

## **EFEITOS DO EXTRATO DA PRÓPOLIS PIAUIENSE NA GENOTOXICIDADE INDUZIDA PELA CICLOFOSFAMIDA EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

**M. M.de O. Lima**

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia – CEFET-PI  
Praça da Liberdade, - 1795- CEP- 64000-000 Teresina-Pi  
E-mail: michellelima@oi.com.br

**A de.S.Leite**

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia – CEFET-PI  
Praça da Liberdade, - 1795- CEP- 64000-000 Teresina-Pi  
E-mail: aracellileite2003@yahoo.com.br

**T. de J.A. S. Andrade**

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia – CEFET-PI  
Praça da Liberdade, - 1795- CEP- 64000-000 Teresina-Pi  
E. mail: aquiarte10@yahoo.com.br

**N. de O.Alves**

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia – CEFET-PI  
Praça da Liberdade, - 1795- CEP- 64000-000 Teresina-Pi  
E. mail: nilmaral@yahoo.com.br

**A.M.G. Citó**

Departamento de Química – UFPI  
Av. Petrônio Portela S/N. CEP64000.000 Teresina-Pi

**A.A.C.M. Cavalcante**

Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia – CEFET-PI  
Praça da Liberdade, - 1795- CEP- 64000-000 Teresina-Pi  
E-mail: ana\_ameliamel@ibest.com.br

### **RESUMO**

A própolis é uma substância resinosa, gomosa e balsâmica elaborada em colméias pelas abelhas a partir de brotos, flores e exsudatos de plantas em mistura com secreções salivares, ceras e pólen. Possui uma composição variada de triterpenóides, flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos e vitaminas A, Complexo B, C e, além de muitos microelementos tais como Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn e Cr. Dentre estes componentes químicos os flavonóides, precursores de vitamina A e vitamina C são relatados como compostos de excelentes atividades antioxidantes. O presente trabalho avalia os efeitos da própolis piauiense em pré e pós-tratamentos, na inibição da genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (quimioterápico alquilante e oxidante para o material genético) em medula óssea de camundongos, com a aplicação do teste de Micronúcleo *in vivo*. Dados preliminares mostram que a própolis (0,2 mL/10g de peso de camundongo) inibe a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (50 mg/Kg), em pré-tratamento e pós-tratamento, com significantes percentuais de 75 % e 62,5 % de inibição, respectivamente. Esses resultados sugerem que a própolis tem atividade antigenotóxica relacionada possivelmente, com as atividades antioxidantes de seus constituintes químicos naturais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Própolis, antimutagênico, antioxidante, ciclofosfamida, micronúcleos.

## 1. INTRODUÇÃO

Os danos ao DNA, causados por agentes genotóxicos são considerados como eventos iniciais que levam à mutação e inúmeros defeitos hereditários, doenças degenerativas e câncer (Moutacchi, 2000). Uma grande parte de doenças crônicas, incluindo não somente o câncer e envelhecimento, mas também as doenças auto-imunes, inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas resultam dos danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) (Aruoma, 2003). Nos anos recentes, muitas substâncias presentes em vegetais têm sido consideradas como uma alternativa para escapar dos processos de mutagênese e/ou carcinogênese, devido às suas propriedades quimiopreventivas de mutações ao DNA e de interferência nas etapas de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese (Cambie e Ferguson, 2003; Lee e Park, 2003).

A própolis é uma substância resinosa e balsâmica formada a partir de resinas extraídas pelas abelhas *Apis mellifera* de diferentes partes de plantas, transformadas na colméia com a junção das enzimas salivares desses insetos, cera, pólen e materiais inorgânicos. Sua composição, portanto, está intimamente ligada às espécies vegetais. As abelhas a utilizam para fechar frestas ou danos, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha contra ataques de insetos e microrganismos, e no embalsamento de insetos que poderiam contribuir para a proliferação de fungos. Sua composição química é muito complexa, havendo relato de mais de 300 substâncias identificadas. Alguns fatores contribuem para esta complexidade, como a coleta pelas abelhas de tecidos vegetais de diferentes espécies botânicas, a época da colheita, a técnica empregada e a espécie da abelha. Sua composição química é muito variada, podem ser citados: complexo B, C e microelementos tais como Mn, Cu, Ca, Al, Ni, Cr além de ácido benzóico, compostos triterpênicos e principalmente flavonóides (Christov, et al., 2005). Existem relatos do uso de própolis em medicina popular desde a antiguidade. No Egito antigo era empregada para embalsamar os mortos. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na Segunda Guerra Mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas, como base de uma pomada para tratar ferimentos, apresentando excelentes resultados. Atualmente, é bastante usada em alimentos e bebidas para manter a saúde e prevenir doenças coronárias, diabetes e até mesmo câncer. A própolis e seus constituintes químicos apresentam várias atividades farmacológicas, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica e antitumoral (Inokuchi et al., 2004).

