XII Salão de Iniciação Científica PUCRS

Avaliação do Potencial Citotóxico do Extrato de Própolis da Abelha Sem Ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí)

Bruna Nicolini da Silva[1], Julia Cisilotto[1], Denise Milão[1] (orientadora)
[1]*Faculdade de Farmácia, PUCRS*

Introdução

As abelhas que pertencem a Tribo Meliponini são popularmente conhecidas como "abelhas indígenas sem ferrão" (NOGUEIRA, 1997). A abelha *Tetragonisca angustula* (Jataí) é uma abelha sem ferrão nativa do Brasil, com ampla ocorrência no Rio Grande do Sul (BLOCHTEIN; *et al*., 2009). Esta abelha produz mel e própolis de excelente qualidade e com muitas propriedades biológicas que devem ser estudadas.

A própolis é uma mistura complexa de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, modificam e depositam em seus ninhos, com o objetivo de proteger a colméia de correntes de ar, luz solar, predadores e microorganismos (PEREIRA; *et al*., 2003). Sua composição química é muito variada e depende de fatores climáticos. Os constituintes da própolis com ação farmacológica mais importante são os flavonóides, os fenóis e os ácidos aromáticos (UZEL; *et al*., 2005) em que se destacam o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (ArtepelinC) (MATSUNO; *et al.,* 1997) e o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) (KUO; *et al*., 2006), que estão descritos na literatura como agentes que inibem o crescimento de células cancerígenas.

Mundialmente os cânceres de pescoço e cabeça correspondem a 10% dos tumores malignos e aproximadamente 40% dos cânceres dessa localização ocorrem na cavidade oral (BRASIL, 2002). O carcinoma epidermóide, também conhecido como carcinoma de células escamosas, é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento representando de 90% a 95% dos casos de câncer de boca.

Existem muitos estudos sobre a atividade citotóxica do extrato de própolis da abelha *Apis mellifera*, porém não existem dados na literatura sobre esta atividade utilizando o extrato de própolis da abelha Jataí. Desta forma, este trabalho tem por objetivo principal avaliar o potencial citotóxico do extrato da própolis da abelha sem ferrão Jataí em células escamosas de carcinoma oral.

Metodologia

A amostra de própolis da abelha Jataí foi coletada em meliponário localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). A própolis foi triturada, homogeneizada e pesada. Foi acrescentada a própolis a mesma quantidade de etanol 70% (v/v) e essa mistura permaneceu em maceração durante 45 dias.

Foram utilizadas células escamosas de carcinoma oral de rato (SCC-158) obtidas do Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB) para a realização dos ensaios. Para crescimento, as células foram adicionadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) em garrafa para cultura de células, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37ºC e mistura de ar com 5% de CO_2. Para os experimentos, as células estavam confluentes e foram transferidas para placas de fundo chato de 24 e 96 poços, com densidade de $1x10^4$ e $2x10^3$ células/poço, respectivamente, contadas através da câmera de Neubauer. Nos ensaios, o crescimento celular foi bloqueado reduzindo a concentração de soro fetal bovino, a cada 24 horas, até a concentração de soro 0,5%.

Para avaliação da atividade citotóxica, através da inibição da proliferação celular, foram adicionadas concentrações de 30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL do resíduo seco do extrato de própolis em DMSO na cultura de células SCC-158. No controle adicionou-se DMSO a 1%. Após 24 horas de tratamento as células foram soltas da placa utilizando uma solução de tripsina/EDTA e a proliferação celular foi avaliada por contagem em câmera de Neubauer.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio (MTT). O método é baseado na conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (BURIOL, *et al.,* 2009). As células foram tratadas com diferentes concentrações do resíduo seco do extrato de própolis em DMSO (30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL). No controle adicionou-se o DMSO a 1%. Decorridas 24h da adição do tratamento, o meio de cultura presente nos poços foi desprezado e substituído por 100µl de DMEM contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5mg/ml). A seguir, as células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 ºC. Após este período, o meio foi novamente desprezado e os poços foram preenchidos com 100µl de DMSO, para dissolução dos cristais de MTT. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Spectra Max M2^e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices) para leitura das placas em 595nm.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Valores de P menores que 0,05 ($*P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

