatos, como partículas de coloração;
- (d) não podem estar ligados ou conectados aos núcleos principais;
- (e) podem tocar mas não sobrepor os núcleos principais e a membrana micronuclear deve ser distinguida da membrana nuclear;
- (f) devem ter a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais (porém, ocasionalmente a coloração pode ser mais intensa).

O CBMN permite acumular as células no estágio binucleado, independentemente da sua cinética de divisão, tornando o teste altamente sensível

(Luzhna *et al.*, 2013). A formação de MN é uma das formas que o organismo dispõe para se adaptar ao dano gerado por agentes exógenos ou endógenos mantendo a célula viável (Carrard *et al.*, 2007). Os cromossomos ou seus fragmentos não segregados permanecem no citoplasma como um pequeno núcleo. Dessa forma, o referido teste permite avaliar a atividade genotóxica de um composto, verificando a capacidade de um agente particular para induzir a formação de tais estruturas, alterando assim o processo de divisão celular e, conseqüentemente, provocando uma alteração no material genético dessas células (Araújo *et al.*, 2015b).

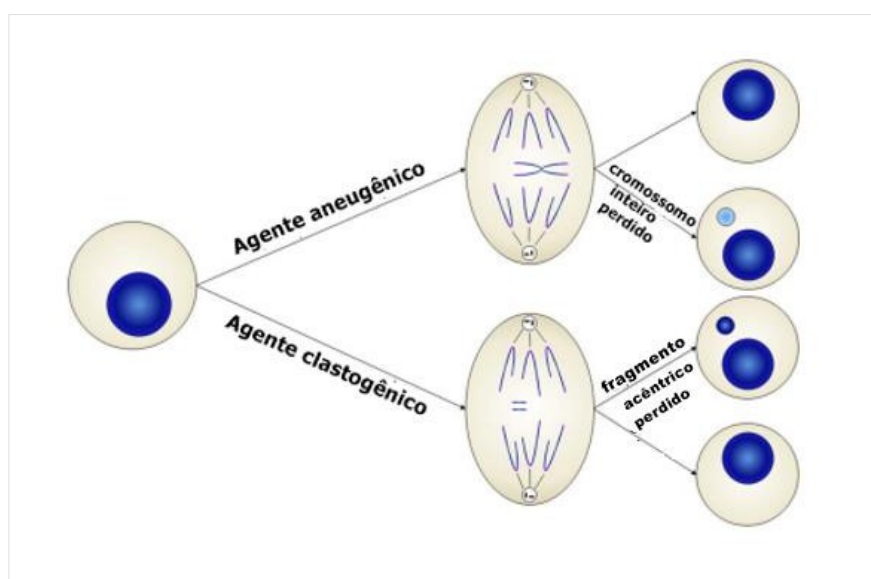


Figura 5. Esquema de formação de micronúcleos. Fonte: Adaptada de Terradas *et al.* (2010).

2.2.2.2 Teste de Metáfases

As alterações cromossômicas (ACs) são divididas em numéricas e estruturais, e o aumento de sua ocorrência indica a presença de fatores estressantes sobre um determinado tecido, órgão ou organismo (Valente *et al.*, 2016). As alterações estruturais resultam de quebras simultâneas na mesma célula, envolvendo um ou mais cromossomos, podendo originar cromossomos rearranjados, em geral com tamanho ou morfologia alterados. Tais quebras podem afetar apenas um filamento do cromossomo (cromátide), originando uma quebra cromatídica, ou ambos filamentos, produzindo uma quebra cromossômica (Figura 6) (Estécio e Silva, 2002).

Alterações cromossômicas (ACs) em linfócitos do sangue periférico também têm sido utilizadas no monitoramento de exposição genotóxica para a detecção de alterações estruturais, como fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos e em anel, quebras e gaps cromossômicos e cromatídicos, podendo este ensaio ser realizado tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Montoro *et al.*, 2012).

O teste de metáfases para culturas de células de mamíferos é um dos métodos mais fáceis e mais sensíveis na detecção de agentes mutagênicos ambientais. Nos seres humanos, o teste de linfócitos do sangue periférico *in vitro* é o mais utilizado para testar rapidamente os efeitos de um presumível agente genotóxico em culturas de curto prazo (Garcia-Sagredo, 2008).

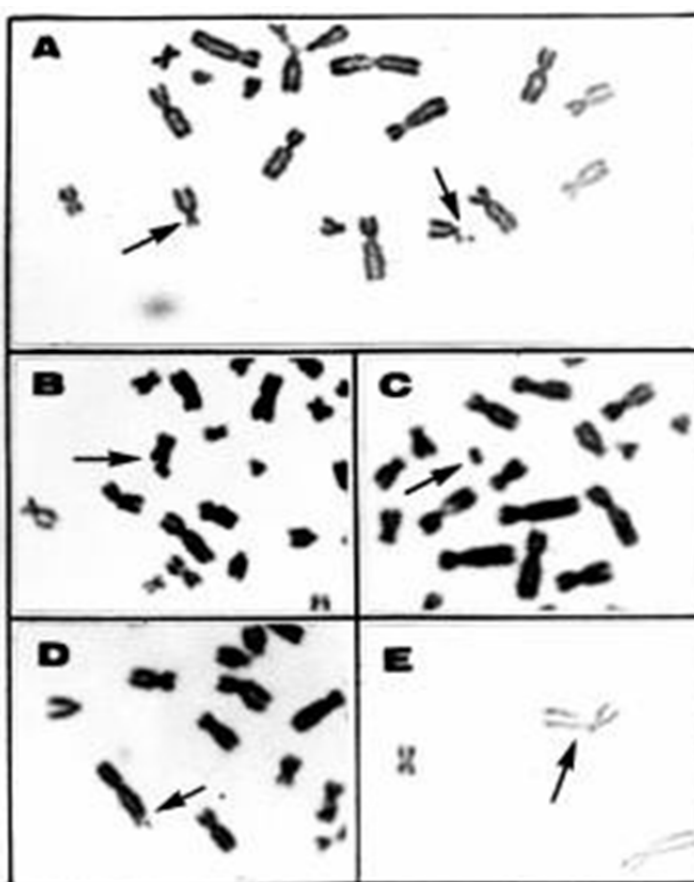


Figura 6. Metáfases parciais provenientes de linfócitos cultivados apresentando: (A), (B) e (D) quebra cromatídica; (C) fragmento acêntrico; (E) quebra cromossômica. Todas as alterações estão indicadas por seta. Fonte: Estécio e Silva (2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito citotóxico e genotóxico de diferentes concentrações do extrato da própolis vermelha de Pernambuco em células mononucleares do sangue periférico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1** Avaliar a citotoxicidade do extrato da própolis vermelha, mediante teste de viabilidade celular (MTT).
- 3.2.2** Avaliar a genotoxicidade de três concentrações do referido extrato (pré-selecionadas pelo teste de citotoxicidade), mediante teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN) e teste de metáfases.
- 3.2.3** Definir concentrações do extrato da própolis vermelha seguras para células mononucleares do sangue periférico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DA PRÓPOLIS VERMELHA

A própolis vermelha foi coletada através da raspagem de coletores sem pintura interna colocados nas colônias de abelhas *Apis mellífera* existentes em um apiário do município de Tamandaré – Pernambuco (Latitude: 08° 45' 35" S Longitude: 35° 06' 17" W) durante o período de estação chuvosa em 2014 (entre os meses de abril e agosto). A própolis vermelha bruta foi armazenada a 20 ° C e posteriormente dissolvida em uma solução hidroetanólica (etanol a 54%) durante 72 h. Passado esse tempo, o extrato foi filtrado e concentrado usando um rotoevaporador a vácuo (modelo Q-344B-Quimis, Brasil). A solução concentrada foi congelada e, em seguida, liofilizada para a obtenção de um pó fino do extrato hidroetanólico da própolis vermelha.