O estado do Piauí possui em excelente potencial apícola, mas as pesquisas no tema ainda são insipientes, entretanto Sousa e colaboradores (2004) identificaram os constituintes do óleo essencial da própolis produzida na cidade de Pio IX – Piauí, dentre eles o  $\beta$ -canofileno (12,20 %), óxido de cariofileno (13, 53 %) e viridiflorol (12 45%). Em estudos com amostras de própolis coletadas em diferentes épocas da cidade de Teresina – Piauí, Silva e colaboradores (2005) identificaram seis triterpenóides derivados do cicloartanos: ácido isomangiferólico, ácido mangiferólico, 24 metileno cicloartano-3  $\beta$ , 26-diol, ácido ambólico e ácido ambônico, todos considerados inéditos em própolis. A ciclofosfamida (CPA) é um agente alquilante bi-funcional e de ação oxidante, particularmente pelos metabólitos secundários do composto (Franke et al., 2005), que constitui um dos químicos presentes no coquetel para quimioterapia. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* os efeitos da própolis na modulação da mutagenicidade induzida pela ciclofosfamida, em medula óssea de camundongos, com a aplicação do teste de micronúcleos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes químicos

Solução tampão 0,2M em fosfato de potássio, corante Giemsa e May-Grünwald, Ciclofosfamida (200mg), ambos da Sigma (St. Louis. MO-US), heparina (Roche-Brasil) e soro bovino fetal. As amostras de própolis foram cedidas por pesquisadores do grupo de produtos naturais da Universidade Federal do Piauí.

### 2.2. Tratamento dos animais

Camundongos machos (total de 24) obtidos do Biotério da Universidade Federal do Piauí-UFPI, de cinco a sete semanas de idade, pesando de 20-30g, aclimatados durante 2 semanas à temperatura de 22 a 25°C e 60% de umidade, devidamente alimentados com ração específica (NUVILAB) e água potável. Os animais foram expostos a ciclos de luz segundo as normas vigentes durante todas as etapas do teste. As cobaias foram divididas em 6 grupos de 4: (1) controle positivo (CPA na dose de 50mg/Kg), (2) controle negativo (CN), (3) controle do extrato da própolis, (4) pré-tratamento dos camundongos durante três dias antes da administração da CPA, (5) pós-tratamento com própolis após a administração da CPA. Após coleta do material de análise os animais foram abatidos por deslocamento cervical e incinerados. O pré-tratamento dos animais com própolis e CPA e o pós-tratamento com CPA e própolis foram de três

dias, sempre nos volumes de 0,1-0,2 mL de cada solução para cada 10 g de peso de camundongo aplicadas por gavagem (via oral) sempre no mesmo horário.

### 2.3. Teste de micronúcleos

O teste de micronúcleos (MN) com medula óssea e sangue periférico foi feito como descrito por Krishna e Hayashi (2000). Após 24 horas, do último dia de tratamento 15 µL de sangue periférico foi coletado em corte feitos na cauda e misturados em tubos, contendo 7 µL de heparina. Após 24 horas as lâminas com esfregaço do sangue periférico foram fixadas com metanol:ácido acético (3:1) e coradas com uma mistura de azul de metileno (Giemsa com May-Grünwald e 0,2 M de tampão fosfato pH 5,8, na proporção de 60:30:10, respectivamente. A coleta de medula óssea foi feita extraíndo-se os dois fêmures dos animais. Em seguida, as células foram maceradas com soro bovino fetal sobre lâminas para microscopia, onde se realizou o esfregaço. Após 24 horas foram coradas como descrito. A análise do material foi feita em microscópio óptico comum a uma resolução de 10X100. Foram contados 500 eritrócitos imaturos policromáticos (PCE) e eritrócitos maduros normocromáticos (NCE) (coloração seletiva para ribossomos) por lâminas e mais 500 PCE totalizando 1000 células por lâminas de cada cobaia. Foram lidas 3 lâminas por cobaia. A relação entre PCE e NCE foi observada. O percentual de redução/modulação de micronúcleos foi calculado segundo Delmanto et al. (2001) pela fórmula: % modulação =  $\frac{\text{MN do grupo CPA} - \text{MN do grupo com suco}}{\text{MN do grupo CPA} - \text{MN do grupo CN}} \times 100$ .