Resultados

Na Figura 1 está demonstrado o efeito do resíduo seco do extrato de própolis sobre as células SCC-158. Após 24 horas de tratamento observou-se um decréscimo significante no número de células nas concentrações de 100µg/mL e 300µg/mL quando comparado ao controle. A inibição máxima da proliferação foi na concentração de 300µg/mL, inibindo aproximadamente 98%. Na Figura 2, observa-se o resultado da viabilidade celular com diminuição significativa, comparado ao controle, nas

concentrações 30µg/mL, 100µg/mL e 300µg/mL. A inibição máxima da viabilidade celular foi de 64 ± 2% na concentração de 300µg/mL.

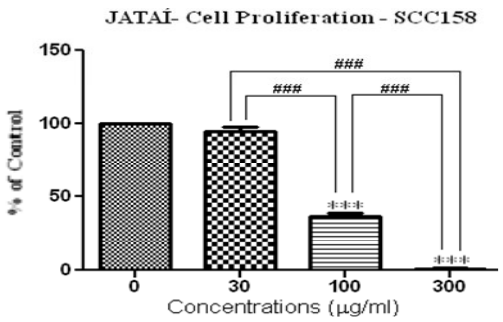

Figura 1 Efeito do tratamento com o resíduo seco de própolis em DMSO (30, 100 e 300µg/ml), após 24h. O crescimento das células de carcinoma escamoso oral SCC-158 foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer. Cada coluna representa a média ± e.p.m * P < 0,05.

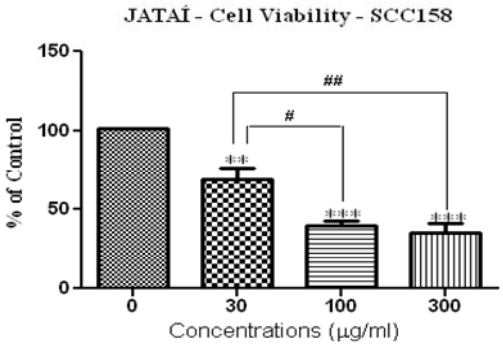

Figura 2 Efeito do tratamento com o resíduo seco de própolis em DMSO (30, 100 e 300µg/ml), após 24 h. A viabilidade das células de carcinoma escamoso oral SCC-158 foi avaliada pelo método MTT. Cada coluna representa a média ± e.p.m * P < 0,05.

Conclusão

Baseados nesse estudo, concluímos que o extrato de própolis da abelha Jataí inibiu a proliferação e viabilidade das células SCC-158. Isto poderia sugerir uma possível alternativa de tratamento para tumores. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para determinar estes efeitos e também o mecanismo de ação.

Referências

BLOCHTEIN, B.; WITTER, S. Espécies de Abelhas Sem Ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. - INCA, Falando Sobre Câncer da Boca. – Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M., dos SANTOS, J.M.T.; da ROSA, M.R.; QUINAIA, S.P.; *et al*. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. **Quimica Nova,** v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

KUO, H.C.; KUO, W.H.; LEE, Y.J.; LIN, W.L.; CHOU, F.P.; TSENG, T.H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters,** v. 234, p. 199–208, 2006.

MATSUNO, T.; JUNG, S.K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research,** v. 17, n. 5ª, p. 3565-3568, 1997.

NOGUEIRA-NETO P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

PEREIRA, A. D.; BICALHO, B.; RADLER F.; NETO, D. Comparison of propolis from Apis mellifera and Tetragonisca angustula**. Apidologie**, v. 34, n. 3, p. 291-298, May-Jun 2003.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENCAY, M.; SALIH, B.; Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005.

.