4.2 LOCAL, PARTICIPANTES, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A coleta do sangue periférico de quatro voluntários foi realizada no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH) do Departamento de Genética / UFPE por uma pessoa habilitada para tal procedimento. Os critérios de inclusão foram: (1) ser do sexo masculino, independentemente de raça; (2) ter idade entre 18 e 35 anos; (3) ser aparentemente saudável, e (4) ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; e os critérios de exclusão foram: (1) ser fumante, e (2) estar passando por tratamento com uso de medicamentos.

Para o candidato ao voluntariado foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, onde foi informado e esclarecido pelo pesquisador a importância e os objetivos da pesquisa. Havendo interesse, o indivíduo foi convidado a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), que explica todos os riscos e benefícios dos procedimentos utilizados durante a pesquisa.

Este estudo foi desenhado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, em sua resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e o projeto aprovado

pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde-CCS/UFPE, Nº 2.131.542 (Anexo 2).

4.3 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO

Para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), 12 mL de Sangue Venoso Periférico (SVP) foi coletado de um voluntário, por ensaio experimental, utilizando-se a metodologia de coleta de sangue à vácuo.

4.4 OBTENÇÃO DE PBMC

As PBMCs foram coletadas transferindo-se o SVP para três tubos cônicos do tipo Falcon de 15 mL contendo 3 mL de Histopaque (SIGMA) cada. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 35 min a 2400 rpm, o anel de PBMC foi removido e transferido para novos tubos cônicos com cerca de 6 mL de PBS 1x pH 7,4. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 4 mL de meio de cultura completo (RPMI: SBF; 4:1) em cada tubo. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer: 20 µL de suspensão celular e 20 µL de azul de Tripan a 0,4%. A partir da obtenção da suspensão celular final.

4.5 TESTE DO MTT

As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 em placas de 96 poços. O controle negativo (CN) consistiu apenas de meio de cultura RPMI, o controle positivo (CP) consistiu de Triton-X 100%, na concentração final de 1%, o controle de solvente (CS) constituiu de DMSO 100%, na concentração final de 1%. A própolis vermelha foi testada nas concentrações de (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 20; 30; 40; 50; 100; 150; 200; 250 e 300 µg/mL). As células foram incubadas por 24 h, em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 20 µL do corante MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, CAS No. 298-93-1 Sigma) nos poços para a concentração final de 5 mg/mL. Após 3 h de incubação, as placas foram centrifugadas por 4500 rpm durante 10 min, o material sobrenadante descartado e adicionados 100 µL de DMSO (C₂H₆OS -

dimetilsulfóxido) para a dissolução dos cristais de formazan. Imediatamente após a adição do DMSO, a microplaca foi submetida à leitura em espectrofotômetro, utilizando filtro de 570 nm. A partir do resultado da viabilidade celular, foram escolhidas três concentrações para serem testadas quanto à genotoxicidade.

4.6 TESTE DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN)

Para o CBMN, 0,5 mL de sangue periférico total foi adicionado a 4 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 1 mL de soro bovino fetal (CULTLAB), 100 µL de fitohemaglutinina (GIBCO) e 10% de estreptomicina em tubos Falcon que foram incubados a 37 °C durante 20 h. Após esse tempo, foi acrescentada a substância teste nas concentrações de 15, 30 e 60 µg/mL e incubou-se por mais 24 horas, em seguida foram adicionados aos tubos 20 µL de citocalasina B a 6 mg/mL. Os tubos permaneceram na estufa por 28 h, para que ocorresse mais um ciclo de divisão celular. Completadas 72 horas de incubação, o conteúdo dos tubos foi centrifugado por 10 min a 1050 rpm. Posteriormente, as células foram tratadas com 7 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 4 °C para lisar as células vermelhas e melhorar a visualização dos MNs, sendo novamente centrifugados pelo mesmo tempo e rotação. As células foram fixadas em Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético, v:v) e as lâminas coradas com Giemsa 5% e, posteriormente, analisadas em microscópio de luz. Para a quantificação dos MN, foram utilizados três frascos por tratamento, onde foram contadas 3.000 células binucleadas (1.000 células por repetição/tubo). Além dos micronúcleos, também foram quantificados brotos (BTN) e pontes nucleoplasmáticas (PN).

4.7 TESTE DE METÁFASES

Para a cultura de linfócitos, 0,5 mL de sangue periférico foi adicionado, com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril, em cada tubo de cultura contendo 4 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 1 mL de soro bovino fetal (CULTILAB) e 0,2 mL de fitohematoglutininina (GIBCO). Em seguida foram adicionadas as concentrações do extrato da própolis (15, 30 e 60 µg/mL). Posteriormente, os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C, durante 48 h. Após 46 h foi adicionado 0,1 mL de colchicina 0,0016% (SIGMA). A retirada de cultura foi

realizada ao completar 48 h de cultivo e o material foi centrifugado por 6 min a 1800 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 8 mL de KCL previamente aquecido a 37 °C, para a realização do choque hipotônico. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 15 min. Em seguida, foram novamente centrifugados, sempre pelo mesmo tempo e velocidade anteriormente descritos. O material devidamente fixado com metanol/ácido acético na proporção 3:1. Para análises cromossômicas as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% por 10 min.

Para cada ensaio por indivíduo, foram analisadas 100 metáfases obedecendo os seguintes critérios: a) número completo de cromossomos na metáfase ($2n = 46$); b) alinhamento das cromátides; c) cromossomos não sobrepostos; d) boa fixação e coloração das células; e) tipos de alterações cromossômicas incluindo: quebras cromossômicas, quebras cromatídicas, cromossomos em anel, perda de fragmentos (gaps), fragmentos acêntricos simples e duplos.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos testes do MTT e do micronúcleo, os resultados dos tratamentos foram comparados estatisticamente com os do controle negativo, utilizando Kruskal Wallis com teste a posteriori de teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o Programa Statistic 8. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para a atividade citotóxica (um poço como unidade experimental) e com três repetições para o teste de micronúcleo (1.000 células/tubo como unidade experimental). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

O teste ANOVA foi aplicado para verificar se houve diferenças entre o percentual de ACs nas diferentes diluições da própolis quando comparado com o resultado do grupo controle.

5 RESULTADOS

5.1 CITOTOXICIDADE

A análise da viabilidade celular do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) através do teste de MTT mostrou que concentrações de 100 µg/mL ou abaixo apresentaram viabilidade celular acima de 80%, não sendo consideradas citotóxicas em PBMC. Adicionalmente, as concentrações de 12,5 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL aumentaram a viabilidade celular em relação ao controle negativo, ou seja, acima de 100%. Em contrapartida, a partir da concentração de 150 µg/mL a viabilidade celular foi reduzida com o aumento da concentração do extrato, sendo consideradas citotóxicas (Figura 7).