### 2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos em cada grupo de tratamento foram analisados pelos modos estatísticos. Análise de Variância Anova, seguida do teste de Student e teste T de Tukey para detectar diferenças entre os grupos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

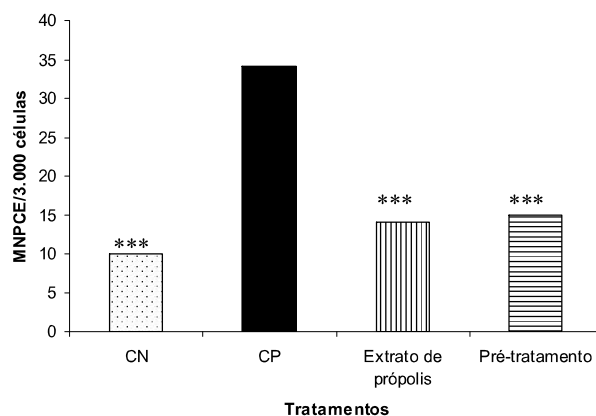
Os dados obtidos no teste de micronúcleos indicam que a própolis modula a indução de danos citogenéticos (aberrações cromossômicas) em medula óssea de camundongos, induzidas pela CPA em 75 %, em pré-tratamento e tem efeitos 62%, nos danos induzidos pela CPA, em pós-tratamento (**Tabela I**).

**Tabela I: Avaliação da ação do extrato de própolis na genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (50 mg/Kg) em medula óssea de camundongos**

Tratamentos	Lâmina 1	Lâmina 2	Lâmina 3	Soma	Média/DV	Nº de PCE	% PCE	% Inibição
CN	3	3	4	10	3 ± 0,5	3.000	0,06	-
CP	9	11	14	34	11±2	3.000	0,2	-
Extrato de própolis	4	5	5	14	5 ± 0,5	3.000	0,1	-
Pré-tratamento	5	4	6	15	5 ± 1	3.000	0,1	75,0
Pós-tratamento	7	6	5	18	6 ± 1	3.000	0,1	62,5

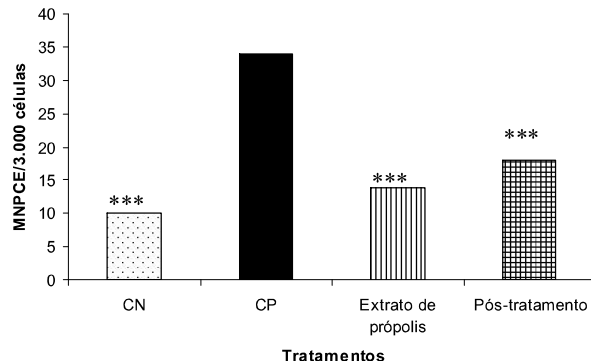
Fonte: Pesquisa realizada no laboratório de Genética Toxicológica do Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí em 2006.

A antimutagenicidade da própolis em pré-tratamento (**Figura 1**) e pós-tratamento (**Figura 2**) diante dos danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos submetidos a tratamento com CPA pode estar principalmente relacionada com atividade antioxidante dos compostos químicos. A este respeito tem sido descrito que os compostos fenólicos protegem efetivamente as células dos efeitos genotóxicos induzidos por agentes oxidantes, principalmente pela habilidade desses compostos de seqüestrar ERO e quelar metais (Khorkhar, 2003; Melo Cavalcante et al., 2003; Melo -Cavalcante et al., 2005). Cabe lembrar que a ação sinérgica entre compostos antioxidantes foi relatada e relacionada com a alta atividade antioxidante de extratos vegetais e que o ácido ascórbico em mistura com fenólicos tem sua atividade antioxidante aumentada (Moure et al., 2001).



**Figura I Antimutagenicidade da própolis piauiense em pré - tratamento, na inibição de danos alquilantes e oxidativos induzidos ao DNA de medula óssea de camundongos. Análise de Variância ANOVA, seguida do teste de Student e teste T de Tukey. \*\*\*  $P \leq 0,001$ .**

A própolis é um importante produto químico natural que além das propriedades nutritivas e medicinais também oferece proteção contra a mutagênese induzida por agente alquilante e oxidante, com atividade antimutagênica observada *in vivo* em medula óssea de camundongos em pré-tratamento (**Figura I**) e pós-tratamento (**Figura II**), possivelmente por mecanismos atribuídos às propriedades antioxidantes de alguns dos seus constituintes químicos, a exemplo dos flavonóides, por reação direta com o mutágeno (CPA), por inativação e/ou ativação das enzimas de fase I, por indução das enzimas de fase II e por prováveis participações nos mecanismos de reparo.