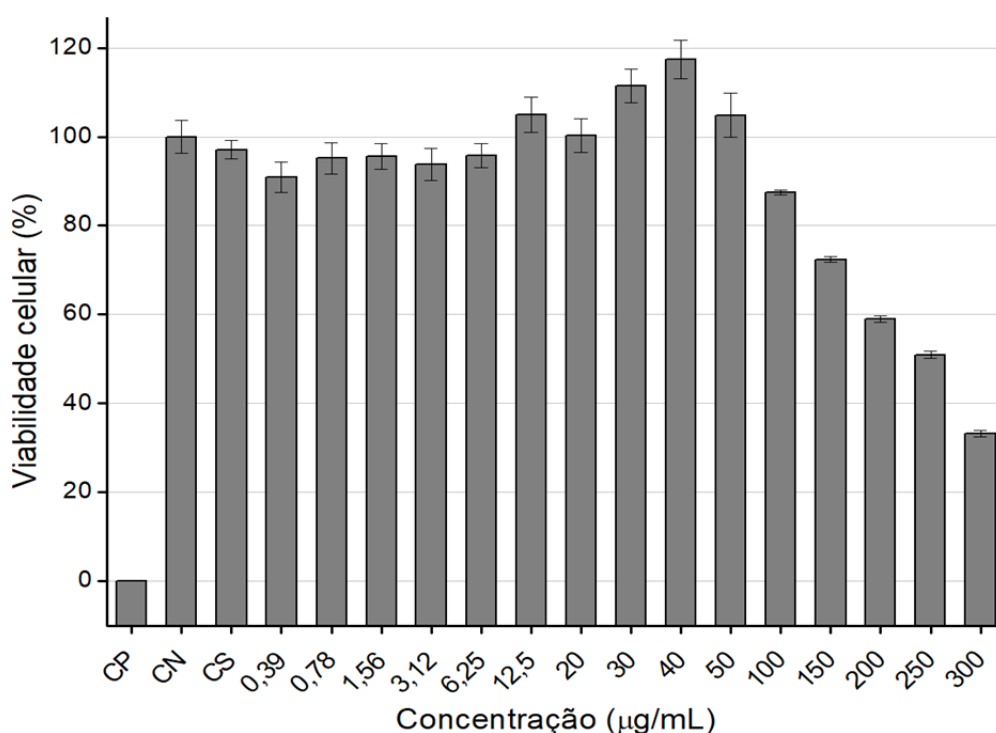


Figura 7. Análise citotóxica baseada na viabilidade celular do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV), mediante teste de MTT (n = 5). CP: Controle positivo (Triton-X 100%, a 1%). CN: Controle negativo (meio de cultura). CS: Controle de solvente (DMSO 1%).

5.2 GENOTOXICIDADE

5.2.1 Teste de Micronúcleos

A partir da análise da viabilidade celular foram escolhidas três concentrações do EHPV para serem testadas quanto ao seu potencial efeito genotóxico: 30 µg/mL (concentração usada comercialmente e na medicina popular) que apresentou 111,4% de viabilidade, a sua metade e o seu dobro, 15 µg/mL e 60 µg/mL, respectivamente.

Os resultados do teste de CBMN, analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, mostraram que houve aumento significativo no número de células binucleadas com presença de micronúcleos para a concentração de 60 µg/mL quando comparado ao CN e à concentração de 15 µg/mL. Por outro lado, as concentrações de 30 e 15 µg/mL foram semelhantes estatisticamente a CN, mostrando ausência de genotoxicidade para as referidas concentrações (Tabela 2).

Tabela 2. Média, desvio padrão e frequência do número de micronúcleos e de brotos observados para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em linfócitos do sangue periférico (1.000 células/repetição, n =3).

Tratamento (µg/mL)	N. células com micronúcleos (Média ± Desvio)	Micronúcleos (%)	N. células com brotos Média ± Desvio	Brotos (%)
CN	1,00 ± 1,00	0,10	0,33 ± 0,58	0,03
CP	9,33 ± 3,51*	0,93	2,00 ± 1,00	0,17
15	1,67 ± 0,58	0,17	1,00 ± 0,00	0,10
30	2,00 ± 1,00	0,20	0,67 ± 0,58	0,07
60	4,67 ± 1,53*	0,47	0,00 ± 0,00*	0,00

CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS). Médias seguidas de asterisco preto (*), na coluna, diferem estatisticamente em relação ao CN pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e seguidas de asterisco vermelho (*) diferem estatisticamente em relação a CP pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os MN foram também observados em células tri e tetranucleadas, ocorrendo também a presença de mais de um micronúcleo por célula (Figura 8), porém esses dados não foram analisados estatisticamente por não serem de grande ocorrência na amostra.

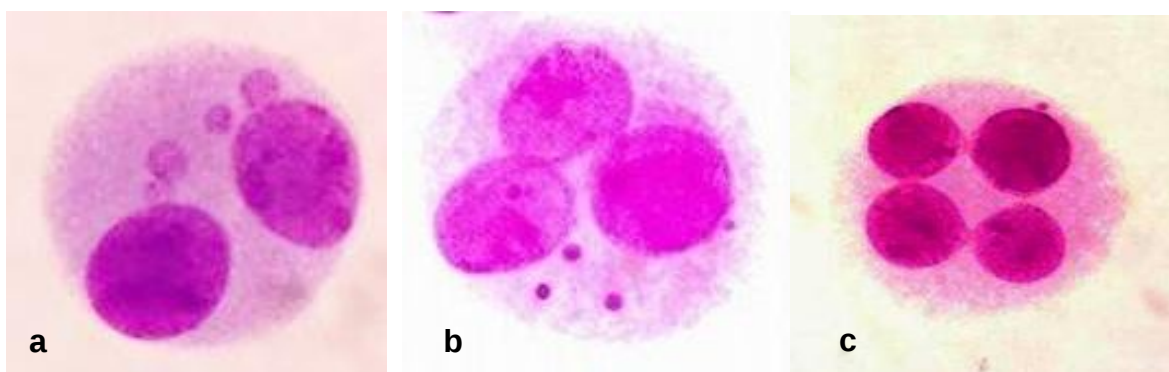


Figura 8. Células bi (a), tri (b) e tetranucleadas (c) com a presença de um ou mais micronúcleos.

Outra alteração observada foi a formação de brotos (Figura 9a), os quais também foram analisados estatisticamente e o resultado só foi significativo ao comparar o CP e a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando uma diminuição no número de sua ocorrência nesta concentração em relação ao controle positivo, resultado este já esperado pelo fato do MMS ser um conhecido indutor de danos ao DNA (Tabela 2). Por outro lado, não houve, dentre as células analisadas nos tratamentos referentes às três concentrações testadas, a formação de ponte nucleoplasmática (Figura 9b), sendo observada apenas em uma célula tetranucleada do CP.

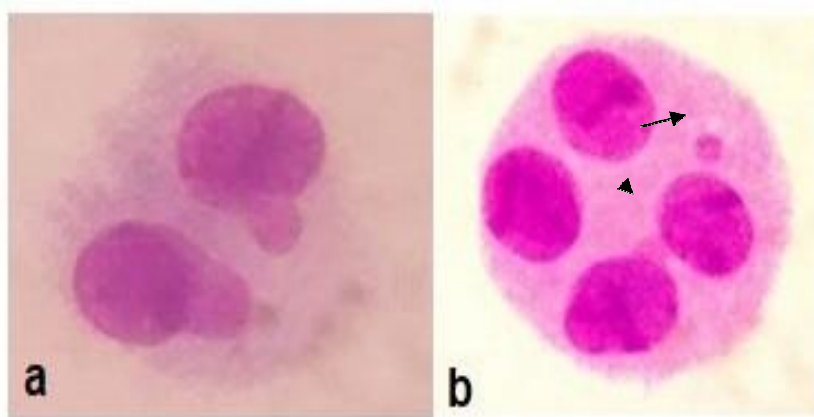


Figura 9. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) submetidas à própolis vermelha (a) ou ao MMS (b). (a) Célula binucleada com a presença de brotos. (b) Célula tetranucleada com a presença de um MN (seta preta) e uma ponte nucleoplasmática (cabeça de seta).

5.2.2 Teste de Metáfases

Os resultados obtidos pelo teste de metáfases estão detalhados na Tabela 3 e os tipos de ACs encontradas estão mostrados na Figura 10. Os tipos de ACs mais observadas, em todos os tratamentos de todos os doadores, foram os fragmentos cromossômicos simples e duplos, seguidos dos gaps cromatídicos. Quatro anéis cromossômicos foram observados em todo o experimento, sendo dois deles no CN, um na concentração de 15 µg/mL e um na concentração de 30 µg/mL (Tabela 3).

A concentração de 15 µg/mL foi a que apresentou o maior número de ACs, totalizando 35 alterações, estando ausente apenas o gap cromossômico, que só foi observado na concentração de 30 µg/mL.

Apesar da existência de várias ACs quando os resultados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA, o mesmo mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 3. Números e tipos de alterações cromossômicas observadas para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em metáfases mitóticas do sangue periférico de quatro doadores. CN: controle negativo; CS: controle de solvente (DMSO).

Tratamento	Tipos de alterações							Total de alterações
	Gap cromatídico	Gap cromossômico	Quebra cromatídica	Quebra cromossômica	Anel	Fragmento acêntrico simples	Fragmento acêntrico duplo	
Doador 1								
CN	2		1			1		4
CS			2					2
15 µg/mL	3		3	1	1			8
30 µg/mL	1	1		1				3
60 µg/mL	3		2			1	2	8
Doador 2								
CN								-
CS	2		1			1	2	6
15 µg/mL	2		2			1	1	6
30 µg/mL	1		1			3		5
60 µg/mL						1		1
Doador 3								
CN			2		1		2	5
CS	2					1	1	4
15 µg/mL	1		1			6	3	11
30 µg/mL	4		1	1		3	2	11
60 µg/mL	2		2			2	4	10
Doador 4								
CN	2				1	2	1	6
CS						2		2
15 µg/mL	3		3			2	2	10
30 µg/mL	1			1	1		1	4
60 µg/mL	3					3		6

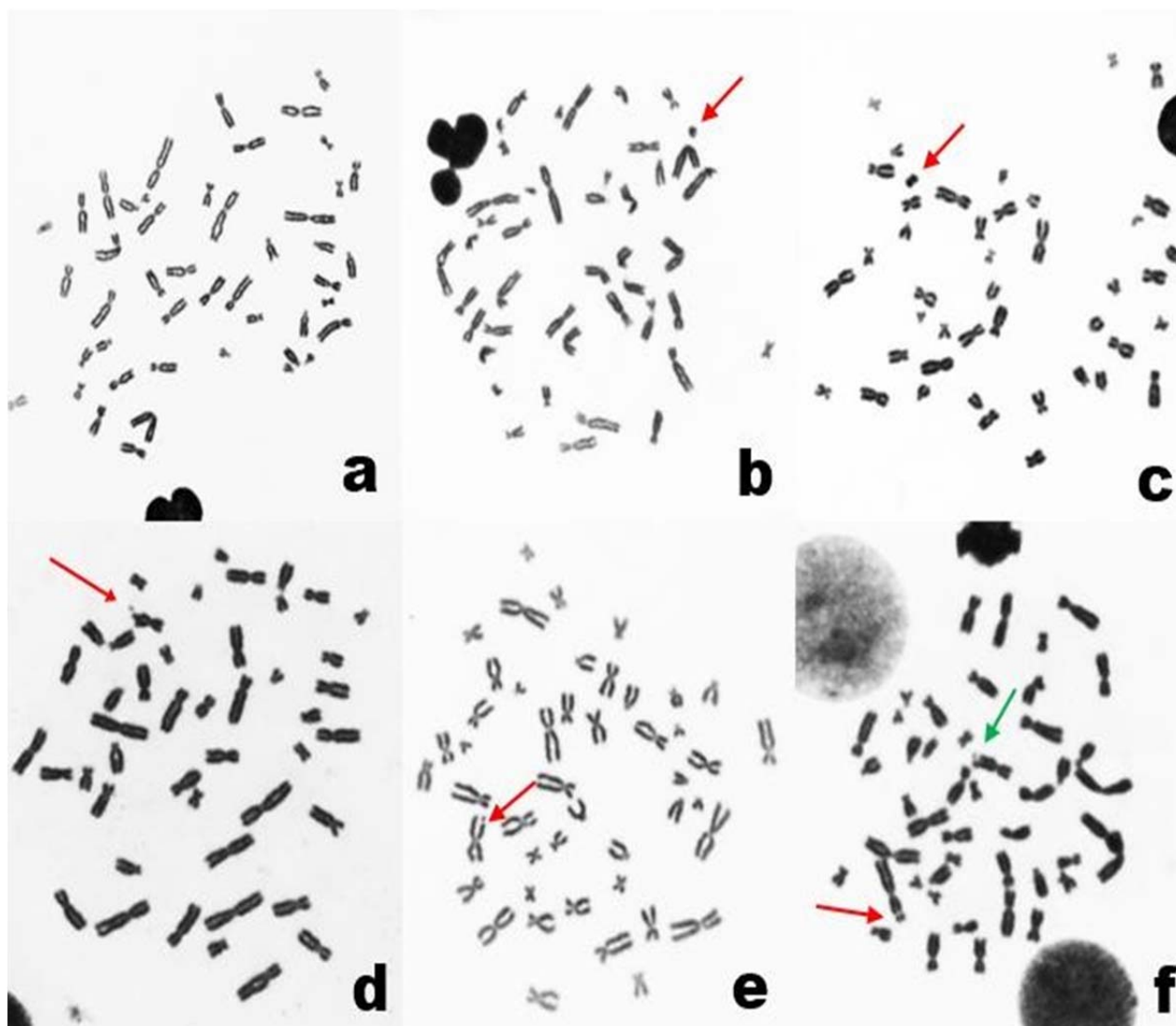


Figura 10. Metáfases mitóticas. (a) Metáfase normal (46,XY), (b-f) Alterações cromossômicas (b) cromossômico em anel; (c) Fragmento cromossômico duplo; (d) Fragmento simples; (e) Gap cromatídico; (f) Quebras cromatídica (seta verde) e cromossômica (seta vermelha).

Tabela 4. Média, desvio padrão e frequência do número de alterações cromossômicas observadas para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em metáfases mitóticas do sangue periférico.

Tratamento (µg/mL)	Média ± Desvio	Frequência de ACs
CN	3,75 ± 2,69	0,15%
CS	3,5 ± 1,91	0,14%
15	8,75 ± 2,21	0,35%
30	5,75 ± 3,59	0,23%
60	6,25 ± 3,86	0,25%

CN: controle negativo; CS: controle de solvente (DMSO).

Dentre os grupos de cromossomos, o que mais apresentou alterações foi o grupo A constituído pelos maiores cromossomos do cariótipo humano, seguido pelo grupo C. Os cromossomos do grupo B e do grupo D apresentaram quatro alterações e apenas uma alteração foi observada em um cromossomo do grupo E. Não foram observadas alterações nos menores cromossomos do cariótipo, grupos F e G (Tabela 5).

Tabela 5. Número de ACs observadas para diferentes concentrações do Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha em metáfases mitóticas do sangue periférico.