**Figura II Antimutagenicidade da própolis piauiense em pós - tratamento, na inibição de danos alquilantes e oxidativos induzidos ao DNA de medula óssea de camundongos. Análise de Variância ANOVA, seguida do teste de Student e teste T de Tukey. \*\*\*  $P \leq 0,001$ .**

Um dos mecanismos propostos para os efeitos observados é a atividade antioxidante da maioria dos compostos químicos presentes na própolis. Existem relatos de que amostras de própolis apresentam excelentes propriedades antioxidantes com atividade de seqüestrar radicais livres observadas com o teste **DPPH** devido a alta concentração de compostos fenólicos tais como ácido coumárico, hidroxiacetofenona e dihidroxi calconas (Christov et al., 2005;

Trueheva et al., 2006). A própolis inibe neurotoxicidade de células expostas em peróxido de hidrogênio (Inokuchi, 2004). Cabe lembrar que a ação sinérgica entre compostos antioxidantes foi relatada e relacionada com a alta atividade antioxidante de extratos vegetais e que o ácido ascórbico em mistura com fenólicos tem sua atividade antioxidante aumentada (Moure et al., 2001).

Os resultados (**Tabela I, Figuras I e II**) demonstram que a própolis é importante fonte de compostos químicos com excelentes atividades antimutagênicas em medula óssea de camundongos avaliados pela frequência de micronúcleos, em pré e pós-tratamento. O estudo sugere que a própolis protege contra clastogênese e aneugênese induzida pela CPA que pode ser devido a sua atividade antioxidante, modulação das enzimas de fase I e II envolvidas na detoxificação da CPA ou como substrato competitivo para ação nucleofílica da CPA.

A identificação de atividades antimutagênicas e antioxidantes *in vivo* associadas aos mecanismos de ação de produtos químicos naturais a exemplo da própolis é um indicativo preliminar de que novas pesquisas merecem atenção especial devido aos efeitos da própolis para a saúde humana, como agente quimiopreventivo de mutações e/ou câncer, bem como na sua ação terapêutica e complementar ao tratamento de pacientes com doenças relacionadas com a instabilidade genética. Outros estudos *in vitro* e *in vivo* serão feitos para avaliar os prováveis mecanismos para os efeitos observados na ação quimiopreventiva dos componentes químicos naturais presentes na própolis piauiense.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aruoma, O. I. **Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant food.** Mutation Research, 9455, 1-12, 2003.

Cambie, R. C., Ferguson, L. R. **Potential functional foods in the traditional Maori diet.** Mutation Research, 9464, 1-9, 2003.

Christovi, R., Trusheva, M. P., Bankova, V., Bertrand, M. **Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin.** Natural Product Research, 19, 7, 673-678, 2005.

Franke, s.i.r. , Prá, D., Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. **Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> on mouse blood cells in vivo.** Mutation Research 2005.

Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Nakajima, Y., Suemori, S., Mishima, S., and Hara<sup>1</sup>, H. **Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources.** Evid Based Complement Alternat Med. Sep; 1(2): 175-185, 2004

Krishna, G., Hayashi, M. **In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation.** Mutation Research, 155-166, 2000.

Khokhar, S., Apenten, R.K.O. **Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations.** Food Chemistry, 80, 2003.

Lee B.M., Park K-K. **Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents.** Mutation. Research., 523: 265-287. 2003.

Melo-Cavalcante, A.A.C., Rübensam, G., Picada, J.N.; Silva, E.G., Moreira, J.C.F., Henriques, J.A.P. **Mutagenic evaluation, antioxidant potential and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina.** Environ Mol Mutagen. 41, 360-369, 2003.

Melo-Cavalcante, A.A.C., Rübensam, G., Erdtmann, B.; Brendel, M.; Henriques, J.A.P. **Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. typhimurium*.** Genetics and Molecular Biology. 28(1), 2005

Moure, A., Franco, D., Domingues, J.M., Sineiro, J., Domingues, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C. **Natural antioxidants from residual sources.** Food Chemistry. 72: 145-171, 2001.

Moustacchi, E. **DNA damage and repair: consequences on dose-responses.** Mutation Research, 464: 35-40, 2000.

Sousa, S. A.A., Citó A. M. G. L., Lopes, J. A. D. **Constituintes do óleo da própolis produzida na cidade de Pio IX.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2004.

Silva, M.S.S., Citó, A.M.G., Chaves, M. H. e Lopes, J. A. D. **Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina – Pi.** Quim. Nova, 28, 5, 801-894, 2005.

Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., da Rocha Pasin, F., Tsvetkova, I. **Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis.** Evid Based Complement Alternat Med. 2006 Jun; 3(2): 249-254, 2006.