Grupo cromossômico	Nº de cromossomos com alterações (Média/ grupo cromossômico)
A (pares 1, 2, e 3)	23 (7,67)
B (pares 4 e 5)	4 (2)
C (pares 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e cromossomo X)	15 (1,88)
D (pares 13, 14 e 15)	4 (1,33)
E (pares 16,17 e 18)	1 (0,33)

6 DISCUSSÃO

Devido às suas diversas propriedades biológicas, a própolis tem sido cada vez mais utilizada pela população, seja como medicamento alternativo (concentração usualmente comercializada a 30 µg/mL) ou como alimento. Com base no uso crescente e indiscriminado da própolis, tornou-se de extrema importância a investigação de possíveis malefícios ou os chamados “efeitos colaterais” provocados pela própolis vermelha, a qual ainda é muito pouco conhecida cientificamente.

No presente estudo foi possível observar que a citotoxicidade do EHPV deu-se apenas nas concentrações mais altas testadas (a partir de 150 µg/mL). Resultados semelhantes foram descritos em diversos estudos realizados para amostras de própolis vermelha de outras localidades do nordeste do Brasil. No trabalho de Lio *et al.* (2012) foram testadas concentrações de 2 a 40 µg/mL da própolis vermelha do Nordeste brasileiro em macrófagos humanos e nenhuma delas mostrou-se citotóxica. Da mesma forma, o EHPV do estado de Alagoas foi testado por Bueno-Silva *et al.* (2017) nas concentrações de 50 a 80 µg/mL em macrófagos peritoneais de ratos e nenhuma destas concentrações desempenhou uma ação citotóxica.

As concentrações do EHPV testadas neste trabalho que apresentaram viabilidade celular acima de 100% indicam que houve proliferação das células testadas. Este fato pode ser explicado por um possível efeito mitogênico. Frozza *et al.* (2013) analisaram o EHPV do estado de Sergipe em duas linhagem tumorais: HeLa (células de adenocarcinoma cervical humano) e Hep-2 (células de carcinoma epidermoide da laringe humana – reclassificada como derivada de células HeLa) e uma linhagem normal: Hek-293 (células epiteliais de rim embrionário humano) em concentrações que variavam de 50 a 150 µg/mL e concluíram que o EHPV foi citotóxico apenas para as linhagens tumorais, demonstrando um possível efeito citotóxico seletivo para células tumorais.

O poder inibitório da própolis no crescimento de uma variedade de células tumorais, através da apoptose, foi descrita por Franchi Jr *et al.* (2012) e Frión-Herrera *et al.* (2015; 2017). Isto tem sido atribuído à presença de diferentes compostos químicos e suas possíveis interações farmacológicas. Adicionalmente,

Frión-Herrera *et al.* (2017) analisaram a própolis vermelha de Cuba (PC) (de mesma origem botânica (*Dalbergia ecastophyllum*) que a própolis vermelha de Pernambuco) e compararam com a própolis verde brasileira (PB) (tendo como origem botânica a espécie *Baccharis dracunculifolia*) sobre células do carcinoma humano da laringe (Hep-2). Os autores descreveram um poder citotóxico cerca de 3x maior para a PC (nas concentrações de 50 e 100 µg/mL) quando comparado com a PB, ambos os extratos aumentaram drasticamente a expressão gênica de *TP53*, *CASP3*, *BAX* e *P21*, reforçando a hipótese de que os efeitos da própolis, ao regular a expressão gênica e / ou a modulação de produtos gênicos, podem estar relacionados à sua composição química, a qual é altamente dependente da flora onde a própolis foi coletada.

Os seguintes compostos químicos foram descritos na própolis vermelha de Pernambuco, analisada no presente estudo, por Regueira-Neto *et al.* (2017): rutin, ácido p-coumarico, quercetina, luteolina, ácido cafeico, apigenina, ácido clorogênico, ácido elágico e vitexina, sendo os quatros últimos compostos descritos pela primeira vez. Um dos compostos mais abundantes na amostra de própolis estudada foi o ácido p-coumarico, que apresenta efeito protetor de acordo com Sharma *et al.* (2017) em um estudo *in vivo* com lesões pré-cancerígenas do colo uterino de ratos causadas pela dimetilhidrazina (composto químico semelhante à amônia). O comprovado efeito protetor exercido pelo ácido p-coumarico pode ser uma explicação para a proliferação celular de PBMCs tratadas com a própolis vermelha no nosso estudo.

Por outro lado, a atividade genotóxica da própolis vermelha sobre as células do sangue periférico humano ocorreu em uma concentração bem menor do que a concentração considerada citotóxica. Não houve diferença significativa ao comparar a concentração de 60 µg/mL com o controle positivo, indicando que a própolis pode ser tão genotóxica quanto o MMS, um indutor de danos ao DNA bastante conhecido. É importante destacar que a própolis vermelha na sua maior concentração testada (60 µg/mL) mostrou uma frequência de micronúcleos 4,6 vezes maior que o controle negativo. Entretanto, a concentração de 30 µg/mL (usualmente utilizada na medicina popular e vendida comercialmente), ou abaixo não apresentou um potencial genotóxico.

O efeito genotóxico da própolis também foi observado para extrato de própolis oriundo da Turquia em concentrações que variavam de 0,01 a 1 mL,

mediante teste de micronúcleos em células do sangue periférico. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de própolis aumentou a taxa de micronúcleos em uma proporção de até três vezes maior que o controle (Ozkul *et al.*, 2005). Por outro lado, análises *in vivo* e *in vitro* de amostras do extrato aquoso de própolis verde usando teste de micronúcleos, nas concentrações de 3,12 a 400 µg/mL, demonstraram ausência de genotoxicidade desses extratos em baixas concentrações (até 50 µg/mL) (Rocha *et al.*, 2013). Os referidos autores também demonstraram que ambos os extratos aquoso e etanólico da própolis verde são quimicamente similares, mesmo sendo provenientes de diferentes estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina). Esses resultados foram corroborados no nosso trabalho, onde em concentrações de 30 µg/mL do EHPV ou abaixo não foi observada genotoxicidade.

Através da análise de alterações cromossômicas foi possível verificar que o extrato hidroetanólico da própolis vermelha de Pernambuco não mostrou genotoxicidade nas três concentrações testadas. Houve um pequeno aumento no número de ACs quando comparadas aos controles, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. De modo semelhante, um aumento no número de ACs em células CHO tratadas com extrato da própolis verde de Minas Gerais nas concentrações de 1,2; 2,4 e 3,6% também foi observado por Senedese *et al.* (2008), porém esses valores não foram estatisticamente significantes, excluindo o risco de genotoxicidade do referido extrato.

O tipo de ACs mais observadas no presente estudo foram os fragmentos acêntricos seguidos por gaps e quebras. Este achado corrobora com um estudo de Montoro *et al.* (2012) que investigaram o potencial genotóxico da própolis oriunda da Espanha em concentrações que variavam de 20 a 2.000 µg/mL através de dois testes distintos: o teste de alterações cromossômicas e o teste de troca de cromátides-irmãs (SCEs). O resultado deste estudo classificou a própolis como genotóxica a partir de 750 µg/mL pelo teste de ACs, onde as alterações mais prevalentes foram os fragmentos acêntricos, e 500 µg/mL pelo teste de SCEs.

No nosso trabalho foi possível detectar que as alterações cromatídicas, presentes em apenas uma das cromátides-irmãs, prevaleceram em relação às alterações cromossômicas, que estão presentes em ambas as cromátides. A prevalência dessas alterações cromatídicas podem indicar que o extrato da própolis

testado age mais facilmente em regiões que estão se duplicando no momento da exposição.

O cariótipo humano possui 46 cromossomos agrupados de A à G, do maior para o menor. Cada cromossomo possui áreas denominados de sítios frágeis, os quais são loci específicos exibindo uma instabilidade do cromossomo após inibição parcial da síntese do DNA. Esses sítios frágeis são normalmente estáveis em células cultivadas, mas podem apresentar-se através de gaps e quebras nos cromossomos em metáfase sob certas condições de cultura ou por tratameto com agentes químicos específicos (Durkin e Glover, 2007). Mais de 100 sítios frágeis foram identificados no genoma humano, classificados como comuns ou raros, dependendo da sua frequência na população (Wang, 2006).

Os cromossomos do grupo A (1, 2 e 3), os maiores cromossomos do cariótipo humano, juntamente com os cromossomos do grupo C, possuem uma maior quantidade de sítios frágeis, isso os deixam mais suscetíveis aos danos ao material genético. Este fato pode ser evidenciado neste estudo que demonstrou uma maior ocorrência de ACs nos cromossomos destes grupos.

Este é o primeiro estudo no que diz respeito ao potencial genotóxico da própolis vermelha de Pernambuco. No Brasil, a própolis melhor estudada é a própolis verde e diversos autores comprovaram a ausência de genotoxicidade em baixas concentrações. Tavares *et al.* (2006) avaliaram o extrato etanólico da própolis verde em células de ovário de hamster nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL e concluíram que a genotoxicidade só foi evidenciada na maior concentração testada. Resultados semelhantes foram observados por Pereira *et al.* (2008) que testaram a própolis verde *in vivo* e concluíram que a mesma só demonstrou genotoxicidade em concentrações acima de 1.500 mg/mL.

A partir dos nossos resultados, sugerimos que a utilização do extrato hidroetanólico da própolis vermelha em concentrações até 30 µg/mL é considerada segura, porém, o aumento da sua concentração pode induzir possíveis efeitos genotóxicos, como observados na concentração de 60 µg/mL pelo teste de MN.

7 CONCLUSÕES

1. O extrato etanólico da própolis vermelha de Pernambuco para a utilização humana, apresenta citotoxicidade em células do sangue periférico apenas em concentrações acima de 150 µg/mL.
2. No que diz respeito ao potencial genotóxico do extrato da própolis vermelha pelo teste de micronúcleos, a concentração considerada segura para seu uso é menor que a do teste citotóxico (30 µg/mL).
3. O extrato hidroetanólico da própolis vermelha nas três concentrações testadas não é considerado genotóxico pelo teste de metáfases.
4. A prevalência das alterações cromossômicas nos cromossomos dos grupos A e C indicam que o EHPV age mais facilmente nos sítios frágeis (regiões de maior instabilidade cromossômica).
5. O uso de extrato da própolis vermelha em concentrações até 30 µg/mL (concentração usualmente comercializada) é aparentemente seguro.

REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência de Vigilância Sanitária. **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Resolução RE 90, pp 2–5. 2004.

ARAÚJO S.D.S., FERNANDES T.C., MARIN-MORALES M.A., BRASILEIRO-VIDAL A.C.; BENKOISEPPON AM. **Mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity assays of medicinal plants: first step for drug development**. In: Duarte MCT e Rai M (eds) *Therapeutic Medicinal Plants: From lab to the market*, Taylor e Francis Group, US, pp 130-153. 2015a.

ARAÚJO S.S., BENKO-ISEPPON A.M., BRASILEIRO-VIDAL A.C. **Genotoxicity and Mutagenicity Assays for Selection of Chemical Compounds with Therapeutic Potential: A Short Commentary**. *Biochem Anal Biochem* 4: 208. 2015b.

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

BANKOVA V. **Chemical diversity of propolis and the problem of standarzation**. *J of Ethnopharmacology* 100: 114-117. 2005.

BANSKOTA A.H., TEZUKA Y., ADNYANA I.K., MIDORIKAWA K., MATSUSHIGE K., MESSAGE D., HUERTAS A.A.G., KADOTA S. **Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China**. *J of Ethnopharmacology* 72: 239–246. 2000.

BARBARIC M., MISKOVIC K., BOJIC M., LONCAR M.B., SMOLCIC-BUBALO A., DEBELJAK Z., MEDIC-SARIC M. **Chemical composition of the ethanolic própolis extracts and its effect on HeLa cells**. *J of Ethnopharmacology* 135: 772-778. 2011.

BOLETIM: **O mercado da própolis**. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/\\$File/4612.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf). Acesso em: 19 fev.2018.

BUENO-SILVA B., KAWAMOTO D., ANDO-SUGUIMOTO E.S., CASARIN R.C.V., ALENCAR S.M., ROSALEN P.L., MAYER M.P.A. **Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression**. *J of Ethnopharmacology* 207: 100-107. 2017.

BURDOK G.A. **Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis)**. *Food and Cheml Toxicol* 36: 347–363. 1998.

CABRAL I.S.R., OLDONI T.L.C., PRADO A., BEZERRA R.M.N., ALENCAR S.M. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira**. *Quim. Nova* 32: 1523-1527. 2009.

CARRARD V.C., COSTA C.H., FERREIRA L.A., LAUXEN I.S., RADOS P.V. **Teste**

dos Micronúcleos – Um biomarcador de Dano Genotóxico em Células da Mucosa Bucal. R.Fac. Odontol. Porto Alegre, 48: 77-81. 2007.

CASTALDO S., CAPASSO F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** Fitoterapia 73: Suppl. S1-S6. 2002.

CORRÊA F.R.S., SCHANUEL F.S., MOURA-NUNES N., MONTE-ALTO-COSTA A., DALEPRANE J.B. **Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NF κ B.** Biomed & Pharmacotherapy 86: 162–171. 2017.

DAUGSCH A., MORAES C.S., FORT P., PARK Y.K. **Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin.** eCAM 5: 435-441. 2008.

DE MENDONÇA I.C.G., PORTO I.C.C.M., NASCIMENTO T.G., SOUZA N.S., OLIVEIRA J.M.S., ARRUDA R.E.S., MOUSINHO K.C., SANTOS A.F., BASÍLIO-JÚNIOR I.D., PAROLIA A., BARRETO F.S. **Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells.** BMC Complementary and Alternative Medicine 15: 357. 2015.

DURKIN S.G., GLOVER T.W. **Chromosome fragile sites.** Annu. Rev. Genet. 41:169–92. 2007.

ECHA **European Chemicals Agency Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment.** Chapter R.7a: Endpoint specific guidance, version 6.0. 2017.

ESTÉCIO M.R.H., SILVA A.E. **Chromosome abnormalities caused by computer video display monitor's radiation.** Rev Saúde Pública 36: 330-336.2002.

ESTUDO DE MERCADO: **Agronegócios: produção de própolis.** Disponível em: <https://m.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/BA/Anexos/Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20pr%C3%B3polis%20na%20Bahia.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2018.

FENECH M. **The in vitro micronucleus technique.** Mut Res 455: 81–95. 2000.

FRANCHI-JR G.C., MORAES C.S., TORETI V.C., DAUGSCH A., NOWILL A.E., PARK Y.K. **Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012: 1-6. 2012.

FRIÓN-HERRERA Y., DÍAZ-GARCÍA A., RUIZ-FUENTES J., RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ H., SFORCIN J.M. **Mechanisms underlying the cytotoxic effect of propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma cells.** Natural Product Res 8: 1-7. 2017.

FROZZA C.V.S., GARCIA C.S.C., GAMBATO G., SOUZA M.D.O., SALVADOR M., MOURA S., PADILHA F.F., SEIXAS F.K., COLLARES T., BORSUK S., DELLAGONTIN O.A., HENRIQUES J.A.P., ROESCH-ELY M. **Chemical**

characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. Food and Chem Toxicol 52: 137-142. 2013.

FUCIC A., ZNAOR A., STRNAD M., VAN-DER-HEL O., ALEKSANDROV A., MISKOV S., GRAH J., SEDLAR M., JAZBEE A.M., CEPPI M., VEMEULEN R., BOFFETTA P., NORPPA H., BONASSI S. **Chromosome damage and cancer risk in the workplace: The example of cytogenetic surveillance in Croatia.** Toxicol Letters 172: 4-11. 2007.

GARCIA-SAGREDO J.M. **Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology.** Biochim & Biophys Acta 1779: 363–375. 2008.

GEKKER G., HU S., SPIVAK M., LOKENSGARD J.R., PETERSON P.K. **Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4⁺ lymphocyte and microglial cell cultures.** J of Ethnopharmacology 102:158–163. 2005.

KUJUMGIEV A., TSVETKOVA I., SERKEDJIEVA Y., BANKOVA V., CHRISTOV R., POPOV S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** J of Ethnopharmacology 64: 235–240. 1999.

LI F., AWALE S., TEZUKA Y., KADOTA S. **Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship.** Bioorganic & Med Chemistry 16: 5434-5440. 2008.

LIO A., OHGUCHI K., MARUYAMA H., TAZAWA S., ARAKI Y., ICHIHARA K., NOZAWA Y., ITO M. **Ethanol extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages.** Phytomedicine 19: 383-388. 2012.

LOPEZ B.G.C., DE LOURENÇO C.C., ALVES D.A., MACHADO D., LANCELLOTTI M., SAWAYA A.C.H.F. **Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use.** J of Applied Microb 119: 677-687. 2015.

LUZHNA L., KATHIRIA P., KOVALCHUK O. **Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond.** Frontiers in Genetics 4: 131-147. 2013.

MACHADO B.A.S., CRUZ L.S., NUNES S.B., GUEZ M.A.U., PADILHA F.F. **Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil.** Revista Geintec, 2: 221-235. 2012.

MARCUCCI M.C., FERRERES F., GARCIA-VIGUERA C., BANKOVA V.S., DE CASTRO S.L., DANTAS A.P., VALENTE P.H., PAULINO N. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** J of Ethnopharmacology, 74: 105-112. 2001.

MATA V.P., COSTA MA.P.C., MORAIS D.V., CARVALHO C.A.L. **Germinação de sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) TAUBERT sob diferentes**

temperaturas. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia 10: 1832-1844. 2014.

MONTORO A., SORIANO J.M., BARQUINERO J.F., ALMONACID M., MONTORO A., VERDÚ G., SAHUQUILLO V., VILLAESCUSA J.I., SEBASTIÀ N. **Assessment *in vitro* of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes.** Food and Chem Toxicol 50: 216-221. 2012.

NOEL S., KASINATHAN M., RATH S.K. **Evaluation of apigenin using *in vitro* cytochalasin blocked micronucleus assay.** Toxicol In Vitro 20: 1168-1172. 2006.

OZKUL Y., SILICI S., ENOGLU E. **The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes cultures.** Phytomedicine 12: 742-747. 2005.

OZKUL Y., EROGLU H.E., OK E. **Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes.** Pharmazie 61: 638-640. 2006.

PARK Y.K., ALENCAR S.M., MASAHARU F.F. **A origem do conhecimento do homem sobre as virtudes alimentícias, curativas e profiláticas dos produtos das abelhas é bastante curiosa e interessante.** Revista OESP – Alimentação, São Paulo, 27: 110-115. 1999.

PEREIRA A.D., ANDRADE S.F., SWERTS M.S.O., MAISTRO E.L. **First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test.** Food and Chem Toxicol 46: 2580–2584. 2008.

REGUEIRA-NETO M.S., TINTINO S.R., SILVA A.R.P., COSTA M.S., BOLIGON A.A., MATIAS E.F.F., BALBINO V.Q., MENEZES I.R.A. **Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening.** Food and Chem Toxicol xxx: 1-9. 2017.

ROBERTO M.M., MATSUMOTO S.T., JAMAL C.M., MALASPINA O., MARIN-MORALES M.A. **Evaluation of the genotoxicity / mutagenicity and antigenotoxicity / antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by *in vitro* study with HTC cells.** Toxicol in Vitro 33: 9-15. 2016.

ROCHA B.A., BUENO P.C.P., VAZ M.M.O.L.L., NASCIMENTO A.P., FERREIRA N.U., MORENO G.P., RODRIGUES M.R., COSTA-MACHADO A.R.M., BARIZON E.A., CAMPOS J.C.L., OLIVEIRA P.F., ACÉSIO N.O., MARTINS S.P.L., TAVARES D.C., BERRETTA A.A. **Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology an *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy and Safety Characterisation.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013: 1-11. 2013.

SENEDESE J.M., RODRIGUES A.R., FURTADO M.A., FAUSTINO V.D., BARRETTA A.A., MARCHETTI J.M., TAVARES D.C. **Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in tropical pharmaceutical formulations on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011: 1-7. 2011.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL (SENAR). **Abelhas *Apis mellifera*: instalação do apiário** 2.ed. Centro Interamericano para el Desarrollo del Conocimiento en la Formación Profesional. Brasília: SENAR, 2010. Disponível em: <http://www.oitcinterfor.org/sites/default/files/141_abelhas.pdf> Acesso em: 19 fev. 2018.

SHARMA S.H., CHELLAPPAN D.R., CHINNASWAMY P., NAGARAJAN S. **Protective effect of p-coumaric acid against 1,2 dimethylhydrazine induced colonic preneoplastic lesions in experimental rats**. Biomedicine & Pharmacotherapy 94: 577–588. 2017.

SILVA R.O., ANDRADE V.M., RÊGO E.S.B., DÓRIA G.A.A., LIMA B.S., SILVA F.A., ARAÚJO A.A.S., ALBUQUERQUE-JR R.L.C., CARDOSO J.C., GOMES M.Z. **Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats**. J of Ethnopharmacology 170: 66–7168. 2015.

SOUZA V.C., LORENZI H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa. 2005.

TAVARES D.C., BARCELOS G.R.M., SILVA L.F., TONIN C.C.C., BASTOS J.K. **Propolis- induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells**. Toxicology in Vitro 20: 1154-1158. 2006.

TERRADAS M., MARTÍN M., TUSELL L., GENESCÀ A. **Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?**. Mutation Res 705: 60-67. 2010.

TORETI V.C., SATO H.H., PASTORE G.M., PARK Y.K. **Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013: 1-13. 2013.

TURKEZ H., YOUSEF M.I. **Propolis Ameliorates Human Peripheral Blood Lymphocytes from DNA damage caused by Aflatoxin B₁**. J. Biol. Environ. SCI. 3: 77-80. 2009.

UMTHONG S., PHUWAPRAISIRISAN P., PUTHONG S., CHANCHAO C. **In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cells lines**. BMC Complementary and Alternative Medicine 2011: 11-37. 2011.

VALENTE D., COSTA-AMARAL I.C., CARVALHO L.V.B., SANTOS M.V.C., CASTRO V.S., RODRIGUES A.F.R., FALCÃO A., SILVA C.B., NOGUEIRA S.M., GONÇALVES E.L., MOREIRA J.C., ANDRÉ L.C., TEIXEIRA L.R., SARCINELLI P.N., SISENANDO H.A., OLIVEIRA M.S., PERINI J.A., MATTOS R.C.O.C., LARENCIS A.L. **Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina**. Rev Bras de Saúde Ocupacional 42: 2317-6369. 2017.

VARANDA E.A. **Atividade mutagênica de plantas medicinais**. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl 27: 1-7. 2006.

WANG Y. **Chromatin structure of human chromosomal fragile sites**. Cancer Letters 232: 70–78. 2006.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Biociências – Departamento de Genética
Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa intitulado **“Investigação *in vitro* do potencial citotóxico e genotóxico do extrato da própolis vermelha do estado de Pernambuco”**, que está sob a responsabilidade da aluna de Pós-Graduação Juliana Vieira de Barros, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Departamento de Genética – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco. CEP: 50670-901. Telefone: (81) 9.98793064. Email: judebarros@hotmail.com. Também colaboram com este projeto: José Rafael da Silva Araújo. Telefone: (86) 99038100]. Este projeto está sob a orientação de Neide Santos. Telefone: (81) 9991455405. E-mail: santos_neide@yahoo.com.br.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- O objetivo desse estudo é avaliar possíveis danos causados pelo uso do extrato da própolis vermelha de Pernambuco sobre células do sangue, coletadas de indivíduos do sexo masculino homens, com idade entre 18 e 35 anos, aparentemente saudável, não fumante, e que não esteja passando por tratamento com uso de medicamentos.
- Para realização desses testes, o voluntário precisará fornecer a amostra de 12 mL de sangue apenas uma vez ao longo da pesquisa.
- **RISCOS:** O surgimento de hematomas após a coleta de sangue pode ocorrer. Recomenda-se evitar: a flexão do braço em que foi feita a coleta, massagear o local ou fazer esforço físico no período posterior à coleta. Se houver aparecimento de hematomas, será realizada uma compressa de gelo por quinze minutos a cada hora durante as seis primeiras horas seguintes à coleta. Em seguida, compressas mornas poderão ser colocadas no local para o desaparecimento do hematoma. Se houver qualquer outra reação ou dor no local, o colaborador será encaminhado ao médico.
- **BENEFÍCIOS:** A presente pesquisa contribuirá para a avaliação de risco do uso de subprodutos do extrato da própolis vermelha, que são utilizados, dentre outras formas, na medicina popular.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados

nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivos no computador do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), sob a responsabilidade da pesquisadora/professora Neide Santos, no endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Departamento de Genética – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco. CEP: 50670-901, pelo período mínimo de 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do projeto intitulado **“Investigação *in vitro* do potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico do extrato da própolis vermelha do estado de Pernambuco”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

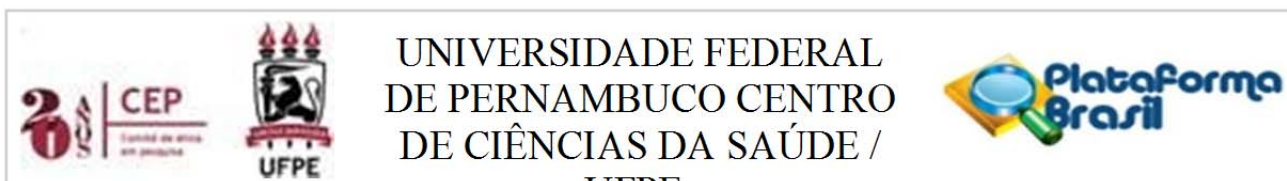
Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____	Nome: _____
Assinatura: _____	Assinatura: _____



ANEXO B - PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS CCS-UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação in vitro do potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico do extrato da própolis vermelha do estado de Pernambuco

Pesquisador: JULIANA VIEIRA DE BARROS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68242617.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.131.542

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética, CB, UFPE a ser realizado pela pesquisadora Juliana Vieira de Barros sob a orientação da Profa. Dra. Neide Santos e co-orientação da Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal. O projeto trata do tema de avaliação toxicológica da própolis vermelha em modelo celulares. Onde as células serão obtidas a partir de sangue humano.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o potencial efeito citotóxico, mutagênico e genotóxico do extrato da própolis vermelha em linfócitos de sangue periférico.

Avaliar a citotoxicidade do extrato da própolis vermelha, através do teste de viabilidade celular (MTT).

Avaliar a mutagenicidade de três concentrações do referido extrato (pré-selecionadas pelo teste de citotoxicidade).

Determinar a frequência de ACs in vitro, sob as concentrações anteriormente estabelecidas do extrato da própolis vermelha, comparando com o grupo controle.

Avaliar o potencial genotóxico destas mesmas concentrações, através do ensaio de cometa em cultura de células do sangue periférico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Dentre os riscos do procedimento, o máximo que poderá ocorrer com o voluntário será o surgimento de hematomas após a coleta de sangue. Dessa forma, para tentar evitar o hematoma, será pressionado o local da punção por, no mínimo, 3 min. As seguintes indicações serão enfatizadas ao colaborador após a coleta:

1) Evitar flexionar o braço, massagear o local e fazer esforço físico no período posterior à coleta.

Se ainda assim o hematoma aparecer, uma compressa de gelo por 15 min a cada hora, durante as seis primeiras horas será indicada, como explicado antecipadamente ao paciente no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após essa medida, compressas mornas podem ser colocadas no local para acelerar o desaparecimento do hematoma. Se houver qualquer outra reação ou dor no local, o colaborador será encaminhado ao médico.

Não estão previstos benefícios diretos. Indiretamente a presente pesquisa contribuirá para a avaliação de risco do uso de subprodutos do extrato da própolis vermelha, que são utilizados, dentre outras formas, na medicina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em tela utilizara o sangue (12 mL) de participantes para isolamento de células. A coleta do sangue periférico dos voluntários será realizada no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH) do Departamento de Genética / UFPE por uma pessoa habilitada para tal procedimento. Os critérios de inclusão serão: (1) ser do sexo masculino, independentemente de raça; (2) ter idade entre 18 e 35 anos; (3) ser aparentemente saudável, e (4) ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; e os critérios de exclusão serão: (1) ser fumante, e (2) estar passando por tratamento com uso de medicamentos. O projeto tem orçamento de R\$ 8.499,50 e todo o material já se encontra disponível. O cronograma está bem detalhado e prevê a coleta de sangue apenas após a aprovação por este CEP. Serão selecionados 6 participantes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE, Folha de rosto, Carta de anuência e o termo de compromisso estão em acordo com o preconizado.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_887712.pdf	12/05/2017 08:49:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEJULIANA.doc	12/05/2017 08:49:26	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_JulianaVieira1205.doc X	12/05/2017 08:49:17	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Declaração de	anuenciajuliana.jpg	12/05/2017	JULIANA VIEIRA DE	Aceito

Instituição e Infraestrutura	anuenciajuliana.jpg	08:49:04	BARROS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	11/05/2017 11:35:37	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Outros	termocompromisso.jpg	11/05/2017 11:26:18	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Outros	declaracao.jpg	05/05/2017 11:15:47	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Outros	Curriculo_Juliana_Vieira_de_Barros.pdf	05/05/2017 11:10:44	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Outros	Curriculo_Jose_Rafael_da_Silva_Araujo.pdf	05/05/2017 11:10:14	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Outros	Curriculo_Ana_Christina_Brasileiro_Vidal.pdf	05/05/2017 11:09:13	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito
Outros	Curriculo_Neide_Santos.pdf	05/05/2017 11:08:14	JULIANA VIEIRA DE BARROS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 22 de Junho
de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES
MONTENEGRO
(Coordenador)